

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

LAILA BEATRIZ LEITE ANDRADE

**BIORREMEDIAÇÃO TÉRMICA DE SOLO CONTAMINADO POR NAFTALENO:
Uma avaliação por meio de bioindicadores**

ITAJUBÁ
2025

LAILA BEATRIZ LEITE ANDRADE

**BIORREMEDIAÇÃO TÉRMICA DE SOLO CONTAMINADO POR NAFTALENO:
Uma avaliação por meio de bioindicadores**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientadora: Prof^ª Dra. Eliane Guimaraes Pereira Melloni

Coorientador: Prof. Dr. Flavio Soares Silva

ITAJUBÁ
2025

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi uma jornada repleta de aprendizados, desafios e conquistas que só foram possíveis graças à presença e ao apoio de pessoas muito especiais.

Agradeço aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado ao longo deste percurso. Obrigada pelo apoio incondicional, pelas palavras de incentivo nos momentos de desespero, e por serem a base sólida sobre a qual construí este caminho. Sou imensamente grata por todas as idas e vindas à UNIFEI e ao CEQUAM, e por todo o suporte durante os experimentos.

À minha irmã, Ingrid Andrade, que mesmo em meio à reta final da sua graduação, além de me apoiar foi parceira de bancada, ajudando ativamente nas etapas práticas do trabalho. Sua ajuda foi essencial e sou muito grata por tudo o que fez por mim – dentro e fora do laboratório. Obrigada por tanto!

Ao meu namorado, Davi Veloso, meu companheiro incansável em todos os momentos, agradeço profundamente pela paciência, carinho e parceria constante. Obrigada por estar comigo em cada etapa e por literalmente colocar a mão na massa na montagem do experimento. Sua presença foi um alívio em muitos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Eliane Guimaraes Pereira Melloni e Flavio Soares Silva, deixo minha sincera gratidão pela orientação e pelas oportunidades ao longo do desenvolvimento deste projeto de mestrado.

Aos professores que marcaram minha formação, principalmente ao Professor Rogério Melloni, minha gratidão por compartilhar seu conhecimento com paixão e generosidade. Seus ensinamentos deixaram marcas profundas e me inspiraram a seguir com mais confiança.

Aos técnicos de laboratório — Paulo Sérgio Marques, João Victor Rocha de Freitas e Josivaldo Júnior Rodrigues — agradeço imensamente pelo suporte técnico, pela paciência e pela disponibilidade. A ajuda de vocês foi indispensável para este trabalho.

Aos amigos do mestrado, especialmente ao Douglas Peterson, que foram meu alívio em dias pesados e minha companhia em dias felizes. Obrigada por cada conversa, risada, desabafo e incentivo. Essa jornada foi mais leve e mais rica por causa de vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa oferecida. Ao Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos (POSMARH) e à Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) deixo meu agradecimento.

Cada pessoa aqui mencionada – e muitas outras que passaram por esse caminho – deixaram sua marca nesta conquista. A vocês, meu mais sincero agradecimento.

“O segredo da vida é o solo, porque do solo dependem as plantas, a água, o clima e a nossa vida. Tudo está interligado. Não existe ser humano sadio se o solo não for sadio”

Ana Maria Primavesi

RESUMO

A associação entre técnicas de biorremediação e remediação térmica, denominada biorremediação térmica, visa remover contaminantes do solo pelo estímulo à atividade microbiana do solo. No entanto, o aumento da temperatura em processos de remediação pode causar impactos negativos aos microrganismos do solo, a depender da faixa de temperatura. Desta forma, buscou-se avaliar os efeitos do aquecimento do solo e da contaminação por naftaleno em variáveis microbiológicas da qualidade do solo e de fitotoxicidade. Para simular a biorremediação térmica, as amostras de solo foram contaminadas artificialmente – por 5 concentrações de naftaleno (0, 50, 100, 250 e 500 mg de naftaleno /kg de solo) e submetidas, isoladamente, a aquecimento em estufas, nas temperaturas de 28, 38, 48 e 58 °C. Os efeitos dos fatores foram determinados por meio das variáveis microbiológicas – atividade e biomassa microbiana, quociente metabólico e contagem de bactérias em placas, e de fitotoxicidade – germinação e comprimento de raízes de sementes de alface, avaliados imediatamente e após 15 e 30 dias de contaminação. Para análise estatística dos efeitos nas variáveis foi utilizado o *software* R, foram aplicadas análises multivariadas: PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*), Análise Hierárquica de Clusters (HCA), Correlação de Spearman, teste de Mantel e Análise de Componentes Principais (PCA). Adicionalmente, testou-se a aplicação de uma metodologia de extração e quantificação do naftaleno, cujos resultados foram obtidos com sucesso apenas para altas concentrações, o que inviabilizou sua aplicação no acompanhamento da degradação do naftaleno. A partir das variáveis aplicadas foi verificado que a contaminação imediata de naftaleno implicou em redução da biomassa e crescimento microbiano, associados a maior estresse ambiental em altas concentrações (250 e 500 mg /kg). Com o passar do tempo (15 e 30 dias), foi identificada interação entre a temperatura e a concentração do contaminante, com efeito complexo entre estes fatores; a faixa de temperatura entre 28 e 38 °C apresentou estímulo ao crescimento das comunidades microbianas, de forma independente da concentração. Esses resultados indicam que faixas térmicas abaixo de 40 °C são promissoras para aplicação em estratégias de biorremediação térmica, pois beneficiam os microrganismos do solo e favorecem potencialmente a degradação do contaminante.

Palavras-chave: naftaleno; biorremediação; temperatura; bioindicadores.

ABSTRACT

The combination of bioremediation and thermal remediation techniques, known as thermal bioremediation, aims to remove contaminants from the soil by stimulating microbial activity in the soil. However, increasing the temperature in remediation processes can have negative impacts on soil microorganisms, depending on the temperature range. Thus, we sought to evaluate the effects of soil heating and naphthalene contamination on microbiological variables of soil quality and phytotoxicity. To simulate thermal bioremediation, soil samples were artificially contaminated with five concentrations of naphthalene (0, 50, 100, 250, and 500 mg of naphthalene/kg of soil) and subjected, individually, to heating in ovens at temperatures of 28, 38, 48, and 58 °C. The effects of the factors were determined using microbiological variables – microbial activity and biomass, metabolic quotient, and bacterial count on plates – and phytotoxicity variables – germination and root length of lettuce seeds – evaluated immediately and after 15 and 30 days of contamination. For statistical analysis of the effects on the variables, R software was used, and multivariate analyses were applied: PERMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance), Hierarchical Cluster Analysis (HCA), Spearman's Correlation, Mantel's test, and Principal Component Analysis (PCA). In addition, the application of a methodology for the extraction and quantification of naphthalene was tested, the results of which were obtained successfully only for high concentrations, which made its application in monitoring naphthalene degradation unfeasible. Based on the variables applied, it was found that immediate naphthalene contamination led to a reduction in biomass and microbial growth, associated with greater environmental stress at high concentrations (250 and 500 mg/kg). Over time (15 and 30 days), an interaction between temperature and contaminant concentration was identified, with a complex effect between these factors; the temperature range between 28 and 38 °C stimulated the growth of microbial communities, regardless of concentration. These results indicate that temperature ranges below 40 °C are promising for application in thermal bioremediation strategies, as they benefit soil microorganisms and potentially favor contaminant degradation.

Keywords: naphthalene; bioremediation; temperature; bioindicators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Velocidade de crescimento para diferentes tipos de microrganismos com relação a temperatura	19
Figura 2 – Rota de degradação do naftaleno	26
Figura 3 – Fluxograma da metodologia com etapas, processos e atividades realizadas	35
Figura 4 – Vista geral da área de estudo, com destaque para o solo e sua cobertura vegetal ..	36
Figura 5 – Unidades amostrais do experimento	38
Figura 6 – Amostras na estufa – simulação da biorremediação térmica	38
Figura 7 – Placas de petri inoculadas em incubação para contagem de microrganismos	40
Figura 8 – Distribuição das sementes de alface na placa de petri e incubação	41
Figura 9 – Sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. germinadas sobre papel milimetrado	41
Figura 10 – Análise Hierárquica de Clusters (HCA) dos dados da contaminação imediata e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface	45
Figura 11 – Matriz de correlação de Spearman relacionando os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface – para os dados da contaminação imediata.....	46
Figura 12 – Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados da contaminação imediata, considera 5 níveis de concentração de naftaleno e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e de fitotoxicidade (contagem e comprimento de raízes de sementes de alface)	47
Figura 13 – Dendograma dos dados após 15 dias de contaminação e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface	49
Figura 14 – Matriz de correlação de Spearman relacionando os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface após 15 dias de contaminação do solo	50
Figura 15 – Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados após 15 dias de contaminação, considera 5 níveis de concentração de naftaleno e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e de toxicidade (contagem e comprimento de raízes de alface)	51

Figura 16 – Dendograma dos dados após 30 dias de contaminação e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface	54
Figura 17 – Matriz de correlação de Spearman relacionando os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface após 30 dias de contaminação do solo	55
Figura 18 – Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados após 30 dias de contaminação, considera 5 níveis de concentração de naftaleno e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO ₂) e de toxicidade (contagem e comprimento de raízes de alface)	56
Figura 19 – Verificação do pico do Naftaleno em meio líquido em medição no espectrofotômetro	76
Figura 20 – Ensaio de diluição da acetona em água destilada.....	77
Figura 21 – Curva analítica do naftaleno.....	78
Figura 22 – Resultado ensaio de extração do contaminante do solo	79
Figura 23 – Resultados de extração do solo para diferentes variáveis de interferência testadas	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação de microrganismos e temperaturas ótimas para degradação de naftaleno	28
Tabela 2 – Resultados da análise físico-química do solo	43
Tabela 3 – Teste PERMANOVA para os fatores experimentais após 15 e 30 dias de contaminação.....	48
Tabela 4 - Variáveis e ensaios aplicados para verificação da metodologia de contaminação do solo	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	TÉCNICAS DE REMEDIAÇÃO	15
3.1.1	Remediação térmica.....	15
3.1.2	Técnicas de biorremediação	17
3.1.3	Biorremediação térmica	20
3.2	REMEDIAÇÃO DO NAFTALENO	22
3.3	BIOINDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO	32
4	METODOLOGIA	35
4.1	AMOSTRAGEM DO SOLO	36
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	36
4.2.1	Caracterização física	36
4.2.2	Caracterização química	37
4.3	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	37
4.4	ANÁLISES BIOLÓGICAS	38
4.4.1	Atividade microbiana, biomassa e quociente metabólico	39
4.4.2	Contagem de bactérias totais em placas.....	39
4.4.3	Teste de fitotoxicidade	40
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO.....	43
5.2	ANÁLISES BIOLÓGICAS	44

6	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A – TESTES DE DETERMINAÇÃO DO NAFTALENO POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	76

1 INTRODUÇÃO

A avaliação de organismos sensíveis, como produtores primários, detritívoros e microrganismos, pode auxiliar na identificação dos impactos ambientais, considerados portanto bioindicadores com potencial de aplicação em estudos de qualidade do ambiente (García-Carmona *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2024; Pankhurst *et al.*, 1995). Microrganismos possuem papel ecológico relevante no ambiente, com influência na ciclagem de nutrientes, decomposição e transformação de contaminantes, sendo sensíveis às alterações ambientais (Cardoso *et al.*, 2013; Gupta; Gupta; Singh, 2017). Análises biológicas possibilitam compreender efeitos diretos aos organismos, enquanto análises químicas não fornecem informações suficientes sobre biodisponibilidade de contaminantes e efeitos nos organismos vivos (Fernández *et al.*, 2005).

A contaminação do solo tem efeitos na comunidade microbiana (Lentendu *et al.*, 2014; Stroud *et al.*, 2014), impacta na matéria orgânica do solo e atividade biológica (Zamulina *et al.*, 2022) e implica em prejuízos para a qualidade de vida e saúde da população (de Souza *et al.*, 2017; Steffan *et al.*, 2018). Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são considerados contaminantes perigosos e persistentes no solo (Gundlapalli *et al.*, 2024); o naftaleno, por exemplo, é um HPA de baixa massa molecular, com apenas 2 anéis aromáticos. Por ser um HPA mais simples pode ser utilizado como modelo para o estudo dos HPAs, pois apresenta menor peso molecular, maior solubilidade em água em comparação aos demais HPAs e abundância na natureza (Phale; Shah; Malhotra, 2019).

O solo contaminado por naftaleno pode ser remediado aplicando técnicas de biorremediação (Lee; Lee; Jeon, 2019), com aumento de eficiência de remoção associado à variação de temperatura (Kaur; Kaur; Gupta, 2020; Zeng *et al.*, 2023). Desta forma, a biorremediação térmica pode ser aplicada para remoção do naftaleno, visto que técnicas tradicionais mundialmente aplicadas, como Pump-and-Treat (P&T) e Multi-Phase Extraction (MPE) apresentam baixa efetividade (Carroll *et al.*, 2024; Chen; Zhong, 2019). A biorremediação térmica associa as técnicas de biorremediação com a remediação térmica com o objetivo de superar os limites da aplicação destes métodos de maneira isolada, combinando seus benefícios (Leite *et al.*, 2021; Moreira; Siqueira, 2006; Wang *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2023) e aumentando a eficiência do processo de descontaminação do solo.

Quanto à remediação de solos contaminados por naftaleno poucos estudos avaliam os impactos do contaminante por meio de bioindicadores diretamente no solo (Chen *et al.*, 2022; Gou *et al.*, 2023, 2024; Zeneli *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2023), ou seja, grande parte dos estudos

isola os microrganismos e estuda em meio de cultura. Assim, avaliar bioindicadores diretamente em amostras de solo seria mais próximo da realidade, ainda que em escala de laboratório, previamente a testes *in situ*. Deste modo, observou-se a lacuna deste tipo de estudo para solos tropicais brasileiros, sendo relevante a investigação da associação da variação da temperatura e seus efeitos na microbiota e na fitotoxicidade. Para determinar quais as influências da biorremediação térmica e da concentração do naftaleno nas respostas de toxicidade conduziu-se estudo por meio de variáveis microbiológicas e de fitotoxicidade da qualidade do solo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do aquecimento do solo e da contaminação por naftaleno em bioindicadores da qualidade do solo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o estado da arte das técnicas de remediação de solos contaminados por naftaleno;
- Empregar variáveis microbiológicas e de fitotoxidade na avaliação do impacto da contaminação imediata de doses crescentes de naftaleno;
- Analisar a aplicabilidade das variáveis microbiológicas e de fitotoxidade como bioindicadores da biorremediação térmica de solos contaminados por naftaleno;
- Determinar faixas de temperatura e concentração com efeitos nas variáveis microbiológicas e de fitotoxidade do solo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TÉCNICAS DE REMEDIAÇÃO

A remediação de solos contaminados é um dos maiores desafios ambientais, devido à complexidade do solo e a dinâmica dos contaminantes neste compartimento. As técnicas devem ser efetivas, econômicas e ambientalmente amigáveis, sendo o objetivo da remediação a redução da toxicidade, volume e mobilidade do contaminante (Aparicio *et al.*, 2022). A remediação pode ser aplicada em duas diferentes metodologias: *in-situ* ou *ex-situ*. Os tratamentos *in-situ* referem-se aos tratamentos que são realizados no local da contaminação, enquanto *ex-situ* são os tratamentos que envolvem a remoção do material contaminado para tratamento em outro local. Técnicas de remediação *in-situ* requerem maior tempo e possuem maiores variáveis para o tratamento, com menor custo de aplicação; o tratamento *ex-situ* permite melhor controle dos fatores limitantes e variáveis de processo, além de remover a contaminação antes que se espalhe, porém com custo de aplicação maior (Aparicio *et al.*, 2022; Hussain *et al.*, 2022).

3.1.1 Remediação térmica

O princípio das técnicas de aquecimento do solo teve origem no setor petrolífero, que desde a década de 1950 empregava calor para diminuir a viscosidade de óleos densos e intensificar a volatilidade de líquidos. Assim, as técnicas de remediação térmica foram aperfeiçoadas, com foco na remediação de solos e águas subterrâneas contaminados por líquidos de fase não aquosa (*Non Aqueous Phase Liquid* – NAPLs). Estas técnicas podem ser aplicadas, tanto *in situ*, quanto *ex situ* (Horst *et al.*, 2021; Triplett Kingston; Dahlen; Johnson, 2010).

O tratamento térmico *in situ* (*In situ thermal treatment* – ISTT) utiliza a injeção de fluidos ou aquecimento de matérias para realizar a transferência de calor no solo. Podem ser citadas as técnicas de condução direta de calor (*Thermal Conduction Heating* – TCH), aquecimento por resistência elétrica (*Electrical resistance heating* – ERH) e aquecimento por injeção de vapor (*Steam enhanced extraction* – SEE), que são ambientalmente amigáveis em áreas contaminadas maiores. As técnicas *ex situ* (*Ex situ thermal treatment* – ESTT) tem como base a escavação e transporte do solo contaminado para uma área de processamento, são técnicas de ESTT a dessorção térmica (*Thermal Desorption* – TD), incineração, pirólise, combustão lenta (*Smoldering*) e vitrificação (CLU-IN, 2021; Ding *et al.*, 2019; Horst *et al.*, 2021; Lemming *et al.*, 2013; Triplett Kingston; Dahlen; Johnson, 2010; Vidonish *et al.*, 2016)

As técnicas de remediação térmica alcançam temperaturas máximas que oscilam entre 100 e 2000 °C, com o SEE e o ERH apresentando temperaturas máximas mais baixas e a vitrificação apresenta a temperatura de aplicação mais alta. O objetivo principal dessas técnicas é elevar a temperatura do solo, retornando às origens das aplicações térmicas, modificando as características físico-químicas dos poluentes, como o aumento da mobilidade. Ademais, o uso dessas técnicas pode auxiliar na ampliação da disponibilidade de poluentes orgânicos, na separação do xenobiótico das partículas do solo, na conversão do poluente em subprodutos menos nocivos e até mesmo na eliminação, dependendo da temperatura (Ding *et al.*, 2019; Horst *et al.*, 2021; Usman, 2019; Vidonish *et al.*, 2016).

A remediação de solos contaminados pode ocorrer em temperaturas mais baixas, ou seja, para os HPAs entre 28 e 50 °C resultam em redução de 58,8% e 23,6%, respectivamente (Zeng *et al.*, 2023), para o glifosato, em temperaturas entre 10 e 30 °C verifica-se o aumento de até 50% na taxa de mineralização (Muskus *et al.*, 2020). Ainda, temperaturas entre 50 e 90 °C, por meio da combinação da dessorção térmica e processos de oxidação por ozônio, alcançam mais de 90% de remoção do composto orgânico 2,4-Dimetilanilina (Li *et al.*, 2021). Assim, temperaturas menores a 100 °C possuem capacidade de contribuir na remoção de contaminantes do solo.

Por outro lado, aplicações de dessorção térmica, elevando a temperatura do solo para 450 °C, resultam em redução de até 80% de HPAs (Wei; Xia; He, 2022) e até 99% para PFAS (substâncias per- e polifluoroalquil) (Söregård; Lindh; Ahrens, 2020). Já no tratamento de solos contaminados por TPH, HPA, em misturas complexas não resolvidas (MCNR) e HPA alquilados (Alk- HPA), com temperaturas entre 200 e 600 °C, a simulação de dessorção térmica alcança eficiência entre 74 e 99% (Choi; Lee; Jho, 2020). Assim, o aumento da temperatura do solo, em grandes proporções (>100 °C), proporciona alta taxa de remoção de diversos contaminantes.

Entretanto, a elevação artificial da temperatura do solo, acima de 100 °C, por meio de técnicas de remediação térmica pode afetar a composição mineralógica, as propriedades físicas e químicas, além de provocar alterações na matéria orgânica, na textura, no pH, na disponibilidade de nutrientes, na comunidade bacteriana, na capacidade do solo em sustentar vegetação e promover alteração na toxicidade do solo (O'Brien *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2023). Temperaturas acima de 300 °C reduzem rapidamente a matéria orgânica, alteram a mineralogia do solo, aumentam drasticamente o pH e reduzem a disponibilidade de nutrientes, o que torna o solo inóspito para plantas e microrganismos (O'Brien *et al.*, 2018).

O aquecimento do solo impacta a comunidade microbiana, o que contribui para possível redução da diversidade. No entanto, microcosmos, de solos tropicais, submetidos à 60 °C são capazes de recuperação da comunidade bacteriana (Leite *et al.*, 2021); outras observações indicam, para solos temperados, a capacidade de recolonização microbiana entre 105 e 250 °C, após adição de água ao solo (Pape *et al.*, 2015). Associado à elevação da temperatura verifica-se o aumento na presença de bactérias do filo firmicutes (em 50 °C), com significativo enriquecimento das classes de Bacilli (45%) e Clostridia (31%) (Zeng *et al.*, 2023); da mesma forma, o aumento de bactérias do filo firmicutes foi observado em demais estudos (Gou *et al.*, 2023; Yamazaki *et al.*, 2020, 2022; Zhao *et al.*, 2023), dado que são mais adaptáveis a altas temperaturas (Sun *et al.*, 2022). Em relação às plantas, temperaturas de até 250 °C resultam em menor crescimento, em 500 °C, ocorre uma redução de 50% na produção de biomassa vegetal, bem como uma diminuição na qualidade das folhas e no conteúdo de clorofila, devido à perda de nitrogênio e à redução da biodisponibilidade de micro e macronutrientes no solo (Pape *et al.*, 2015). Portanto, o aumento da temperatura, pela aplicação da remediação térmica, tem impactos significativos na comunidade microbiana e nos produtores primários.

Essas técnicas são rápidas e confiáveis para remediação de solos contaminados, desde que corretamente aplicadas. Contudo, possuem alto custo devido à utilização elevada de energia, sendo consideradas energo-intensivas; além dos impactos negativos as propriedades do solo (Ding *et al.*, 2019; O'Brien *et al.*, 2018). No entanto, quando comparadas à métodos mais invasivos, como a escavação, a remediação térmica apresenta menores impactos (Cappuyns *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2019).

Assim, para aplicação adequada da remediação térmica é necessário equilibrar a redução da concentração do contaminante com a preservação das propriedades do solo e a manutenção da comunidade microbiana e da qualidade das plantas. Deste modo, é fundamental realizar a remediação térmica na temperatura e no tempo ótimo para cada tipo de contaminante e solo, visando a aplicação da técnica com o melhor custo-benefício.

3.1.2 Técnicas de biorremediação

As técnicas de biorremediação são uma alternativa às técnicas físico-químicas tradicionais, consideradas ambientalmente amigáveis e econômicas. Estas se fundamentam na capacidade dos microrganismos (bactérias, fungos, algas etc.) em utilizar xenobióticos como fonte de energia, com objetivo de remover completamente ou reduzir sua concentração, transformando este em formas menos tóxicas. Desta forma, se tem a degradação biótica do

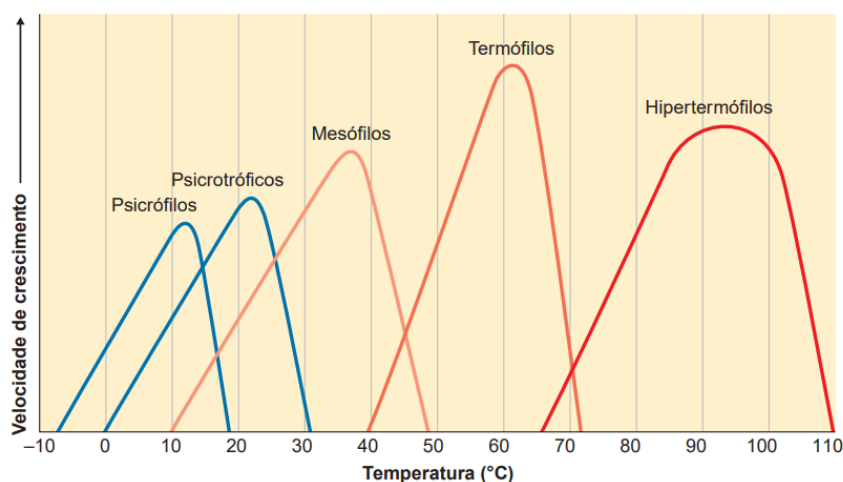
contaminante (Balba; Al-Awadhi; Al-Daher, 1998; da Silva *et al.*, 2020; Moradi; Smits; Sharp, 2018).

As técnicas de biorremediação são classificadas quanto a sua aplicação, que pode ser *in situ* ou *ex situ*, dependendo da natureza do contaminante e da área contaminada. Como técnicas *in situ* têm-se: atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação, fitoremediação e vermirremediação. Já as técnicas *ex situ* incluem “*landfarming*”, biopilhas, biorreatores e compostagem, entre outras (Aparicio *et al.*, 2022; da Silva *et al.*, 2020; Megharaj; Naidu, 2017; Moreira; Siqueira, 2006).

Apesar de serem ambientalmente benéficas e, geralmente, mais econômicas, quando comparado as técnicas físico-química, as técnicas de biorremediação possuem fatores que afetam a degradação do contaminante. Condições ambientais como presença de nutrientes, umidade, aeração, matéria orgânica, oxigênio, pH, temperatura, a concentração de contaminantes, assim como a composição e abundância de microrganismos (Moradi; Smits; Sharp, 2018; Moreira; Siqueira, 2006; Wang *et al.*, 2022). Fatores como aeração, temperatura, taxa de agitação e proporção de massa água-solo foram identificados como significativamente impactantes na degradação de HPAs (Bao *et al.*, 2023). Da mesma forma, para remediação de Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) Al-Rashed *et al.* (2021) verificaram influência de fatores como concentração de extrato de levedura, glucose, pH e temperatura. Ainda, a textura do solo é um fator que pode influenciar a capacidade de biodegradação de HPAs (Weissenfels; Klewer; Langhoff, 1992).

Dos fatores ambientais impactantes na biorremediação, a temperatura possui papel importante na biodisponibilidade de contaminantes, afetando o crescimento e metabolismo microbiano. Os microrganismos podem ser classificados conforme a faixa de temperatura ótima de respiração e crescimento: psicrófilos, psicrotróficos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos, possuem temperaturas ótimas baixa (<20 °C), intermediárias (0 – 30 °C), moderadas (20 – 44 °C), altas (40 – 70 °C) e muito altas (>70 °C), respectivamente (Moradi; Smits; Sharp, 2018; Tortora; Funke; Case, 2012; Wang *et al.*, 2022). A relação de temperatura ótima de crescimento para diferentes microrganismos pode ser vista na Figura 1.

Figura 1 – Velocidade de crescimento para diferentes tipos de microrganismos com relação a temperatura



Fonte: Tortora, Funk e Case (2012)

Estudos apontam diferentes temperaturas ótimas para crescimento das variadas espécies de bactérias, bem como para degradação dos diversos contaminantes. Na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) temperaturas mesofílicas (25 °C) foram mais benéficas que a termofílicas (45 °C), levando a 79,8% de remoção em comparação à 62,4% (Hesnawi; Mogadami, 2013). A tendência de temperaturas mesofílicas é verificada na remediação de fenantreno ($C_{14}H_{10}$) por *Diaphorobacter* sp. YM-6 em que a temperatura ótima é de 30 °C, para 96.3% de degradação (52 h) (Wang, P. *et al.*, 2020). Do mesmo modo, Zhang *et al.* (2022) identificou que para bactérias *Enterobacter* sp. a temperatura ótima para degradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo é 30 °C, com remoção de 65,19%, em 21 dias. Assim como, para remediação de naftaleno aplicando *Bacillus licheniformis* e *Bacillus sonorensis* em que se verificou temperatura ótima de 37 °C, para degradação entre 52 e 73%, em 7 dias (Rabani *et al.*, 2022). Ainda, para remoção de Cd (II) e Pb (II) bactérias *Bacillus* sp. apresentaram temperatura ótima em torno de 38 °C, implicando na remoção, em 72 horas, de 70% do Cd e 93,9% do Pb (Heidari; Panico, 2020). Em outro estudo na remediação de cádmio verifica-se para *Pseudomonas* sp. temperatura ótima de 50 °C, capazes de remover mais de 90% de Cd (II) em 24 horas (Al-Dhabi *et al.*, 2019). Apesar deste exemplo de temperatura mais elevada, a temperatura ótima para remediação de metais pesados como Cu (II) e Zn (II) tende aos 30 °C, para *Pseudomonas stutzeri* e *Rhodobacter sphaeroides* (Palanivel *et al.*, 2020; Peng *et al.*, 2018).

Deste modo, a temperatura se destaca como um fator influente em processos de biorremediação, verifica-se que o aumento da temperatura promove a melhoria da eficiência da biodegradação. Ainda, a temperatura ótima para degradação depende diretamente das

propriedades do solo, do tipo de contaminante e suas características, bem como do microrganismo atuante.

3.1.3 Biorremediação térmica

A biorremediação térmica (TEB, do inglês *thermally enhanced bioremediation*) é uma abordagem que combina as técnicas de remediação térmica e biorremediação. Essa sinergia visa superar as desvantagens e limitações inerentes à aplicação das técnicas de forma individual, o que melhora as características do contaminante, como solubilidade, biodisponibilidade e viscosidade. Além disso, influencia as propriedades químicas do solo e a estabilidade de agregados, bem como aprimora parâmetros biológicos, como o enriquecimento de enzimas, a produção de biosurfactantes e o aumento da atividade metabólica dos microrganismos (Wang *et al.*, 2022). Esta associação de técnicas é relevante devido à influência do controle da temperatura nos processos biológicos, aumentando a efetividade e reduzindo a duração da biorremediação, visto que na remediação térmica as variáveis controladas são a temperatura de aquecimento do solo e o tempo de exposição (Kaur *et al.*, 2023; Nzila, 2018; Yamazaki *et al.*, 2020). Deste modo, controlando estes fatores busca-se influenciar positivamente os microrganismos do solo.

Existem casos em que mesmo após a aplicação do tratamento térmico – de maneira isolada – verifica-se concentração residual de contaminantes (Murray *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2023); nesses casos, a aplicação de temperatura pode ser realizada de forma simultânea à biodegradação ou sequencial (Nzila, 2018; Zhao *et al.*, 2023). Temperaturas brandas – *low-temperature treatment* (<60 °C) são indicadas para associação simultânea do aquecimento com biodegradação. Enquanto, temperaturas mais elevadas – *high-temperature treatment* (acima de 100 °C) podem ser utilizadas para tratamentos de biorremediação pós-térmicos, como forma de refinamento da remediação térmica, ou seja, utiliza-se do aquecimento residual para estimular os microrganismos remanescentes no solo (Gou *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2023).

A associação de técnicas voltadas para melhoria do processo de biorremediação pode envolver, por exemplo, a técnica de aquecimento por resistência elétrica (*Electrical resistance heating* – ERH), eletro-biorremediação (*electro-bioremediation*), fontes geotérmicas de calor, entre outras (Cameselle; Reddy, 2022; Han *et al.*, 2020; Kaur; Krol; Brar, 2021; Ma *et al.*, 2020; Wang; Guo, 2023; Zheng; Cui; Li, 2022). A técnica de ERH tem como principais vantagens o aquecimento uniforme e a capacidade de aquecer em temperaturas mais baixas (*low-temperature treatment*) o que não influencia negativamente as propriedades físicas do solo (Han

et al., 2020). A eletro-biorremediação, associação da remediação eletrocinética com a biorremediação, favorece os nutrientes, oxigênio, atividade microbiana, mobilização e transporte de contaminantes, aumentando a biodisponibilidade e taxa de degradação (Cameselle; Reddy, 2022; Wang *et al.*, 2023).

Para tais técnicas estudos apontam remoção de 20% de HPAs em 90 minutos aplicando ERH (Han *et al.*, 2020), remoção de 40% da contaminação de petróleo aplicando eletro-biorremediação durante 105 dias (Wang; Guo, 2023) e mais de 90% de remediação de benzeno e tolueno utilizando energia geotérmica (Roohidehkordi; Krol, 2021). Ainda, foram verificados impactos positivos na atividade microbiana e taxa de degradação dos contaminantes.

Visto os efeitos da variação de temperatura nos microrganismos do solo, estudos buscam relacionar a degradação de contaminantes com melhorias ou alterações de características microbiológicas, visando otimizar o processo da biorremediação térmica. A elevação da temperatura de 15 para 40 °C implicou em aumento de 2 a 3 vezes no crescimento bacteriano e aproximadamente o dobro da taxa de biodegradação de BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos) em ensaio em meio de cultura (Kaur *et al.*, 2023). Da mesma forma, a aplicação de temperaturas entre 22 e 30 °C resultou em redução de 30% de BTEX e compostos orgânicos de gasolina e diesel, alcançando 63% de remoção do benzeno em 12 meses, a aplicação das temperaturas também implicou em maior atividade microbiana (Zeman *et al.*, 2014). Em avaliação de hidrocarbonetos, benzo[a]pireno e benzeno, a elevação de 15 para 45 °C aumenta de 57 para 88% a biodegradação (Ali *et al.*, 2023), já na remediação de HPAs o aumento da temperatura contribuiu para melhor atividade microbiana, sendo identificado 30 °C como temperatura ótima, com maior concentração de CO₂, relacionado a atividade microbiana, bem como maior atividade enzimática, com produção de Desidrogenase e Lacase, entre 30 e 45 °C (Ali *et al.*, 2024).

O aumento da temperatura (entre 20, 30, 40 e 50 °C) implicou e maior abundância de microrganismos e no aumento da remoção biótica de 14 HPAs de 37,81% para 83,95% com os acréscimos de temperatura, em que 50 °C foi a temperatura ótima para biodegradação (Sun *et al.*, 2022). Em condições anóxicas, verificou-se que a eficiência de biorremediação de HPAs seguindo a ordem de temperatura: alta (45 °C) > moderada (30 °C) > baixa (15 °C), em que a maior eficiência ocorreu na remoção de HPAs de baixa massa molecular (2, 3 e 4 anéis aromáticos) (Gou *et al.*, 2023). Da mesma forma, para solos sazonalmente congelados contaminados com petróleo verificou-se temperatura ótima de 30 °C para produção de gases relacionados a atividade microbiana (CO₂ e CH₄), em que o aumento de temperatura implicou em maior remoção de contaminantes (Wang, X. *et al.*, 2020).

A biorremediação térmica também pode ser aplicada em outros poluentes como na decloração do cis-1,2-dicloroeteno, em que o aumento de 15 para 30 °C, contribuiu para reação mais rápida, reduzindo o tempo pela metade. Associado a isto verificou-se maior crescimento e atividade microbianos de populações de *Dehalococcoides*, gênero responsável pela decloração (Yamazaki *et al.*, 2020). Outro contaminante, o 17 β -estradiol, um hormônio esteroide que é disruptor endócrino, apresentou maior biodegradação (95,20% de remoção) por bactérias *Rhodococcus* sp. em temperaturas de 25 °C, associado a condição ótima para crescimento do microrganismo (Hao *et al.*, 2024).

Desta forma, a biorremediação térmica em temperaturas brandas (<60 °C) implica em benefícios para remediação dos contaminantes presentes no solo, como petróleo (Wang, X. *et al.*, 2020), BTEX (Kaur *et al.*, 2023; Zeman *et al.*, 2014), HPAs (Ali *et al.*, 2023, 2024; Gou *et al.*, 2023; Mehetre; Dastager; Dharne, 2019; Sun *et al.*, 2022), hormônios (Hao *et al.*, 2024), compostos orgânicos (Yamazaki *et al.*, 2020), entre outros. Enfatiza-se que nestes exemplos as temperaturas ótimas foram identificadas na faixa entre 15 e 50 °C, o que destaca a eficiência das temperaturas mais baixas na biorremediação térmica.

Quanto aos impactos da biorremediação térmica na microbiota do solo, observa-se principalmente o aumento da atividade e crescimento microbiano (Kaur *et al.*, 2023; Zeman *et al.*, 2014), maior produção enzimática (Ali *et al.*, 2024), influencia na composição da comunidade microbiana durante a biorremediação (Gou *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2022), com enriquecimento de populações específicas na biodegradação de cada contaminante (Yamazaki *et al.*, 2020, 2022). O que indica que a aplicação, em temperaturas adequadas, da biorremediação térmica pode estimular os microrganismos do solo em seu desenvolvimento e na degradação de contaminantes.

3.2 REMEDIAÇÃO DO NAFTALENO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são uma classe de substâncias químicas que ocorrem naturalmente, sendo formadas pela combustão incompleta de carvão, petróleo, gasolina, resíduos sólidos, madeira e outros materiais orgânicos. HPAs são constituídos de dois ou mais anéis aromáticos, podendo conter outros átomos além de carbono e hidrogênio, como o nitrogênio. Apesar da ocorrência natural dos HPAs, alguns são fabricados, como o naftaleno (US EPA, 2024; CDC, 2022).

A exposição dos seres humanos a HPAs pode ocorrer através de inalação de ar contendo fumaça de cigarro, incêndios florestais, atividade industrial ou erupção de vulcões, emissões de veículos, além de contato dermal com derramamento de petróleo, solo ou água

contaminada (Venkatraman *et al.*, 2024). O contato com esses contaminantes pode levar a agravos à saúde, sendo associados a problemas respiratórios, carcinogenicidade, mutagenicidade e anomalias metabólicas (Patel *et al.*, 2020; Verma *et al.*, 2022). Estudos indicam potencial risco para mulheres grávidas e alta probabilidade de câncer devido à exposição a HPAs, via ingestão de alimentos contaminados (Cesila *et al.*, 2023), o Outra via de contato é a inalação de material particulado, pois este se liga aos HPAs, a exposição à células epiteliais brônquicas causa inflamação aguda e danos no DNA (Jiang *et al.*, 2023).

Os efeitos agudos à saúde, devido à exposição a altos níveis de HPA, incluem irritação dos olhos, náusea, diarreia e confusão (Mallah *et al.*, 2022). A inalação de HPAs pode causar problemas respiratórios, como tosse e falta de ar. A exposição prolongada pode levar a impactos crônicos à saúde, como asma e bronquite crônica. Ainda, certos HPAs podem ter efeitos toxicológicos no sistema imune levando ao agravamento de várias doenças (Venkatraman *et al.*, 2024). Estes compostos apresentam ainda genotoxicidade, sendo capazes de induzir alterações nos genes humanos (Wang, S. *et al.*, 2024).

Das centenas de HPAs existentes, 16 destes compostos são listados como poluentes prioritários regulados pela EPA (*Environmental Protection Agency*) devido a sua toxicidade e persistência no ambiente (US EPA, 2014), sendo o naftaleno (NAP) um dos compostos desta lista. O naftaleno ($C_{10}H_8$) é um HPA branco na forma de cristais em temperatura ambiente, que possui apenas dois anéis aromáticos, deste modo apresenta o menor peso molecular entre os HPAs (128,19 g/mol). Esta substância apresenta odor característico, com ponto de ebulição de 218 °C e ponto de fusão de 80,5 °C. O seu vapor tem pressão parcial de 0,087 mmHg (25 °C), sendo classificado como um composto orgânico semivolátil (SVOCs) (ATSDR, 2005). Por apresentar solubilidade em água relativamente alta – dentre os HPAs (31,7 mg/L), o naftaleno pode ser dissolvido em águas subterrâneas ou ser adsorvido nas partículas do solo (Mendes *et al.*, 2020). O naftaleno é encontrado em fontes naturais, como em combustíveis fósseis, sendo um dos constituintes do diesel, além de tintas de tecido, pesticidas, plastificantes e agentes de bronzeamento (Preuss; Angerer; Drexler, 2003). A Resolução CONAMA 420/2009 possui valor de prevenção para o naftaleno (NAP) de 0,12 mg/kg de solo, valor limite em que o solo é capaz de sustentar suas funções principais; já 90 mg de naftaleno/kg de solo é definido como valor máximo de investigação, ou seja, acima desta concentração existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição padronizado (CONAMA, 2009).

O solo pode ser contaminado devido à derramamentos de petróleo e seus derivados, combustão de carvão e petróleo, bem como outras fontes de biomassa e atividade industrial

(Kicińska; Dmytrowski, 2023; Patel *et al.*, 2020), no solo estes compostos são retidos, sendo persistentes (Barbosa *et al.*, 2023). Áreas construídas possuem maior risco ecológico devido aos solos contaminados por HPAs do que áreas de florestas e pastagens (Wang, H. *et al.*, 2024). Do mesmo modo, maiores concentrações do contaminantes são relacionadas a áreas de maior tráfego, como estradas e locais turísticos, enquanto parques voltados à conservação apresentam menores concentrações (Kicińska; Dmytrowski, 2023).

No solo, o comportamento do contaminante dependerá de características, como a mineralogia do solo, matéria orgânica e umidade, que irão interagir regendo seu comportamento. Com relação a umidade do solo, a água pode agir impedindo a adsorção do naftaleno pelos argilominerais, verifica-se a criação de uma espessura crítica de filme de água nos argilominerais do solo, a qual pode contribuir para dessorção do naftaleno na aplicação de remediação térmica de áreas contaminadas (Chen; Hu, 2022). Argilominerais, como montmorilonita e caulinita (em suas duas estruturas: octaedros de alumínio e tetraedros de silício) apresentam diferentes potenciais na adsorção do naftaleno. A montmorilonita, característica de solos com menor grau de intemperismo, apresenta maior adsorção do naftaleno que a caulinita. Na caulinita, o naftaleno tende a ser adsorvido na camada de octaedros de alumínio (Chen; Hu, 2022). A composição mineralógica do solo – como conteúdo de siderita e magnetita, carbonato e óxido de ferro respectivamente, também interfere na biodegradação de contaminantes; a presença de siderita estimulou em 7,87% a biodegradação do naftaleno, enquanto a magnetita inibiu em 3,54%, com ocorrência de bactérias do gênero *Desulfosporosinus* apenas na presença de siderita, indicando alteração na comunidade microbiana devido a composição mineralógica (Shen *et al.*, 2021).

A abundância e a diversidade de microrganismos degradadores de HPAs se relacionam positivamente com a umidade, pH e conteúdo de matéria orgânica (MO) e nitrato do solo. Solos com pH e teor de MO mais elevados tendem a apresentar menor concentração de HPAs (Du *et al.*, 2022). Solos com 10% de MO têm contagem de bactérias e fungos até 100 vezes maior que solos com apenas 2% de MO, que indica ambiente mais favorável ao crescimento microbiano. Maiores porcentagens de MO no solo aumentam a eficiência da biodegradação de hidrocarbonetos em solos contaminados com combustíveis, o aumento de 8% de MO no solo resultou em acréscimo de 10% na biodegradação em 85 dias (Chen *et al.*, 2020).

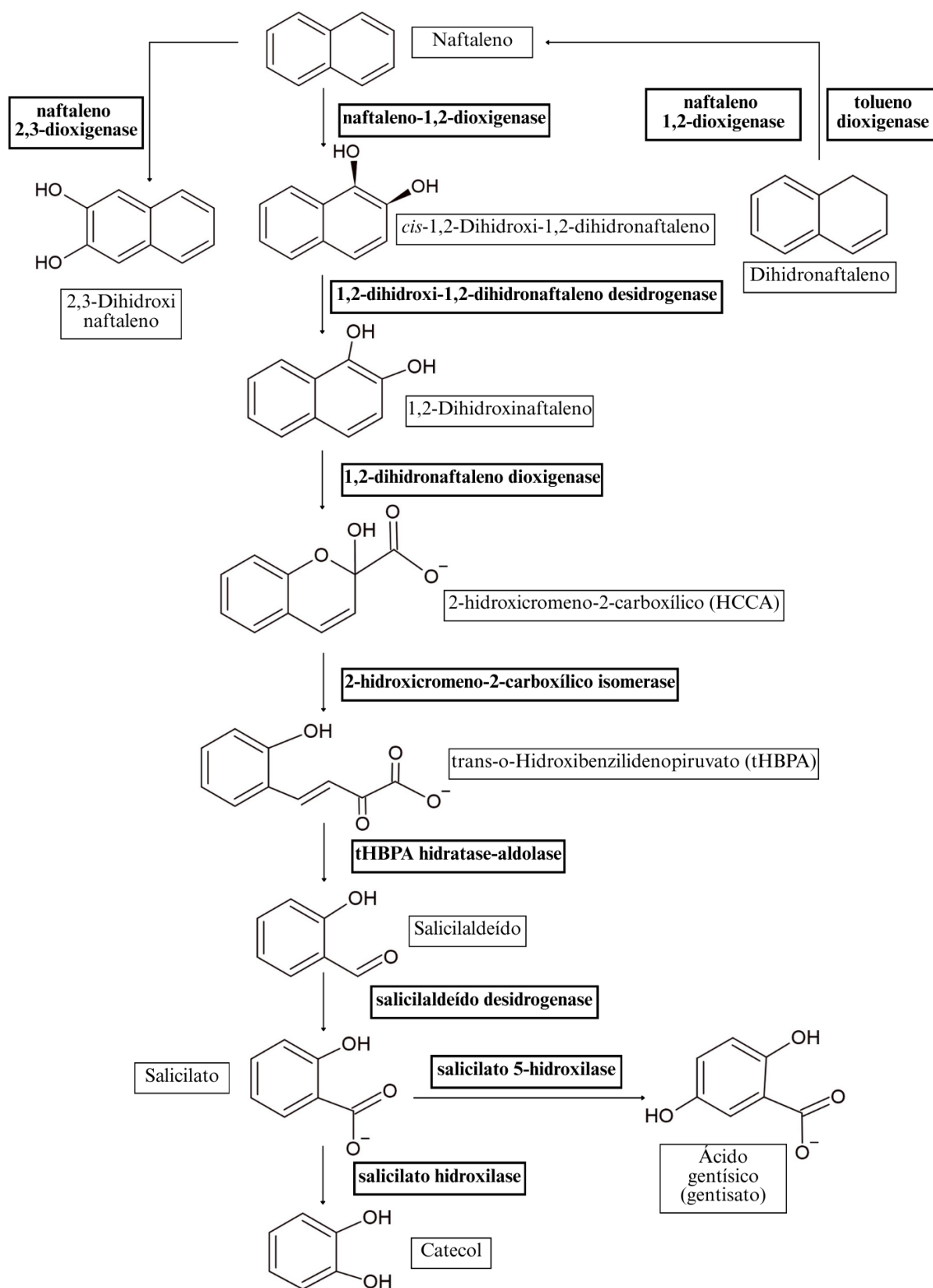
Para degradação de HPAs e do naftaleno são aplicados métodos de remediação físico-químicos, como pirólise, tratamento oxidativo, térmico, incineração, aterros e aspersão de ar, que são técnicas caras e ineficazes, gerando subprodutos tóxicos e recalcitrantes no solo (Mohapatra; Phale, 2021). Desta forma, a degradação pelos microrganismos do solo, por meio

da biorremediação, é uma solução vantajosa para remoção destes contaminantes, principalmente para o naftaleno – devido a sua baixa massa molecular (Barbosa *et al.*, 2023). Uma ampla gama de microrganismos são resistentes e capazes de atuar na biorremediação do naftaleno, bactérias do gênero *Pseudomonas* são mais identificadas e indicadas (Mohapatra; Phale, 2021; Veerasamy *et al.*, 2023).

O processo de degradação do naftaleno no solo ocorre por meio da ação de bactérias, sendo descritas: *Pseudomonas putida* (cepas: NCIB 9816-4, G7, AK-5, PMD-1 e CSV86), *Pseudomonas stutzeri* AN10, *Pseudomonas fluorescens* PC20, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus* sp, *Halomonas pacifica* Cnaph3, *Bacillus licheniformis* JUG GS2 (MK106145), *Bacillus sonorensis* JUG (RS2(3)) e *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 (Annweiler *et al.*, 2000; Basu; Dixit; Phale, 2003; Cheffi *et al.*, 2020; Dennis; Zylstra, 2004; Izmalkova *et al.*, 2013; Lee; Lee; Jeon, 2019; Mahajan; Phale; Vaidyanathan, 1994; Rabani *et al.*, 2022; Resnick; Lee; Gibson, 1996; Thimmarayan *et al.*, 2024).

A rota de degradação do naftaleno é apresentada na Figura 2, para diversas espécies de *Pseudomonas*, o processo é iniciado com 1,2-dioxigenase apresentada na rota central na Figura 2 (Eaton; Chapman, 1992), enquanto a rota à esquerda apresenta o processo de *Bacillus thermoleovorans* Hamburg 2 utilizando a enzima 2,3-dioxigenase (Annweiler *et al.*, 2000). A depender do organismo atuante no processo se tem a metabolização do naftaleno via rota do Catecol ou via Gentisato, sendo estes importantes produtos na biodegradação do Naftaleno (Mohapatra; Phale, 2021; Rabani *et al.*, 2022), porém, a rota de degradação via Catecol é mais bem estabelecida para *Pseudomonas*, que a rota via Gentisato (Izmalkova *et al.*, 2013).

Figura 2 – Rota de degradação do naftaleno



Fonte: Adaptado e traduzido de EAWAG (2024).

Deste modo, a aplicação de técnicas de biorremediação para áreas contaminadas por naftaleno e outros hidrocarbonetos é eficiente e ambientalmente amigável (Lee; Lee; Jeon, 2019). A composição e distribuição dos microrganismos no solo estará relacionada à concentração do contaminante, profundidade e temperatura (Zhao *et al.*, 2023). Assim, a aplicação de tratamentos térmicos e a utilização de microrganismos como estratégia de refinamento durante e após o tratamento térmico deve ser avaliada com cautela considerando características do solo e impactos na microbiota, pois acima da temperatura ótima existe a queda da eficiência na degradação do contaminante (Wang *et al.*, 2019).

Deste modo, devido à importância da temperatura como fator abiótico impactante na atividade microbiana têm-se diversos estudos com foco na determinação da temperatura ótima para crescimento e degradação de naftaleno por bactérias – isoladas e inoculadas ou indígenas ao solo (Tabela 1). Verifica-se na Tabela 1 as faixas de temperatura testadas, a temperatura ótima identificada para degradação do naftaleno, o tempo e a taxa de degradação.

A temperatura ótima para degradação do naftaleno é predominantemente superior a 30°C, com máximo de 60 °C para *Aeribacillus pallidus* (Tao *et al.*, 2020). Wang, Z. *et al.* (2019), apesar de aplicar temperatura abaixo de 30 °C, obtiveram em 168 horas a remoção de 99,96% do naftaleno presente na amostra. Em contraponto, Deegan *et al.* (2019) avaliaram uma cepa de *Gordonia* sp. 1D, isoladas de solo contaminado com petróleo, que embora capaz de se estabelecer em temperaturas elevadas – até 50 °C, não foram capazes de degradar nenhum dos HPAs testados, incluindo o naftaleno.

Devido à presença de bactérias de alta temperatura (termofilicas) no solo, os testes de Turkey, Ram e Mishra (2021) indicaram que o aumento de 25 para 37 °C levou a remoção de 3,8 vezes mais naftaleno das amostras, possivelmente devido ao aumento da solubilidade e biodisponibilidade do contaminante. Da mesma forma, o aumento de 30 para 45 °C melhorou em 19,58% a eficiência na remoção do naftaleno (Gou *et al.*, 2023). Por outro lado, Al-Thukair, Malik e Nzila (2020) verificaram que não houve diferença significativa no metabolismo microbiano entre a temperatura ambiente (25 °C) e a condição mesotérmica (37 °C), provavelmente devido à faixa de temperatura ótima para as espécies estudadas.

Assim, tem-se a relação direta entre os microrganismos e sua eficiência na degradação do contaminante, como verificado na Tabela 1, visto que certas espécies alcançam a remoção completa (Al-Dossary; Abood; Al-Saad, 2020; Ravi *et al.*, 2022), enquanto outras apresentam menor capacidade de degradação (Behdarvandan *et al.*, 2020). Deste modo, pode-se selecionar uma espécie alvo a ser utilizada em processos de biorremediação focados em bioaugmentação, visto à alta capacidade destes microrganismos em degradar naftaleno e outros HPAs.

Tabela 1 – Identificação de microrganismos e temperaturas ótimas para degradação de naftaleno

(continua)

Autores	Microrganismos	Temperatura ótima [°C]	Faixa testada [°C]	Tempo	% degradação
Al-Dossary, Abood e Al-Saad (2020)	<i>Aspergillus flavus</i>	30	-	15 dias	100
	<i>A. fumigatus</i>	30	-	16 dias	100
	<i>Brevibacillus brevis</i> (T2C2008)	37	25 e 37°C	-	87
Al-Thukair, Malik e Nzila (2020)	<i>Proteus mirabilis</i> (T2A12001)	37	25 e 37°C		95
	<i>Rhodococcus quinshengi</i> (TA13008)	37	25 e 37°C	18 dias	100
<i>Behdarvandan et al. (2020)</i>	<i>Bacillus Sonorensis e Bacillus sp.</i>	40 (degradação a 25°C)	20, 30 e 40	96 horas	27,14%
<i>Chen et al. (2022)</i>	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> MPDS	23	4, 10, 16, 23, 30 e 37	2 dias	31,1
<i>Delegan et al. (2019)</i>	<i>Gordonia sp. 1D</i>	50	-	-	0
<i>Gou et al. (2024)</i>	Predominância de bactérias do gênero <i>firmicutes</i>	45	15, 30 e 45	250 dias	70,17
<i>Gou et al. (2023)</i>	Bactérias indígenas:				
	Predominantemente <i>Pseudomonas</i> (9.44 %)				
	<i>Pseudonocardia</i> (8.42 %)	45	-	250 dias	70
	<i>Saccharopolyspora</i> (6.99 %)				
<i>Guevara-Luna et al. (2022)</i>	<i>Bacillus</i> (6.02 %)				
	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	65 – 100	-	-
<i>Imperato et al. (2019)</i>	<i>Pseudomonas sp. (VI4.1)</i> e <i>Pseudomonas veronii</i> (VI4T1)	30	-	-	-

(conclusão)

Autores	Microrganismos	Temperatura ótima [°C]	Faixa testada [°C]	Tempo	% degradação
Kesavan, Gousuddin Inamdar e Muthunarayanan (2020)	<i>A. migulans</i> SA1,	35	-	10 dias	>90
	<i>A. migulans</i> SA2	35	-	10 dias	>90
	<i>B. aneurinilyticus</i>	35		40 dias	99,4
Patowary <i>et al.</i> (2022)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SR17	35	25, 30, 35, 40 e 45	5 dias	89,2
Ravi <i>et al.</i> (2022)	<i>Bacillus licheniformis</i> ARMP2	39	10, 29, 27, 37 e 39	24 horas	100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ARMP8	39	10, 29, 27, 37 e 39	25 horas	0
Sonwani <i>et al.</i> (2019)	<i>Bacillus cereus</i>	32,5	20 – 40	8 dias	86,9
Tao <i>et al.</i> (2020)	<i>Aeribacillus pallidus</i>	60	60 – 90	5 dias	84% de 1000 mg/L
	<i>Aeribacillus pallidus</i>	60	60 – 90	5 dias	96% em 200 mg/L
Thimmarayan <i>et al.</i> (2024)	<i>Bacillus</i> sp. GN 3.4	37	28 – 40	-	-
Tirkey, Ram e Mishra (2021)	<i>Pseudomonas</i> sp. SA3	37	25, 30, 37	72 horas	98
	<i>Candida fluvialilis</i> 24p-51				40
Vetrova <i>et al.</i> (2022)	<i>Pseudomonas extremaustralis</i> 7-31	24	6-37	10 dias	35
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 7-43				45
Wang, Z. <i>et al.</i> (2019)	Bactérias <i>Ochrobactrum</i> sp.	25	-	168 horas	99,96
Yang <i>et al.</i> (2020)	-	22	4 e 22	4 semanas	
Zeneli <i>et al.</i> (2019)	-	23	-	80 dias	88,37

Fonte: Autoria própria.

Ainda, pode-se ter a associação de técnicas, como Zeneli *et al.* (2019) que aplicando bioestimulação e bioaumentação verificaram que dentre diversos HPAs, o naftaleno apresentou maior taxa de remoção (88,37%), em temperatura fixa de 23 °C, umidade do solo acima de 30%, com concentração de nutrientes C: N: P na taxa de 120:10:1 (razão molar).

O tempo de aplicação dos testes de degradação do naftaleno não apresenta padrão, alguns autores utilizam horas para avaliação da remoção do contaminante (Ravi *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2019), enquanto outros utilizam semanas (Gou *et al.*, 2023, 2024; Yang *et al.*, 2020; Zeneli *et al.*, 2019), porém observa-se que tempos curtos, em torno de 15 dias predominam.

Quanto à origem dos microrganismos testados, verificou-se que os autores isolaram as espécies de solos contaminados por derramamento de petróleo (Al-Dossary; Abood; Al-Saad, 2020; Gou *et al.*, 2023, 2024; Tao *et al.*, 2020; Thimmarayan *et al.*, 2024; Tirkey; Ram; Mishra, 2021; Vetrova *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020), carvão (Wang *et al.*, 2019) e área industrial (Sonwani *et al.*, 2019), enquanto Guevara-Luna *et al.* (2022) isolaram bactérias de *hot springs* no México.

Com relação à temperatura ótima, diversos estudos testam faixas de temperatura diferentes visando à otimização do crescimento bacteriano. Porém não realizam a avaliação da degradação de naftaleno por microrganismos em sua temperatura ótima, sendo uma lacuna verificada a associação da melhor taxa de crescimento microbiano com a taxa de degradação do contaminante, que ocorre em algumas pesquisas (Behdarvandan *et al.*, 2020; Imperato *et al.*, 2019).

Um fator coadjuvante no processo é o pH do solo, sendo avaliado por alguns estudos para determinação do valor ótimo. Para *Bacillus licheniformis* ARMP2 e *Pseudomonas aeruginosa* ARMP8, o pH ótimo foi de 9 para ARMP2 e 7 para ARMP8 (Ravi *et al.*, 2022). Patowary *et al.* (2022) identificaram que 7,0 é o pH ótimo para degradação do naftaleno pela espécie *Pseudomonas aeruginosa* SR17. Da mesma forma, estudos apontam o pH neutro como ótimo para degradação do naftaleno (Behdarvandan *et al.*, 2020; Kesavan; Gousuddin Inamdar; Muthunarayanan, 2020; Sonwani *et al.*, 2019; Thimmarayan *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2019). Valores de pH ácidos podem reduzir a magnitude da biodegradação do naftaleno (Al-Thukair; Malik; Nzila, 2020), o que pode estar associado a baixa degradação de HPAs em solos tropicais.

Ainda, a variação de temperatura tem influência na atividade enzimática, enzimas de *Pseudomonas putida* ND6 – catecol 1,2-dioxigenase (C12O) e 2,3- dioxigenase (C23O) – que possuem papel chave na degradação de anéis aromáticos, apresentaram atividade máxima em 45 °C e maior temperatura ótima de 50 °C (Li *et al.*, 2018). As enzimas catecol 1,2-dioxigenase

e catecol 2,3- dioxigenase, também relacionadas a degradação de HPAs, apresentaram temperatura ótima foi de 35 °C e 30 °C, respectivamente (Kaur; Kaur; Gupta, 2020). Acima de 45 °C observa-se a redução da atividade enzimática devido a desnaturação das enzimas (Kaur; Kaur; Gupta, 2020; Li *et al.*, 2018). Assim, a degradação dos HPAs está diretamente associada a temperatura, portanto manipular corretamente este fator contribui positivamente para degradação do naftaleno e para o crescimento e desenvolvimento das comunidades microbianas.

3.3 BIOINDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO

O solo possui grande biodiversidade, abrigando organismos que contribuem para processos fundamentais, como a decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, estruturação do solo e biorremediação de contaminantes (Pulleman *et al.*, 2012). Assim, para avaliação da qualidade do solo podem ser empregados bioindicadores, que são organismos ou grupos sensíveis usados para indicar impactos positivos e negativos no ambiente. O organismo é considerado como bioindicador quando segue alguns critérios, como: ser universal na sua distribuição, representar adequadamente uma função do meio e relatar devidamente a perturbação ambiental (Nikinmaa, 2014; Parmar; Rawtani; Agrawal, 2016).

Uma grande diversidade de organismos é aplicada como bioindicadores, podem ser investigados microartrópodes, minhocas, nematóides, plantas, animais (ex. sapos e invertebrados) e microrganismos (Hou *et al.*, 2020; Pulleman *et al.*, 2012). As variações ambientais são verificadas por meio das respostas dos organismos, alterações morfológicas e fisiológicas, variação no número de espécimes ou abundância da espécie na comunidade (Abas, 2021; Hou *et al.*, 2020; Mcgeoch, 1998; Parmar; Rawtani; Agrawal, 2016).

Os efeitos de estresses ambientais na comunidade microbiana podem ser apontadas principalmente por três indicadores: atividade, biomassa e quociente metabólico (qCO_2) (Anderson; Domsch, 2010). Estes bioindicadores se relacionam a transferência de energia e a demanda de carbono no solo, com base na teoria de Odum (1969) que o desenvolvimento em um ecossistema tende a buscar maior eficiência energética para o equilíbrio. A eficiência energética para o desenvolvimento microbiano é explicada pelo qCO_2 , que relaciona a respiração e a biomassa; quando em desenvolvimento as comunidades microbianas têm baixa respiração por unidade de biomassa, já no equilíbrio os incrementos de carbono são equivalentes às saídas (Anderson; Domsch, 2010).

Comunidades em situação de estresse – seja devido ao pH, temperatura, estresse hídrico, falta de nutrientes ou contaminação do solo, apresentam valores elevados do quociente, com menor eficiência energética, pois microrganismos em estresse utilizam as fontes de carbono para manutenção das células, por meio de alta taxa de respiração por biomassa produzida. Em solos com pH ácido verifica-se maiores valores de qCO_2 quando comparado a solos com pH próximos a neutralidade (Anderson; Domsch, 1993). O aumento da temperatura, entre a 0 e 45 °C, contribui para o aumento da respiração basal (Anderson; Domsch, 1986). Ainda, o qCO_2 é sensível à variação do uso do solo, apresentando resultados variados em áreas sob diferentes históricos de culturas (Anderson; Domsch, 1990). Deste modo, o qCO_2 pode ser

aplicado na avaliação do estresse em comunidades microbiana (Anderson; Domsch, 1993; Hou *et al.*, 2020).

Diversos estudos aplicam a relação entre respiração – atividade – e biomassa microbiana para avaliação da qualidade do solo e determinação de alterações ambientais. Em área afetada pelo rompimento da barragem de rejeito de minério de ferro na cidade de Mariana foi observado alto qCO_2 nas áreas margens do rio Carmo, área diretamente afetada pelo derramamento (Couto *et al.*, 2021). Na avaliação do estresse de solos contaminados por poluentes orgânicos são recomendados como indicadores microbiológicos: a biomassa microbiana, a atividade de urease e biomassa de fungos (Sun *et al.*, 2023). Ainda, autores verificaram maiores valores de qCO_2 como resultado da contaminação por biodiesel puro, que tornou o ambiente estressante para os microrganismos (Badzinski *et al.*, 2021). Desta forma, a sensibilidade destes bioindicadores relata as alterações ambientais relacionadas a presença de diversos xenobióticos, o que pode ser associada a verificação de eficiência de processos de biorremediação.

A sensibilidade dos bioindicadores é utilizada em processos de biorremediação de forma a acompanhar a biodegradação e seus impactos na comunidade microbiana do solo. Durante biodegradação de um plástico produzido em laboratório verificou-se que a biomassa e a respiração basal foram positivamente correlacionadas a mineralização, enquanto qCO_2 foi negativamente correlacionado, o que implica em comunidade microbiológica mais estável por meio do consumo do material orgânico (Moreira *et al.*, 2018). No processo de remediação de solo contaminado com HPAs foi identificada associação entre os bioindicadores e a degradação, com a redução da concentração do naftaleno, fenantreno e antraceno, houve redução da atividade microbiana, com tendencia de estabilização (Silva *et al.*, 2009). Na remediação de solos contaminados com petróleo houve o aumento da biomassa microbiana, associada a maior atividade, o que indica a utilização do contaminante como fonte de carbono; porém o qCO_2 apresentou valor mais elevado em comparação ao controle, que seria uma situação de estresse dos microrganismos devido ao contaminante, que apresenta moléculas complexas para degradação, reduzindo a eficiência microbiana (Caravaca; Roldán, 2003). Deste modo, os bioindicadores microbiológicos demonstram os efeitos dos contaminantes e da biodegradação e podem ser associados a efetividade da biorremediação.

Ainda, para avaliar as técnicas de biorremediação podem ser aplicadas combinações de bioindicadores, como a associação de indicadores microbiológicos e de fitotoxicidade. Os ensaios de fitotoxicidade também podem ser aplicados como indicadores da qualidade ambiental, fornecendo informações relacionadas as alterações ambientais, como efeitos da

contaminação biodisponível para os organismos do solo, eficiência da biodegradação e formação de subprodutos com maior toxicidade que o contaminante original (Eom *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2005; Hawrot-Paw *et al.*, 2020; Kwak; Kim; An, 2024). O ensaio de germinação e crescimento é amplamente aplicado em diversos estudos, sendo estes dois estágios sensíveis as condições ambientais e críticas para o desenvolvimentos das plantas (Eom *et al.*, 2007; Gawryluk; Krzyszczak, 2024; Hawrot-Paw *et al.*, 2020; Zarinkamar; Reypour; Soleimanpour, 2013). O ensaio com alface (*Lactuca sativa* L.) é padronizado pela US EPA (1996) e OECD (2003), este é amplamente aplicado para avaliação da toxicidade de áreas e amostras com diferentes contaminantes e níveis de contaminação (Delerue *et al.*, 2019; Silveira *et al.*, 2017).

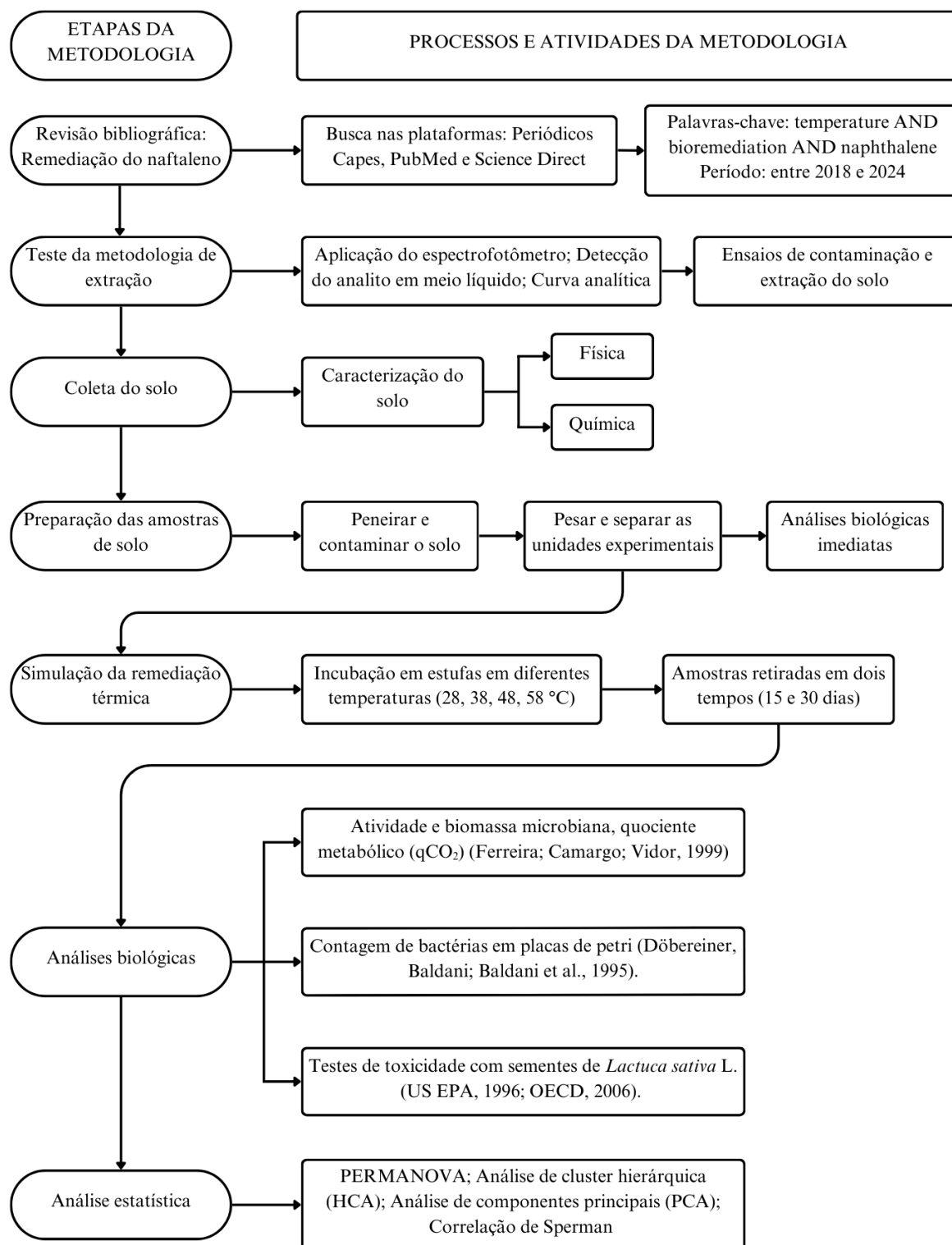
A associação de ensaios de fitotoxicidade com indicadores microbiológicos demonstra os impactos dos contaminantes e os efeitos do processo de remediação de forma mais ampla. Em estudo combinando bioindicadores verificou-se redução na contagem de microrganismos na presença de biodiesel e resposta negativa quanto à germinação e crescimento de raízes em dois ensaios de fitotoxicidade (*Sorghum saccharatum* – Sorgo e *Sinapis alba* – Mostarda Branca), o que demonstra que o biodiesel apresentou toxicidade tanto para os microrganismos como para as plantas testadas (Hawrot-Paw *et al.*, 2020). Ainda, os bioindicadores podem ser aplicados para comparação de técnicas de biorremediação, aplicando organismos dos principais grupos do solo: *Lactuca sativa*, *Eisenia andrei*, microrganismos do solo e *Vibrio fischeri*, García-Carmona *et al.* (2017) concluíram que a técnica das biopilha apresentou melhor remediação dos contaminantes, em comparação a “*landfarming*” e compostagem, bem como melhor performance quanto a toxicidade, associada a maior taxa de respiração microbiana do solo. Em estudo similar, autores verificaram maior taxa de respiração no solo recuperado e nos tratamentos de biorremediação que no controle, bem como maior taxa de germinação; resultados que indicam a redução da biodisponibilidade de metais pesados, pela alteração do pH e conteúdo de matéria orgânica, o que implica em menor toxicidade, maior abundância e atividade da comunidade microbiana (Paniagua-López *et al.*, 2021).

Deste modo, bioindicadores podem ser aplicados na avaliação de processos de biorremediação, contribuindo para compreensão do processo e fornecendo informações sobre os efeitos nos organismos do solo, biodisponibilidade, toxicidade e formação de subprodutos.

4 METODOLOGIA

De forma a analisar o efeito do aquecimento do solo e da contaminação por naftaleno em variáveis microbiológicas e de fitotoxicidade foram realizadas as etapas apresentadas no fluxograma (Figura 3).

Figura 3 – Fluxograma da metodologia com etapas, processos e atividades realizadas



Fonte: Autoria própria.

4.1 AMOSTRAGEM DO SOLO

Amostras de solo foram coletadas seguindo as diretrizes de Santos *et al.* (2015), em área de propriedade da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), nas coordenadas 22°24'19.2"S 45°25'42.5"W, em Itajubá (MG) (Figura 4). A área selecionada apresenta solos classificados como Argissolo Vermelho-Amarelo (equivalente a Acrisols na classificação World Reference Base for Soil Resources – WRB (FAO, 2015)), que é a classe predominante no município de Itajubá (Lima *et al.*, 2021). Estes solos possuem como características diferenciais a presença de um horizonte B textural, com argila de atividade baixa, ou atividade alta desde que conjugada com saturação por bases baixa ou com caráter alumínico (dos Santos *et al.*, 2025).

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos e transportadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos em Qualidade Ambiental (CEQUAM), da UNIFEI, onde foram armazenadas em câmara fria e preparadas para realização do experimento.

Figura 4 – Vista geral da área de estudo, com destaque para o solo e sua cobertura vegetal



Fonte: Autoria própria.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

4.2.1 Caracterização física

Para avaliar as características físicas do solo, determinou-se a textura seguindo a metodologia estabelecida por Teixeira *et al.* (2017). A textura do solo foi analisada por meio de análise granulométrica, utilizando o método da pipeta, em triplicata. As amostras de solo

coletadas foram inicialmente secas ao ar e posteriormente peneiradas para obter terra fina seca ao ar (TFSA).

4.2.2 Caracterização química

A análise química básica do solo foi realizada no Laboratório de Análise de Solos do Instituto Federal do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) – Campus Inconfidentes. Em que foram analisados pH em água; fósforo (P); potássio (K); cálcio (Ca); magnésio (Mg); H+ alumínio (Al acidez potencial); soma das bases (SB); capacidade de troca catiônica (CTC); porcentagem de saturação por bases (%V); porcentagem de saturação por alumínio (%m); relação cálcio/magnésio (Ca/Mg) e relação magnésio/potássio (Mg/K); boro (B); zinco (Zn); ferro (Fe); manganês (Mn); cobre (Cu); matéria orgânica (MO) e fósforo remanescente (Teixeira *et al.*, 2017).

4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO

Como primeiro passo para compreender a aplicação da biorremediação térmica em solos tropicais foram construídos, em laboratório, microcosmos replicando condições de campo (*in-situ*). Os tratamentos foram combinações de dois fatores: a variação de temperatura (28, 38, 48 e 58 °C) e contaminação do solo – em diferentes concentrações (0, 50, 100, 250 e 500 mg/kg de naftaleno); os experimentos foram realizados com três repetições, aleatoriamente distribuídas.

As amostras de solo foram peneiradas em peneira de 2 mm. Todo material foi pesado e contaminado, sendo este processo realizado por meio da mistura do Naftaleno (NAP – C₁₀H₈) em sua forma sólida, em pó (conforme resultados apresentados no Apêndice A), com o solo. Posteriormente 100 g de solo contaminado foram separados em cada microcosmo montado em copos plásticos higienizados com álcool 70% e expostos a luz ultravioleta, as unidades amostrais foram tampadas utilizando plástico filme, com objetivo de reduzir a perda de umidade (Figura 5).

Figura 5 – Unidades amostrais do experimento



Fonte: Autoria própria.

Os recipientes contendo as amostras já contaminadas foram levados para estufas com temperaturas controladas de 28, 38, 48 e 58 °C, de forma a simular a biorremediação térmica. A umidade das amostras foi mantida em 60% da capacidade de retenção de água, por meio de manutenção de massa de água.

Figura 6 – Amostras na estufa – simulação da biorremediação térmica



Fonte: Autoria própria.

4.4 ANÁLISES BIOLÓGICAS

As análises microbiológicas realizadas consistiram em atividade e biomassa microbiana e quociente metabólico – ou taxa de respiração específica (qCO_2). As metodologias descritas por Anderson (1982), Ferreira, Camargo e Vidor (1999) e Anderson e Domsch (1993) foram empregadas para realizar as análises citadas. Em complemento foi realizada a contagem de bactérias totais em placas de petri, por meio da adaptação de metodologias descritas por Döbereiner, Baldani e Baldani et al. (1995), Melloni *et al.* (2004) e Wollum II (1982).

Ainda, para avaliar a efetividade da biorremediação térmica foi avaliada a toxicidade do solo por meio do crescimento radicular de sementes de alface (*Lactuca sativa*) empregando a metodologia recomendada por US EPA (1996) e OECD (2006). Todas as análises biológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do CEQUAM.

Após a contaminação e preparação das amostras foram aplicadas as análises microbiológicas e de fitotoxicidade, de forma a verificar os efeitos das doses do contaminante, imediatamente após a contaminação. Já para compreender como a biorremediação térmica influencia a comunidade microbiana e a fitotoxicidade, o aquecimento do solo foi um fator aplicado durante 15 e 30 dias, períodos em que as amostras foram mantidas em estufas. Após estes períodos de simulação da biorremediação térmica, houve também a determinação das análises microbiológicas e de fitotoxicidade, para observar a possível existência de tendência de comportamento das variáveis biológicas ao longo do tempo.

4.4.1 Atividade microbiana, biomassa e quociente metabólico

Para determinar a atividade e biomassa microbiana e quociente metabólico, foi utilizado o método de irradiação-incubação, proposto por Ferreira, Camargo e Vidor (1999). Para isso, 40 g de solo foram irradiadas utilizando forno de micro-ondas, de modo a eliminar os microrganismos por meio de irradiação eletromagnética, com inoculação de 2 g de amostra de solo não esterilizado. Em outro frasco, 40 g de solo não foram irradiados. Todas as amostras, bem como o branco, foram incubadas por 10 dias a 28 °C, sem luz, de modo a prevenir o crescimento de algas.

A atividade microbiana foi determinada por titulação com HCl 1mol/L, pelas amostras não irradiadas, cujo CO₂ capturado por solução de NaOH 1 mol/L, após adição do BaCl₂ e fenolftaleína (Anderson, 1982). O carbono da biomassa microbiana foi quantificado pela diferença de carbono liberado entre amostras irradiadas e não irradiadas (Ferreira; Camargo; Vidor, 1999). Assim, foi calculado o qCO₂, sendo a razão da atividade e biomassa microbiana (Anderson; Domsch, 1993).

4.4.2 Contagem de bactérias totais em placas

Para contagem de microrganismos em placas 10 g de solo foram diluídos em 90 ml de solução salina (0,9%). A amostra foi agitada a 100-150 rpm por aproximadamente 20 minutos. Diluições sucessivas foram realizadas a partir da diluição inicial 10⁻¹ (1 mL da amostra: 9 mL

NaCl 0,9%) até 10^{-4} . O inóculo de 0,05 mL da diluição 10^{-4} (verificada como a melhor diluição para contagem) foi espalhado com alça de Drigalski em placas de Petri, de 6 cm de diâmetro, que continham meio *Plate Count Agar* (PCA) – específico para crescimento e contagem de bactérias, com quatro repetições (Döbereiner, Baldani e Baldani et al., 1995; Melloni *et al.*, 2004; Wollum II, 1982). Utilizou-se 0,05 mL da amostra diluída visto que foram utilizadas placas pequenas, devido ao número de repetições realizadas (80 amostras). As culturas foram incubadas durante 3 dias a 28 °C, avaliando-se, posteriormente, o crescimento bacteriano.

Figura 7 – Placas de petri inoculadas em incubação para contagem de microrganismos



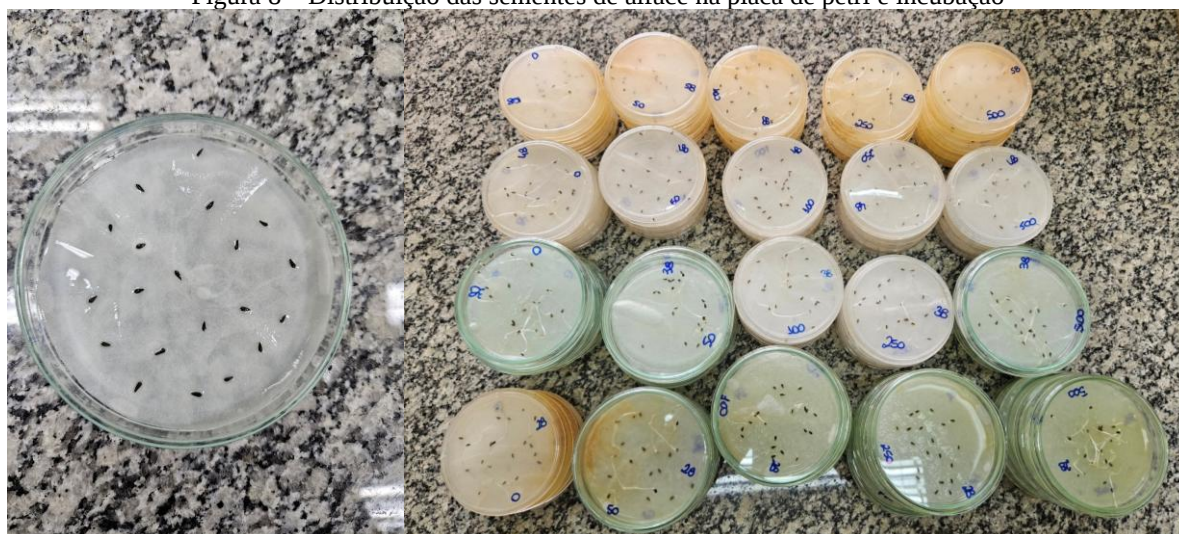
Fonte: Autoria própria.

A determinação do número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) é realizada a partir da multiplicação do número de colônias presentes na placa de Petri pelo fator de diluição correspondente (no caso 10^{-4}) e pelo volume da amostra (Döbereiner, Baldani e Baldani et al., 1995).

4.4.3 Teste de fitotoxicidade

Para avaliar a germinação e comprimento radicular de sementes de alface foram aplicadas as metodologias descritas em US EPA (1996) e OECD (2006). Ao todo, 20 sementes de *Lactuca sativa* L. foram dispostas em placas de Petri com papel filtro – para possibilitar a aderência das sementes, e foi adicionado 5 ml de extrato do solo. O extrato foi obtido usando proporção solo: água de 1:5 com agitação por 24 horas e separados por centrifugação, durante 30 min. As placas foram incubadas em 25 ± 1 °C, durante 120 h.

Figura 8 – Distribuição das sementes de alface na placa de petri e incubação



Fonte: Autoria própria.

Após o período de incubação, o número de sementes germinadas e os comprimentos radiculares (Figura 9) foram avaliados. Os resultados são apresentados em termo da relação entre o comprimento medido de cada amostra e o controle.

Figura 9 – Sementes de *Lactuca sativa* L. germinadas sobre papel milimetrado



Fonte: Autoria própria.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk, todavia visto que os dados não cumpriram o pressuposto de distribuição normal foi aplicada a PERMANOVA (*Permutational Multivariate Analysis of Variance*), versão não-paramétrica do teste multivariado de análise de variâncias (Anderson, 2017). Para compreender a distribuição dos tratamentos foram estimadas e avaliadas análises multivariadas exploratórias: análise de cluster hierárquica (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*), obtida pelo método de Ligação média entre grupo (UPGMA), com critério de corte de Mojena; e análise de componentes principais (PCA

– *Principal component analysis*). A correlação de Spearman e o teste de Mantel foram empregados para analisar as variáveis e comparar seu comportamento ao longo do tempo, de forma a verificar se houve alteração estatisticamente significativa das variáveis resposta entre 0, 15 e 30 dias. Todas as análises foram realizadas com 95% de nível de confiança utilizando o software R Studio 2024.12.0 Build 467 (pacotes: *vegan*, *MultivariateAnalysis*, *ggplot2*, *RColorBrewer*, *pheatmap*, *dplyr*, *tidyverse*, *factoextra*, *FactoMineR*, *stats* e *corrplot*) (R Core Team, 2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SOLO

Os resultados das análises físico-química do solo (Tabela 2) indicam que este é um solo de textura argilosa – com alto teor de argila, ácido devido ao seu baixo pH em água (5,04), com alta acidez potencial dada pelo valor elevado de H+Al (8,28), baixa saturação por bases (SB) e apesar de ser um horizonte A, este apresenta matéria orgânica considerada baixa (1,45 dag/dm³). Este, ainda é caracterizado como um solo de baixa fertilidade, com baixa concentração de cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Em contraste, os macronutrientes do solo apresentam níveis satisfatórios, enquanto os micronutrientes possuem variações, com níveis adequados.

Tabela 2 – Resultados da análise físico-química do solo

Parâmetro	Unidade	Resultado
Argila	%	47,00
Silte	%	11,64
Areia	%	41,36
Matéria Orgânica	dag/dm ³	1,45
pH	-	5,04
P	mg/dm ³	32,6
K	mg/dm ³	233,6
Ca	Cmol/dm ³	0,4
Mg	Cmol/dm ³	0,17
Al	Cmol/dm ³	0,9
H+Al	Cmol/dm ³	8,28
SB	Cmol/dm ³	1,2
Ca/Mg		2,49
Mg/K		0,29
V	%	12,66
m	%	42,86
T	Cmol/dm ³	9,48
Zn	mg/dm ³	2,3
Fe	mg/dm ³	66,9
Mn	mg/dm ³	14,2
Cu	mg/dm ³	1,6
B	mg/dm ³	0,2
S	mg/dm ³	--

Onde: soma de bases (SB), acidez potencial (H+Al), alumínio extraível (Al), Capacidade de Troca Catiônica total (T), saturação por bases (V%), saturação por alumínio (m%), matéria orgânica (MO), fósforo remanescente (P rem).

Fonte: Autoria própria.

Neste contexto, o solo utilizado simula uma situação de significativo estresse ambiental, com características de Argissolos e Cambissolos, classes predominantes na região

estudada (Lima *et al.*, 2021). Ainda, a área em que o solo foi coletado não é de uso agrícola, portanto não passou por manejo e correções, o que justifica a alta acidez, baixa SB e presença significativa de alumínio trocável. Desta forma, os resultados químicos demonstram que este solo apresenta vulnerabilidade frente a contaminação com HPAs, e outros contaminantes, com risco de mobilidade e menor potencial de degradação. Assim, a utilização deste solo no estudo simula, de forma real, uma situação de contaminação em um solo típico de região tropical.

5.2 ANÁLISES BIOLÓGICAS

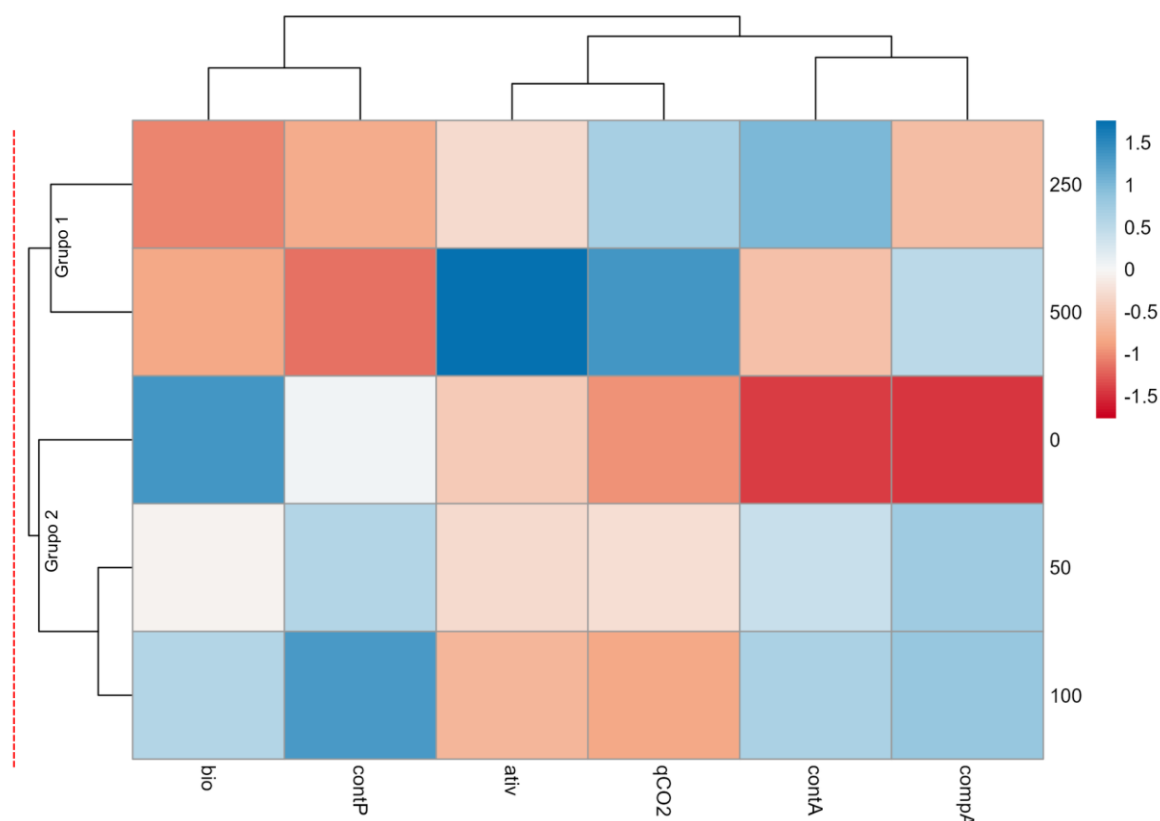
Os fatores estudados (temperatura e concentração) implicaram em alterações na microbiota e na fitotoxicidade. Estas alterações foram definidas por meio da categorização hierárquica (HCA) das variáveis, associada à análise de componentes principais (PCA) e à matriz de correlação. Foi observada a relação entre as análises estatísticas aplicadas, de modo que os resultados de HCA e a correlação se associam às informações da PCA; desta forma, todos os resultados foram apresentados, com ampla discussão da PCA, que abrange informações dos *clusters* e da correlação. Ainda, as análises de *cluster* apresentadas no estudo abrangem os agrupamentos dos tratamentos e indicam por meio de um mapa de calor o valor normalizado das variáveis, o que possibilita compreender quais as similaridades entre os *clusters* formados.

A contaminação do solo resulta em efeitos imediatos e a longo prazo, assim buscou-se verificar a influência imediata da contaminação por naftaleno nas variáveis microbiológicas e de fitotoxicidade em um solo tropical. Para verificar o efeito das doses imediatamente após a contaminação foi realizado o teste PERMANOVA (Tabela 3). Com relação ao efeito imediato do contaminante foi identificado que as doses do naftaleno resultaram em diferenças estatisticamente significativas, de forma multivariada, nas variáveis dependentes ($p = 0,001$), ou seja, o aumento da concentração imediatamente após a contaminação causa alterações na microbiota e na fitotoxicidade – relacionada à germinação e comprimento de raízes de sementes de alface. Enfatiza-se que a metodologia utilizada para algumas das variáveis microbiológicas (atividade, biomassa e qCO_2) possui tempo de incubação do solo de 10 dias, portanto para estas variáveis o tempo 0, imediatamente após a contaminação, inclui o período de incubação do solo, dado que a metodologia não reporta de forma instantânea estes parâmetros.

Para o tempo 0, no dendrograma verifica-se apenas um grupo pelo critério de corte de Mojena, porém existem dois agrupamentos com separação marcante: grupo 1 com altas concentrações (250 e 500 mg/kg) e grupo 2 com as concentrações mais brandas (0, 50 e 100 mg/kg de naftaleno) (Figura 10). O grupo 1, de concentrações mais elevadas, apresentou menor

contagem em placas e menor biomassa, associado a maiores valores de atividade microbiana e qCO_2 , o que indica maior estresse e menor desenvolvimento da comunidade microbiana. O grupo 2 se associou devido aos valores mais altos relacionados ao crescimento microbiano (bio e cont), com baixos valores de atividade e qCO_2 .

Figura 10 – Análise Hierárquica de Clusters (HCA) dos dados da contaminação imediata e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO_2) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface



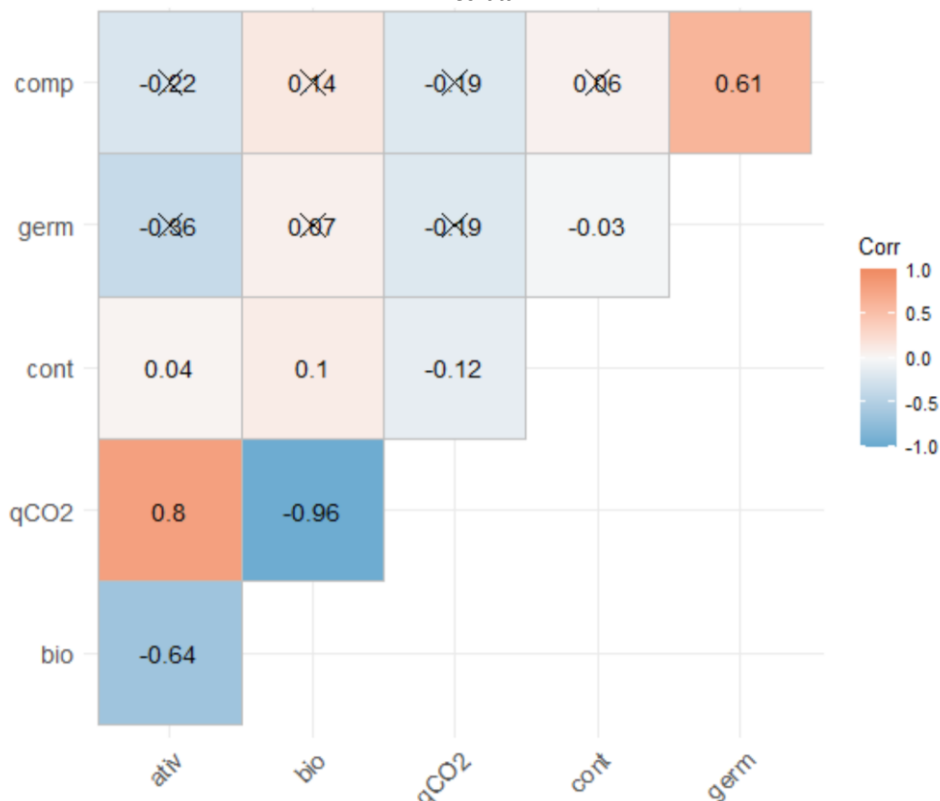
A linha vermelha indica critério de corte de Mojena para o dendrograma

Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO_2 : Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (L. sativa); comp: comprimento da raiz de alface (L. sativa).

Fonte: Autoria própria.

Quanto à análise de correlação (Figura 11), imediatamente após a contaminação se tem correlação forte entre atividade e qCO_2 (0,8), correlação negativa forte entre bio e qCO_2 (- 0,96) e correlação moderada de 0,61 para as variáveis de fitotoxicidade (comp e germ). As correlações microbiológicas demonstram que atividade e qCO_2 se relacionam positivamente, enquanto a biomassa se relaciona negativamente a ambos, o que indica que o aumento de atividade e qCO_2 indicam maior estresse e relacionam com menor crescimento microbiano.

Figura 11 – Matriz de correlação de Spearman relacionando os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface – para os dados da contaminação imediata



Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (*L. sativa*); comp: comprimento da raiz de alface (*L. sativa*).

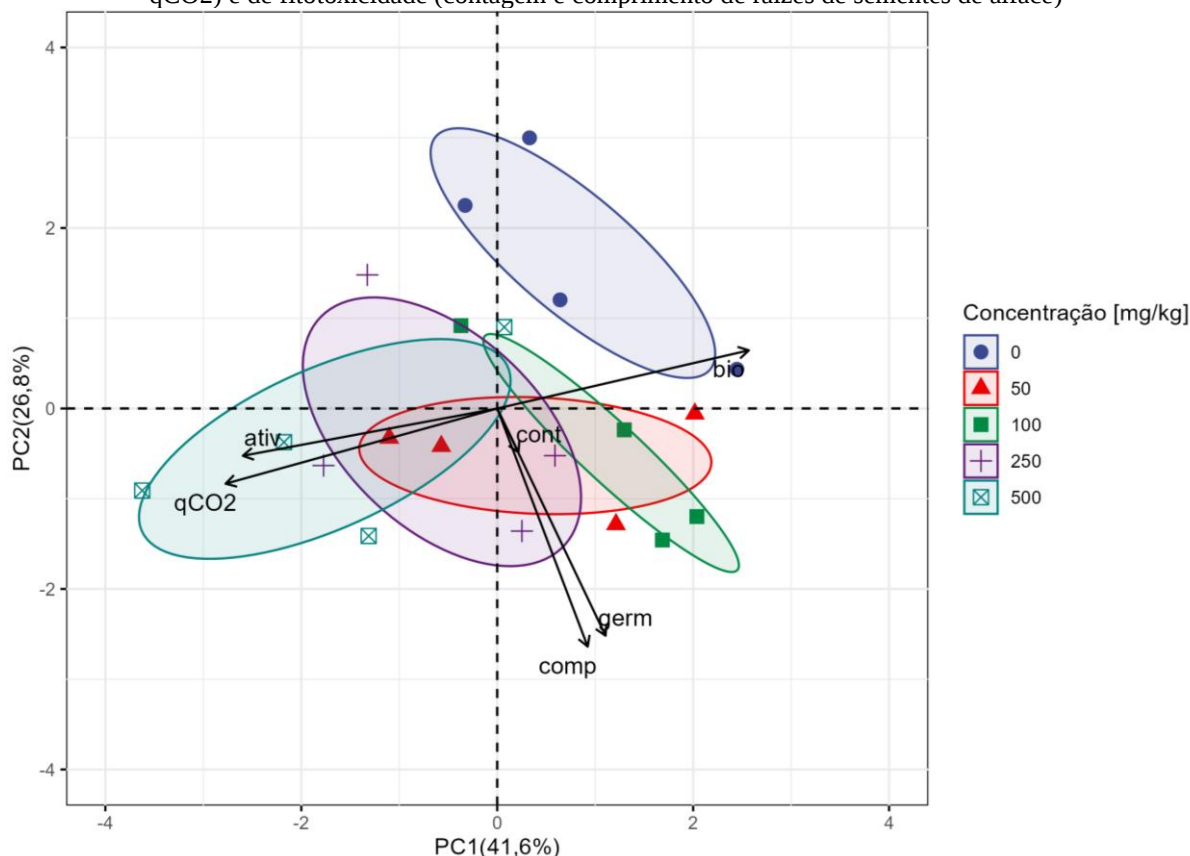
Fonte: Autoria própria.

O estudo dos efeitos imediatos da contaminação em microrganismos do solo pode ser complexo devido às alterações e relações das variáveis ambientais relacionadas a dinâmica do contaminante no solo. De forma a verificar os efeitos da contaminação no tempo 0 no solo, aplicou-se a PCA às variáveis de estudo. Na análise de componentes principais para os efeitos imediatos da contaminação do solo houve explicação de 68,4% dos dados pelos 2 primeiros componentes, com participação de 41,6% do CP1 e 26,8% do CP2 (Figura 12). O componente principal 1 se relacionou às variáveis biológicas (biomassa, atividade e quociente metabólico) e o CP2, apresentou maior relação com as variáveis relacionadas a fitotoxicidade (germinação e o comprimento de raízes de sementes de alface). O aumento da concentração implicou em maiores valores de atividade e qCO₂, o que indica maior estresse da comunidade microbiana, enquanto as menores concentrações (0, 50 e 100 mg/kg) se posicionam no primeiro e segundo quadrante, com maiores valores de biomassa, o que demonstra maior crescimento microbiano, sem prejuízos relacionados à comunidade microbiana.

No segundo quadrante verifica-se que as concentrações de 50 e 100 mg/kg apresentaram valores relacionados à menor fitotoxicidade das amostras, com maior germinação

e comprimento de alface. Quanto às variáveis de fitotoxicidade, estas são inversamente proporcionais à fitotoxicidade, ou seja, altos valores de germinação e comprimento de raízes de sementes de alface indicam baixos valores de fitotoxicidade e vice-versa.

Figura 12 – Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados da contaminação imediata, considera 5 níveis de concentração de naftaleno e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e de fitotoxicidade (contagem e comprimento de raízes de sementes de alface)



Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (L. sativa); comp: comprimento da raiz de alface (L. sativa).

Fonte: Autoria própria.

As análises realizadas imediatamente após a contaminação demonstram variações do comportamento microbiano e da fitotoxicidade, conforme as doses do contaminante. Os diferentes comportamentos estão associados ao agrupamento e correlações das variáveis microbiológicas relacionadas ao desenvolvimento microbiano (biomassa microbiana e contagem de bactérias em placas), de variáveis de estresse ambiental (atividade microbiana e qCO₂) e de fitotoxicidade (germinação e comprimento de raízes de sementes de alface). Os efeitos imediatos da contaminação por naftaleno incluem o maior estresse microbiano e maior fitotoxicidade das amostras.

A análise multivariada demonstra o aumento do estresse microbiano como resultado do aumento das doses de naftaleno. Estudos apontam que o aumento da concentração de HPAs

(Badzinski *et al.*, 2021; Łyszczarz; Lasota; Błońska, 2022; Zhang *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018), combustíveis fósseis (Badzinski *et al.*, 2021) e agrotóxicos (Wołejko *et al.*, 2020) também resulta em alterações na comunidade microbiana. O estresse da microbiota do solo frente às diferentes concentrações é indicado principalmente pelo qCO_2 , que é inversamente proporcional a biomassa e demonstra como a comunidade se encontra em questão de eficiência energética (Anderson; Domsch, 2010). A partir destes resultados é possível definir limites de contaminação com menores impactos na microbiota.

Além da concentração do contaminante, a temperatura é um fator que interage em processos microbiológicos de degradação, portanto ambos os fatores influenciam na eficiência da biorremediação térmica e possuem efeitos diversos nas variáveis de estudo. De forma a avaliar a interação entre as doses de naftaleno e a temperatura e o efeito isolado destes fatores nas variáveis foi aplicada a PERMANOVA (Tabela 3). A análise demonstrou que após 15 dias de contaminação, houve interação entre temperatura e concentração, o que indica o efeito multivariado da combinação dos fatores. Ainda, a temperatura de forma isolada apresentou efeito estatisticamente significativo, enquanto a concentração não apresentou efeito significativo de forma isolada, os mesmos efeitos foram verificados após 30 dias de contaminação. Desta forma, a existência de interação entre os fatores para 15 e 30 dias de contaminação demonstra que a eficiência da biorremediação térmica depende tanto da temperatura aplicada quanto da concentração do contaminante.

Tabela 3 – Teste PERMANOVA para os fatores experimentais após 15 e 30 dias de contaminação

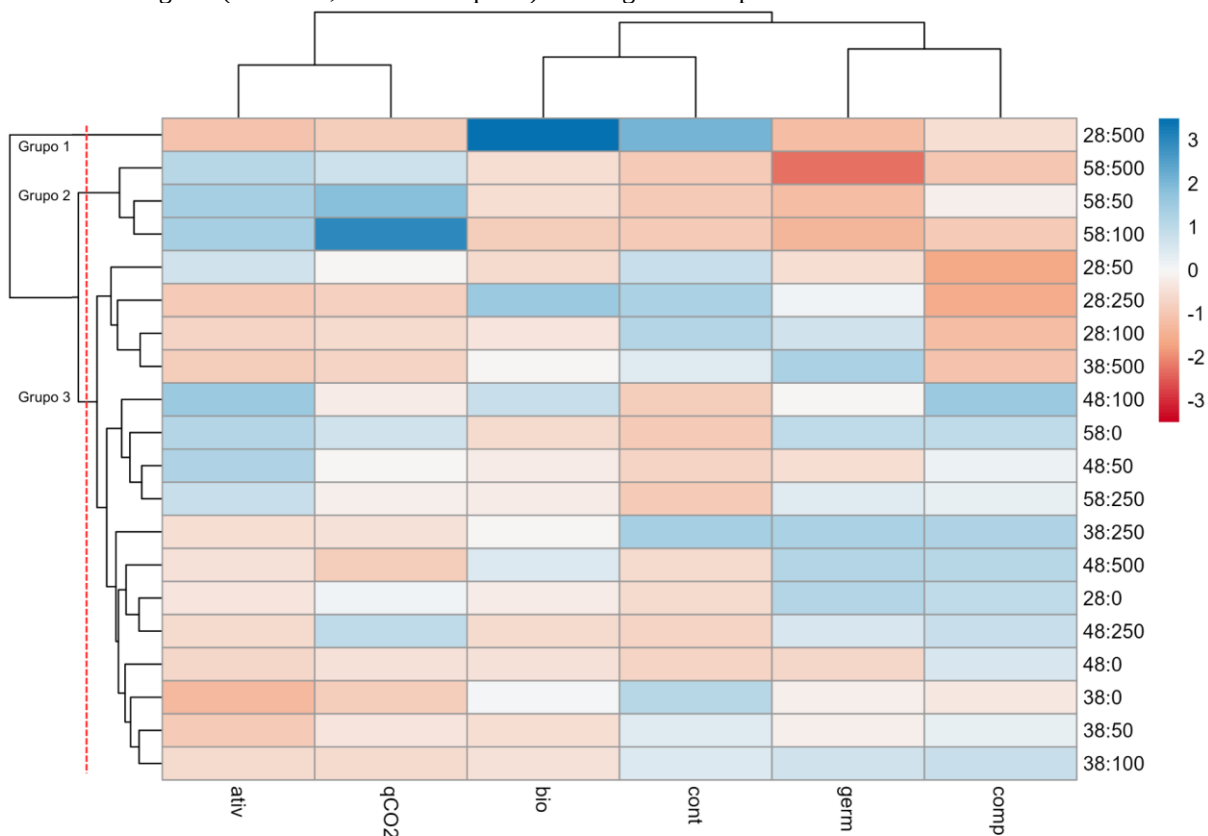
Tempo (dias)	Valores de significância		
	Interação	Temperatura	Concentração
15	0,001*	0,001*	0,078
30	0,001*	0,001*	0,1

* Asterisco indica diferença estatisticamente significativa nos valores de p em níveis de confiança de 95%
Fonte: Autoria própria.

Após 15 dias de contaminação, a classificação hierárquica conforme critério de corte de Mojena apresentou a divisão em três grupos (Figura 13): grupo 1, separação do tratamento de 28 °C e 500 mg/kg (28:500), grupo 2 composto por três concentrações (50, 100 e 500 mg/kg) da temperatura mais elevada (58°C), os demais tratamentos formam o terceiro grupo. O grupo 1, tratamento 28:500, foi separado por apresentar maiores valores de biomassa e contagem em placas e menores valores de atividade e qCO_2 , com baixos valores das variáveis de fitotoxicidade, o que caracteriza o tratamento para alto estímulo microbiano. O grupo 2 foi

caracterizado por maior estresse microbiano e alta fitotoxicidade, enquanto o terceiro grupo apresenta maior variação.

Figura 13 – Dendrograma dos dados após 15 dias de contaminação e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface



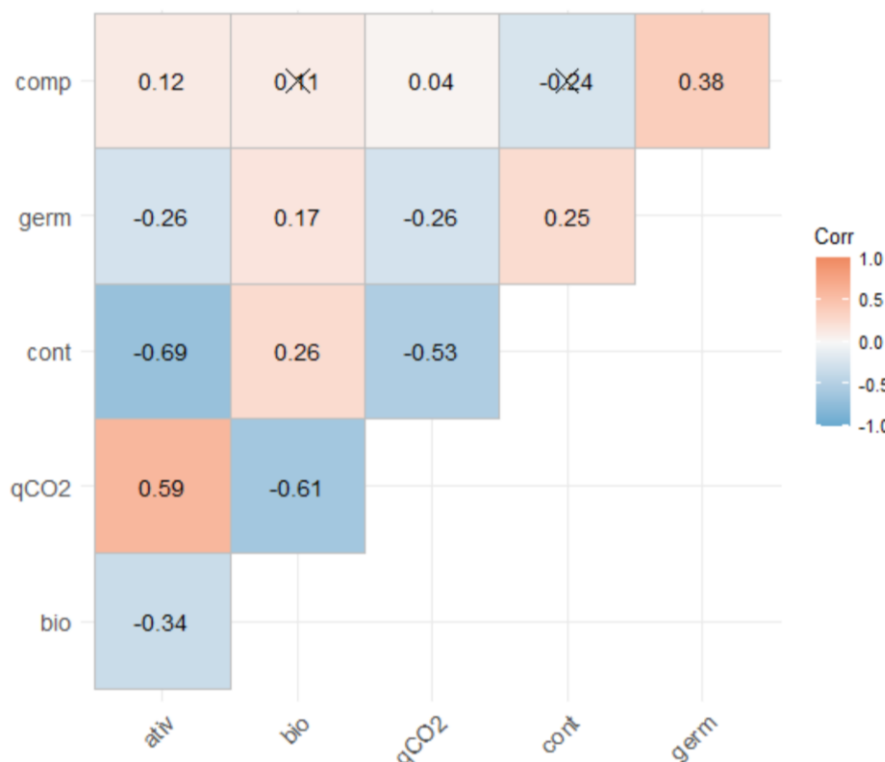
A linha vermelha indica critério de corte de Mojena para o dendrograma

Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (*L. sativa*); comp: comprimento da raiz de alface (*L. sativa*).

Fonte: Autoria própria.

Conforme a análise de *cluster* as variáveis estudadas formaram três grupos principais: um relacionado ao crescimento microbiano, outro relacionado ao estresse microbiano, e por fim um grupo relacionado a fitotoxicidade (Figura 13). Como comentado sobre a associação das análises estatísticas, os resultados de HCA se relacionam com a correlação de Spearman (Figura 14); após 15 dias de contaminação as correlações demonstram relação negativa entre atividade e contagem em placas (- 0,69), bem como entre contagem e o qCO₂ (- 0,53), enquanto a relação é positiva entre a biomassa e a contagem (0, 26), o que indica relação negativa entre as variáveis de desenvolvimento microbiano e atividade e qCO₂, relacionadas ao estresse microbiano.

Figura 14 – Matriz de correlação de Spearman relacionando os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface após 15 dias de contaminação do solo

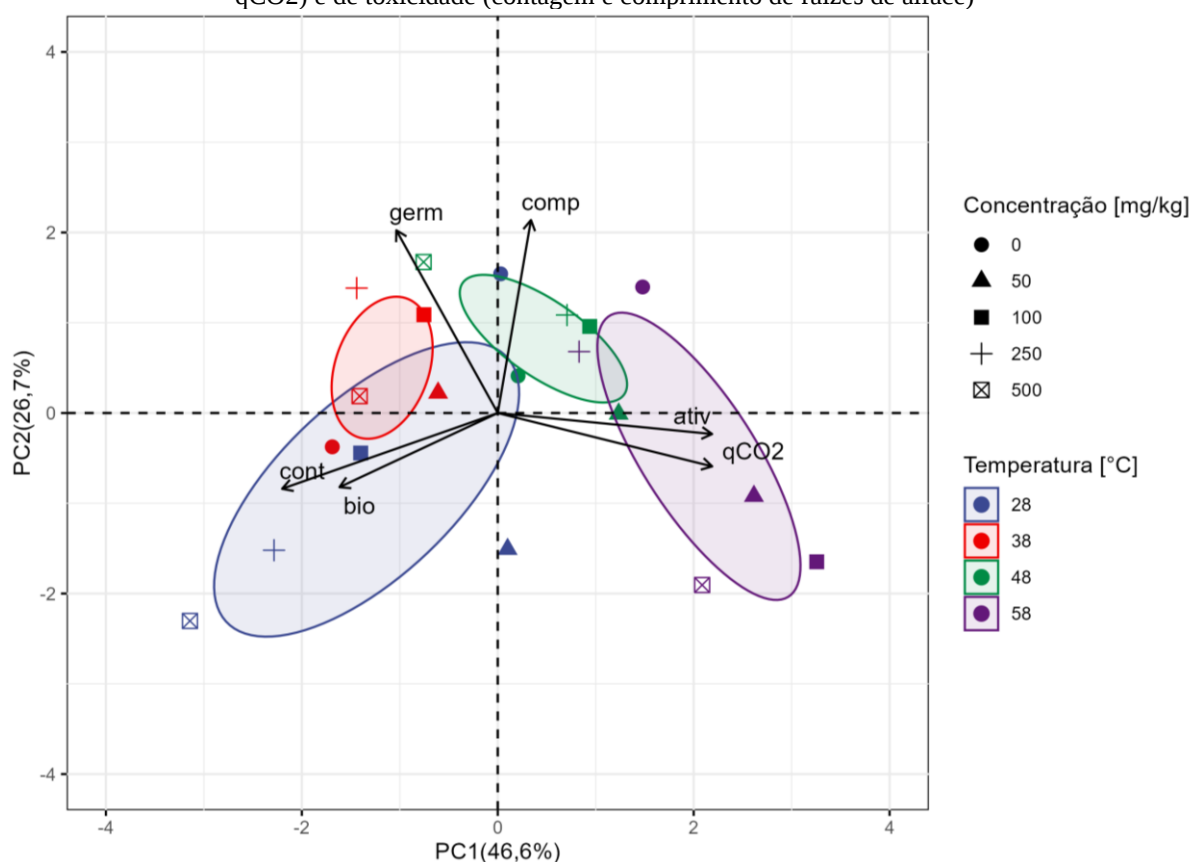


Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (*L. sativa*); comp: comprimento da raiz de alface (*L. sativa*).

Fonte: Autoria própria.

Na biorremediação térmica, a associação entre temperatura e concentração implicou em efeitos diferentes sobre os microrganismos do solo, o que pôde ser avaliado por bioindicadores microbiológicos e de fitotoxicidade. De forma a compreender a interação entre os fatores, temperatura e concentração, foi aplicada a PCA. Ao conduzir esta análise, verifica-se a explicação das variáveis microbiológicas pela CP1 e variáveis de fitotoxicidade associadas a CP2 (o que segue o mesmo padrão observado de forma imediata após a contaminação) (Figura 15). No CP1 houve maiores valores relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das comunidades microbianas no sentido de menores temperaturas (28 e 38°C), com menor impacto nas comunidades microbianas em altas concentrações do contaminante. Para as temperaturas de 48 e 58°C houve menores valores de bio e cont e maiores valores de atividade microbiana e qCO₂, o que indica que nestas temperaturas as comunidades microbianas apresentaram maior estresse ambiental, com menor estresse para o tratamento de 48 °C e 500 mg/kg. As temperaturas entre 28 e 38 °C influenciaram positivamente no crescimento e desenvolvimento das comunidades microbianas com menor estresse, o que pode ser benéfico na biorremediação térmica.

Figura 15 – Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados após 15 dias de contaminação, considera 5 níveis de concentração de naftaleno e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e de toxicidade (contagem e comprimento de raízes de alface)



Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (*L. sativa*); comp: comprimento da raiz de alface (*L. sativa*).

Fonte: Autoria própria.

Os fatores – temperatura e concentração de naftaleno interagiram de forma complexa sobre as variáveis. A temperatura influenciou principalmente o estresse e crescimento microbiano; a concentração apresentou maior variabilidade de respostas para todas as variáveis. A contagem de bactérias em placas e a biomassa tem significado associado ao crescimento e reprodução dos microrganismos (Badzinski *et al.*, 2021), possuem dependência de uma faixa de temperatura ótima (Behdarvandan *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2018; Ravi *et al.*, 2022) e geralmente aumentam em menores concentrações de contaminantes (Zhao *et al.*, 2023); enquanto atividade microbiana e qCO₂ se associam demonstrando o estresse causado pelos tratamentos (Anderson; Domsch, 2010). O efeito da temperatura na biomassa e respiração microbiana foi verificado em estudos anteriores (Anderson; Domsch, 1986; Pietikäinen; Pettersson; Bååth, 2005; Yamazaki *et al.*, 2020) e influencia, sobretudo, a eficiência da biorremediação (Kaur; Krol; Brar, 2021). A concentração dos contaminantes também é um fator associado à variabilidade de resposta microbiológica, que pode ser nocivo (Couto *et al.*, 2021;

Łyszczarz *et al.*, 2021) ou um estímulo (Lamy *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2018). Assim, na avaliação da biorremediação térmica ambos os fatores devem ser considerados; ainda novos estudos podem quantificar a degradação do contaminante, que além de biodegradado sofre influência da temperatura, com alterações de suas características físico-químicas, como volatilidade e biodisponibilidade.

As alterações apresentadas nas variáveis microbiológicas relacionadas às mudanças de temperatura e concentração podem influenciar à biorremediação do contaminante. A temperatura é um fator que contribui diretamente para biodegradação, na literatura verifica-se a influência da temperatura na biorremediação de contaminantes como HPAs (Ali *et al.*, 2023; Rabani *et al.*, 2022), metais pesados (Heidari; Panico, 2020; Palanivel *et al.*, 2020) e BTEX (Kaur *et al.*, 2023). Como avaliado pela PCA, foram observados nos tratamentos as seguintes tendências: em 28 e 38°C maior biomassa e contagem em placas, com menor atividade e qCO₂; para maiores temperaturas (48 e 58°C) comportamento contrário. Esta tendência indica a relação entre as variáveis microbiológicas e a biorremediação de contaminantes. A redução da atividade microbiana pode ser associada à redução de HPAs (Silva *et al.*, 2009), estudo aponta correlação negativa entre qCO₂ e mineralização de composto plástico (Moreira *et al.*, 2018), a biomassa microbiana é indicada como variável com maior associação a degradação de compostos de petróleo (Onwosi *et al.*, 2020) e a mineralização de metais pesados (Dovletyarova *et al.*, 2024). Ainda, a atividade enzimática e caracterização da comunidade microbiana podem ser correlacionadas à degradação de metais pesados (Dovletyarova *et al.*, 2024; Lee; Oh; Kim, 2008), do mesmo modo existe correlação forte entre o crescimento microbiano e a degradação de BTEX (Kaur *et al.*, 2023). Estas relações entre as variáveis demonstram que os microrganismos são capazes de utilizar o contaminante como fonte de energia, o que contribui para o crescimento, reprodução e maior estabilidade das comunidades microbianas. Assim, futuros estudos podem aplicar estes bioindicadores na avaliação dos efeitos da contaminação e da eficiência da remoção de naftaleno e de outros HPAs, além de avaliar casos de co-contaminação.

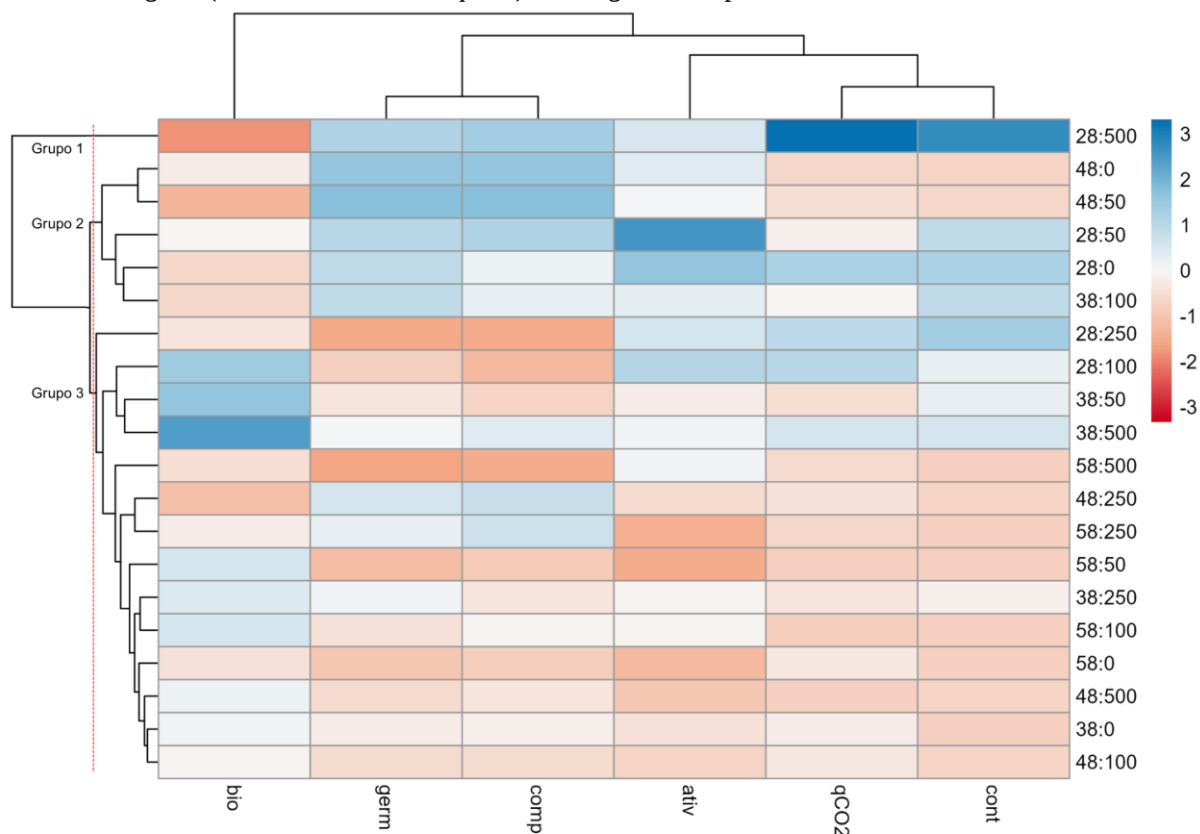
Para o segundo componente principal foram verificadas informações quanto a fitotoxicidade – relacionada à germinação e comprimento de raízes de sementes de alface, se tem indício que a aplicação da temperatura resultou na redução da fitotoxicidade, com a maior associação de tratamentos de 38 e 48 °C no sentido positivo do CP2, o que indica menor fitotoxicidade, dada a razão inversa entre as variáveis germinação de sementes de alface (germ) e comprimento de raízes de alface (comp) e a fitotoxicidade. Alguns tratamentos com diferentes concentrações variaram deste padrão como 0 mg/kg a 38 °C que se apresenta negativamente

posicionado no CP2, ainda 0 e 250 mg/kg de 58 °C possuem valores positivos no CP2, o que indica que estes tratamentos possuem menor fitotoxicidade, ou seja, maiores valores de germinação e comprimento de alface.

As variáveis de fitotoxicidade utilizadas apresentaram relações variadas aos tratamentos de temperaturas e concentrações. Conforme a PCA, tratamentos com melhor desempenho microbiana possuem maior fitotoxicidade – que pode ser relacionada a formação de subprodutos mais tóxicos que a contaminação original, resultado também encontrado por outros autores (Chibwe *et al.*, 2015; Zeng *et al.*, 2021, 2023) e divergente a outras investigações (Aswani *et al.*, 2025; Urionabarrenetxea *et al.*, 2021). Para confirmação dos resultados de fitotoxicidade seria adequado para futuros estudos a aplicação de mais de uma espécie indicadora. De forma geral, a ausência de naftaleno (0 mg/kg) implicou em melhor performance quanto a fitotoxicidade, o que indica que a presença do contaminante tende a contribuir para um aumento de toxicidade (Hawrot-Paw *et al.*, 2020; Kwak; Kim; An, 2024), com ressalvas para tratamento com concentrações mais elevadas, como 48:500 e 38:250 que apresentam valores das variáveis de toxicidade próximos a ausência do contaminante.

O comportamento da fitotoxicidade e da microbiota do solo pode apresentar variações em virtude da presença de contaminantes ao longo do tempo. De forma a verificar o comportamento das variáveis ambientais foram repetidos os ensaios biológicos após 30 dias de contaminação. A análise de *cluster* conforme o critério de Mojena, para os dados após este período de contaminação, apresentou a formação de 3 grupos (Figura 16): o grupo 1 apenas com o tratamento 28:500, grupo 2 contendo 48:0, 48:50, 28:50, 28:0 e 38:100, enquanto o terceiro grupo engloba os demais tratamentos. Neste tempo o tratamento 28:500 apresentou baixos valores para biomassa, com altos valores para as demais variáveis, o que indica que este tratamento passou por grande estresse com o passar do tempo. O segundo agrupamento se caracterizou principalmente por altos valores das variáveis relacionadas a toxicidade e baixa biomassa, com diferentes valores para variáveis relacionadas ao estresse microbiano, portanto neste grupo tem-se menor crescimento bacteriano com baixa toxicidade. Por fim, o terceiro grupo possui maior variação entre as variáveis respostas observadas.

Figura 16 – Dendrograma dos dados após 30 dias de contaminação e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface



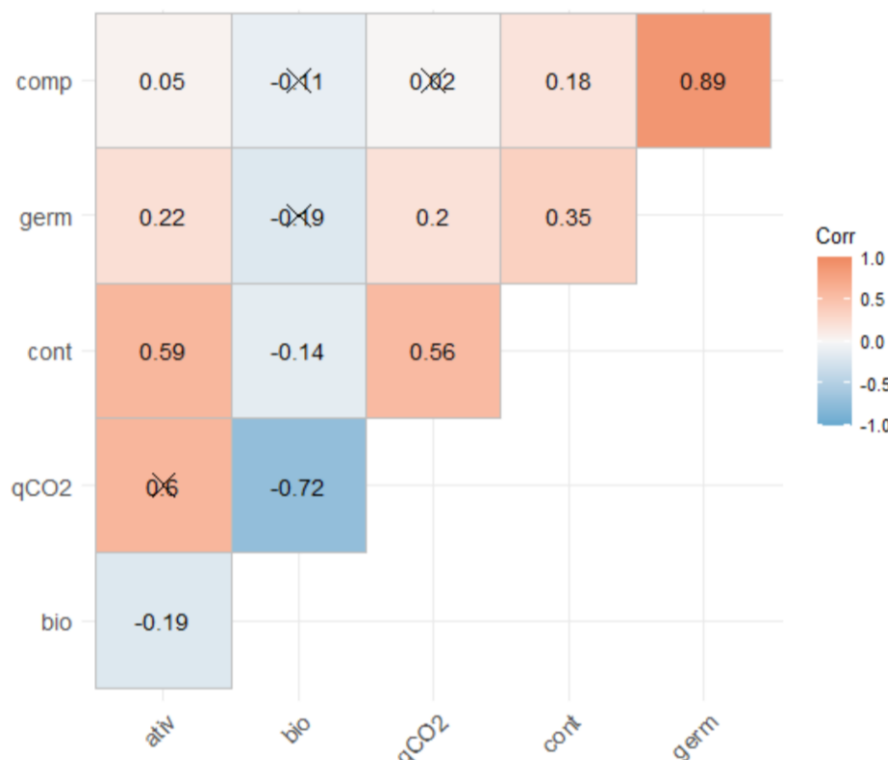
A linha vermelha indica critério de corte de Mojena para o dendrograma

Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (L. sativa); comp: comprimento da raiz de alface (L. sativa).

Fonte: Autoria própria.

Ainda, a análise de *clusters* permitiu agrupar as variáveis em três grupos: um contendo a biomassa, outro para as variáveis de fitotoxicidade e um terceiro grupo com as variáveis de estresse (ativ e qCO₂) acrescidos da contagem em placas. A matriz de correlação de Spearman pode ser associado ao agrupamento das variáveis, pois houve correlação alta entre as variáveis de toxicidade (comp e germ) (0,89), correlação negativa moderada entre qCO₂ e biomassa (- 0,72) e correlação positiva moderada entre qCO₂ e contagem em placas (0,56) (Figura 17), o que também é retratado pelo agrupamento dado na análise de *clusters*.

Figura 17 – Matriz de correlação de Spearman relacionando os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO₂) e contagem e comprimento de raízes de sementes de alface após 30 dias de contaminação do solo

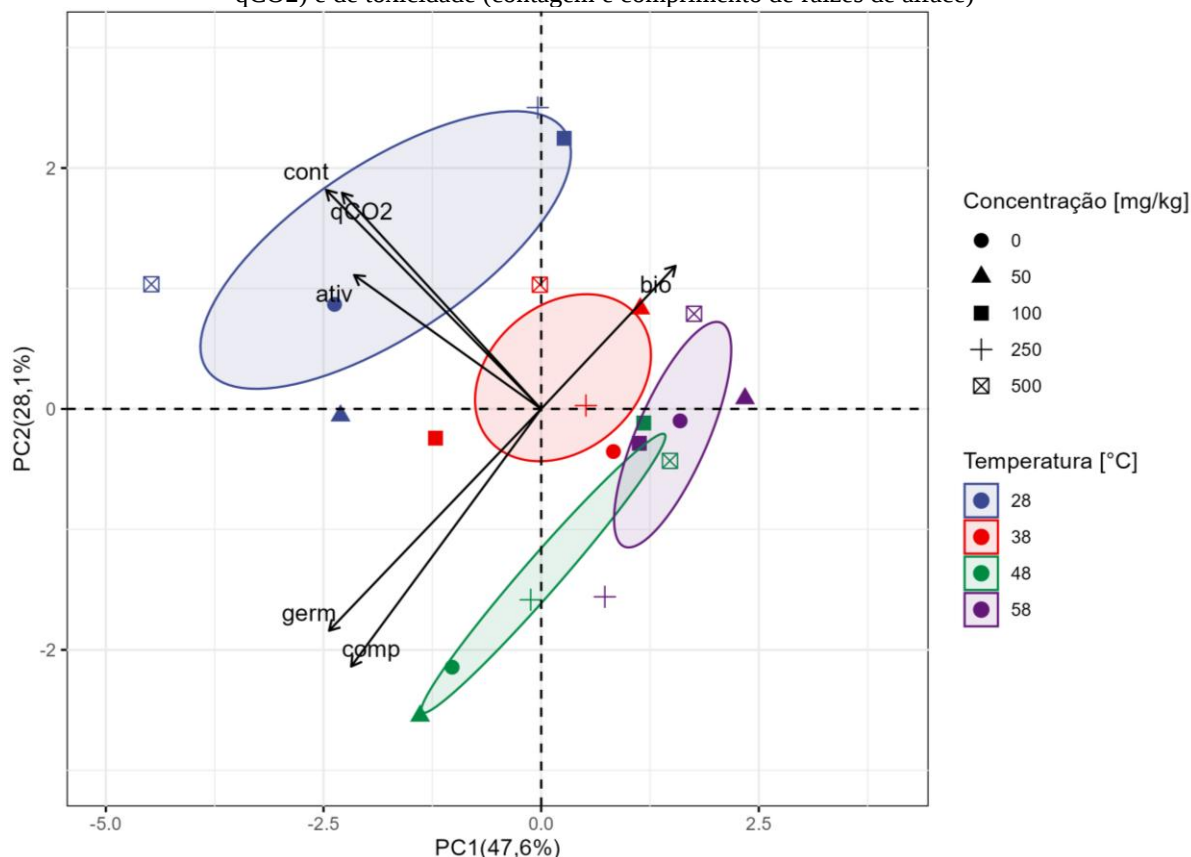


Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO₂: Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (L. sativa); comp: comprimento da raiz de alface (L. sativa).

Fonte: Autoria própria.

Os efeitos associados da temperatura e concentração nos microrganismos do solo podem ocorrer em longo prazo e apresentar modificações de comportamento. Após incubação de 30 dias, verificou-se relação similar ao dos anteriores (0 e 15 dias) entre os componentes principais: CP1 relacionado às variáveis biológicas e CP2 relacionado às variáveis de fitotoxicidade (Figura 18). Tratamentos alocados no primeiro e segundo quadrante possuem maior relação com a biomassa, enquanto terceiro e quarto quadrante tem maior relação com a atividade microbiana, quociente metabólico e contagem em placas, aqui verifica-se comportamento oposto da biomassa e demais variáveis biológicas. Com relação às variáveis de fitotoxicidade o segundo e terceiro quadrante possuem menor toxicidade, enquanto o primeiro e quarto indicam maior toxicidade, com menores valores dos indicadores – germinação e comprimento da semente de alface.

Figura 18 – Análise de Componentes Principais (PCA) para os dados após 30 dias de contaminação, considera 5 níveis de concentração de naftaleno e relação entre os bioindicadores microbiológicos (biomassa, atividade e qCO_2) e de toxicidade (contagem e comprimento de raízes de alface)



Onde: ativ: Atividade microbiana; bio: Biomassa microbiana; qCO_2 : Quociente metabólico; cont: Contagem de bactérias em placa; germ: germinação de sementes de alface (*L. sativa*); comp: comprimento da raiz de alface (*L. sativa*).

Fonte: Autoria própria.

Assim, com o tempo houve maior contagem em placas, estresse microbiológico e maior toxicidade para temperatura mais baixa (28°C); enquanto, temperaturas como 48 e 58°C apresentaram maior biomassa e menor estresse, apesar de apresentar menor contagem em placas. A alta taxa de respiração (atividade) pode ser relacionada a utilização do contaminante como fonte de energia (Badzinski *et al.*, 2021), porém a associação com o aumento do qCO_2 aponta para estresse em virtude da presença do contaminante (Caravaca; Roldán, 2003). Ainda, solos com maior contaminação podem apresentar maior contagem de microrganismos e maior atividade devido a degradação do contaminante (Zawierucha *et al.*, 2022).

Assim, nos tratamentos de menor temperatura houve maior contagem de bactérias, o que pode indicar maior competição e consequentemente maior escassez de recursos, o que aumentou o estresse nestas amostras, ainda pode ter ocorrido maior crescimento de espécies que proporcionam benefícios à outras como resposta ao aumento do estresse – comensalismo (Hernandez *et al.*, 2021; Peng *et al.*, 2022; Piccardi; Vessman; Mitri, 2019); já as bactérias que resistiram às condições de temperatura e contaminação apresentaram crescimento com menor

estresse, o que pode ter ocorrido devido à seleção de bactérias específicas para estas condições (Hanke *et al.*, 2016; Jiao *et al.*, 2016). Ainda, a alteração da relação de contagem de placas e as variáveis de estresse pode ser explicada pela alteração da estrutura e composição da comunidade microbiana (Roy *et al.*, 2018), que pode ser independente da presença do contaminante. A ausência de sequenciamento genético ao longo do tempo limita a compreensão da dinâmica das comunidades microbianas e seus mecanismos adaptativos, desta forma indica-se a realização de tal avaliação genética para futuros estudos.

Quanto a fitotoxicidade, temperaturas mais altas (48 e 58°C) e menores concentrações de contaminante (0 e 50 mg/kg) se associaram a maiores valores de comprimento e germinação de sementes de alface, indicando menor fitotoxicidade, portanto o aumento da temperatura pode influenciar na redução de fitotoxicidade (Li *et al.*, 2023; Lima *et al.*, 2015). Portanto, após 30 dias de contaminação tanto variáveis microbiológicas como a fitotoxicidade indicaram mudanças nas interações no solo, que podem apontar para a degradação e desaparecimento ou indisponibilidade do contaminante durante o experimento, visto que o naftaleno pode se tornar bioindisponível entre 25 e 29 mg/kg (Silva *et al.*, 2009).

As variáveis avaliadas permitem distinguir momentos do processo de biorremediação térmica, como a ação imediata do contaminante, sua utilização como fonte de carbono e o possível desaparecimento do contaminante. A comparação entre os tempos demonstrou variações entre as correlações com tendência de diminuição entre qCO_2 e bio (de -0,96 para -0,72), diminuição da correlação entre qCO_2 e ativ (de 0,8 para 0,6), aumento entre comp e germ (de 0,61 para 0,89) e inversão da correlação de cont e qCO_2 (de -0,12 para 0,56). O teste de Mantel foi aplicado para analisar se a estrutura das correlações muda significativamente ao longo do tempo. Após comparação dos tempos pelo teste de Mantel foi observado que a maior mudança ocorreu entre 0 e 30 dias ($r = 0,675$; $p = 0,0375$), sem alteração significativa entre 15 e 30 dias ($r = 0,1893$; $p = 0,2236$). Entretanto, mudanças nas relações entre variáveis e tratamentos foram observadas na PCA, portanto para aplicação da biorremediação térmica deve-se avaliar a remoção do contaminante no tempo – com indicação para menores intervalos de tempo, assim se pode definir um tempo ótimo de aplicação da técnica de remediação.

Conforme análise multivariada houve alteração da resposta dos microrganismos à medida em que ocorreu variação de temperatura e de doses do contaminante. Temperaturas de 28 e 38 °C, de forma independente da concentração do contaminante, favoreceram o crescimento de microrganismos, o que potencializa a biodegradação (Behdarvandan *et al.*, 2020; Elumalai *et al.*, 2021; Gou *et al.*, 2023; Imperato *et al.*, 2019; Patowary *et al.*, 2022; Ravi *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020); em contrapartida, temperaturas mais altas foram nocivas aos

microrganismos. Estudos indicam que temperaturas abaixo de 40°C são eficazes para remover o naftaleno e promover o crescimento microbiano (Al-Dossary; Abood; Al-Saad, 2020; Kaur; Kaur; Gupta, 2020; Kesavan; Gousuddin Inamdar; Muthunarayanan, 2020; Liu *et al.*, 2022; Patowary *et al.*, 2022; Thimmarayan *et al.*, 2024; Wang *et al.*, 2019). Assim, indica-se utilizar temperaturas entre 28 e 38 °C na biorremediação térmica de solos contaminados com naftaleno.

6 CONCLUSÕES

Este estudo investigou os efeitos da biorremediação térmica sobre bioindicadores de qualidade do solo contaminado por naftaleno. A literatura mostra que técnicas de biorremediação são amplamente empregadas na remediação do naftaleno, uma vez que as principais rotas de degradação envolvem ação biológica. Ainda, a biorremediação térmica tem se mostrado eficiente na remoção do naftaleno devido aos efeitos da temperatura sobre a degradação do contaminante.

As respostas das variáveis foram avaliadas em função de dois fatores: as doses do contaminante e o aquecimento do solo; adicionalmente, foi testada uma adaptação da metodologia de quantificação do naftaleno utilizando o espectrofotômetro, a qual apresentou resultados satisfatórios apenas para altas concentrações, o que impediu a quantificação da degradação ao longo do tempo.

As variáveis microbiológicas e de fitotoxidade analisadas demonstraram sensibilidade às condições testadas e são recomendadas como bioindicadores para futuras aplicações, com destaque para o quociente metabólico, a biomassa microbiana e a contagem de bactérias em placas, pois fornecem um panorama abrangente da resposta da comunidade microbiana às alterações ambientais. Imediatamente após a contaminação concentrações de mais brandas (0, 50 e 100 mg de naftaleno/kg de solo) apresentaram benefícios ao crescimento microbiano; entretanto, houve aumento do estresse e redução da comunidade microbiana em concentrações elevadas (250 e 500 mg/kg).

Os resultados evidenciaram interação entre os fatores e uma separação marcante, independente da concentração, entre duas faixas de temperatura: enquanto 48 e 58 °C causaram maiores impactos negativos na microbiota do solo, temperaturas de 28 e 38 °C favoreceram o crescimento microbiano. Deste modo, para biorremediação térmica de solos contaminados com naftaleno recomenda-se a aplicação de temperaturas inferiores a 40 °C com objetivo de remoção do contaminante com menor impacto na comunidade microbiana.

REFERÊNCIAS

- ABAS, A. A systematic review on biomonitoring using lichen as the biological indicator: A decade of practices, progress and challenges. **Ecological Indicators**, [s. l.], v. 121, p. 107197, 2021. DOI 10.1016/j.ecolind.2020.107197.
- AL-DHABI, N. A. *et al.* Optimizing the Management of Cadmium Bioremediation Capacity of Metal-Resistant *Pseudomonas* sp. Strain Al-Dhabi-126 Isolated from the Industrial City of Saudi Arabian Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 16, n. 23, p. 4788, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/23/4788>. Acesso em: 26 nov. 2023.
- AL-DOSSARY, M. A.; ABOOD, S. A.; AL-SAAD, H. T. Factors affecting polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by *Aspergillus flavus*. **Remediation**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 17–25, 2020.
- ALI, M. *et al.* Effects of short and long-term thermal exposure on microbial compositions in soils contaminated with mixed benzene and benzo[a]pyrene: A short communication. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 912, n. October 2023, p. 168862, 2024. DOI 10.1016/j.scitotenv.2023.168862.
- ALI, M. *et al.* Thermally enhanced biodegradation of benzo[a]pyrene and benzene co-contaminated soil: Bioavailability and generation of ROS. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 455, n. April, p. 131494, 2023. DOI 10.1016/j.jhazmat.2023.131494.
- AL-RASHED, S. *et al.* Bioremediation characteristics, influencing factors of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) removal by using non-indigenous *Paracoccus* sp. **Chemosphere**, [s. l.], v. 270, p. 129474, 2021. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.129474.
- AL-THUKAIR, A. A.; MALIK, K.; NZILA, A. Biodegradation of selected hydrocarbons by novel bacterial strains isolated from contaminated Arabian Gulf sediment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. DOI 10.1038/s41598-020-78733-0.
- ANDERSON, J. P. E. Soil Respiration. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. (org.). **Methods of soil analysis: Chemical and microbiological properties**. 2. ed. Madison: Soil Science Society of America/American Society of Agronomy, 1982. p. 831–845.
- ANDERSON, M. J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). In: WILEY STATSREF: STATISTICS REFERENCE ONLINE. [S. l.]: Wiley, 2017. p. 1–15. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118445112.stat07841>. Acesso em: 26 nov. 2023.
- ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 2039–2043, 2010. DOI 10.1016/j.soilbio.2010.06.026.
- ANDERSON, T. -H; DOMSCH, K. H. Carbon assimilation and microbial activity in soil. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, [s. l.], v. 149, n. 4, p. 457–468, 1986.
- ANDERSON, T.; DOMSCH, K. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific

activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 393–395, 1993.

ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K. H. Application of eco-physiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 251–255, 1990.

ANNWEILER, E. *et al.* Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 518–523, 2000.

APARICIO, J. D. *et al.* The current approach to soil remediation: A review of physicochemical and biological technologies, and the potential of their strategic combination. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2022.

ASWANI, K. V. *et al.* Microbial enrichment-based bioremediation of petroleum refinery wastewater- enhanced effluent quality assessment by phytotoxicity studies. **Bioresource Technology Reports**, [s. l.], v. 29, n. January, p. 102043, 2025.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2-Methylnaphthalene. Atlanta: ATSDR, 2005. 347 p. Disponível em: <https://www.epa.gov/foia/toxicological-profile-naphthalene-1-methylnaphthalene-and-2-methylnaphthalene>. Acesso em: 26 nov. 2023.

BADZINSKI, C. *et al.* Soil acidification and impacts over microbial indicators during attenuation of soybean biodiesel (B100) as compared to a diesel-biodiesel blend (B8). **Fuel**, [s. l.], v. 289, n. November 2020, p. 119989, 2021.

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

BAO, S. *et al.* Influencing factors of bioaugmentation treatment of PAH-contaminated soils in slurry bioreactors. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 109893, 2023.

BARBOSA, F. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination, kinetics in the human body, and toxicity. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 28–65, 2023.

BASU, A.; DIXIT, S. S.; PHALE, P. S. Metabolism of benzyl alcohol via catechol ortho-pathway in methylnaphthalene-degrading *Pseudomonas putida* CSV86. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 62, n. 5–6, p. 579–585, 2003.

BEHDARVANDAN, P. *et al.* Assessing the efficiency of floor disinfection on bacterial decontamination in sanandaj governmental hospitals. **J Adv. Environ Health Res**, Sanandaj, v. 8, p. 234–241, 2020. Disponível em: https://jaehr.muk.ac.ir/article_121438.html. Acesso em: 12 fev. 2024.

BRINCH, U. C.; EKELUND, F.; JACOBSEN, C. S. Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 1808–1816, 2002.

BRITO, N. M. *et al.* Validação De Métodos Analíticos: Estratégia E Discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [s. l.], v. 13, p. 129–146, 2003.

CAMESELLE, C.; REDDY, K. R. Electrobioremediation: Combined Electrokinetics and Bioremediation Technology for Contaminated Site Remediation. **Indian Geotechnical Journal**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 1205–1225, 2022.

CAPPUYNS, V. *et al.* Can thermal soil remediation be sustainable? a case study of the environmental merit of the remediation of a site contaminated by a light non-aqueous phase liquid (LNAPL). **Journal of Integrative Environmental Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 103–121, 2011.

CARAVACA, F.; ROLDÁN, A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. **Geoderma**, [s. l.], v. 117, n. 1–2, p. 53–61, 2003.

CARDOSO, E. J. B. N. *et al.* Soil health: Looking for suitable indicators. What should be considered to assess the effects of use and management on soil health?. **Scientia Agricola**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 274–289, 2013.

CARROLL, K. C. *et al.* Rethinking pump-and-treat remediation as maximizing contaminated groundwater. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 918, n. January, p. 170600, 2024.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet**. Atlanta, GA: CDC, 2022. Disponível em: https://www.cdc.gov/biomonitoring/PAHs_FactSheet.html. Acesso em: 26 nov. 2023.

CESILA, C. A. *et al.* Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian pregnant women: Urinary levels and health risk assessment. **Environmental Research**, [s. l.], v. 235, n. July, p. 116571, 2023.

CHEFFI, M. *et al.* Isolation and characterization of a newly naphthalene-degrading *Halomonas pacifica*, strain Cnaph3: biodegradation and biosurfactant production studies. **3 Biotech**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–15, 2020.

CHEN, S.; ZHONG, M. Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil. In: **ENVIRONMENTAL CHEMISTRY AND RECENT POLLUTION CONTROL APPROACHES**. [S. l.]: IntechOpen, 2019. v. 81, p. 229–249.

CHEN, Y. A. *et al.* Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 129, n. 5, p. 603–612, 2020.

CHEN, Z. *et al.* Soil bioremediation by *Pseudomonas brassicacearum* MPDS and its enzyme involved in degrading PAHs. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 813, p. 152522, 2022.

CHEN, Z.; HU, L. Adsorption of Naphthalene on Clay Minerals: A Molecular Dynamics Simulation Study. **Materials**, [s. l.], v. 15, n. 15, 2022.

CHIBWE, L. *et al.* Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 49, n. 23, p. 13889–13898, 2015.

CHOI, B.; LEE, S.; JHO, E. H. Removal of TPH, UCM, PAHs, and Alk-PAHs in oil-contaminated soil by thermal desorption. **Applied Biological Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 83, 2020.

CLOAREC, O. *et al.* Improvement of UV spectrophotometry methodology for the determination of total polycyclic aromatic compounds in contaminated soils. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 453, n. 2, p. 245–252, 2002.

CLU-IN. **Technology Focus**. Washington, 2021. Disponível em: <https://clu-in.org/techfocus/>. Acesso em: 20 nov. 2023.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 146, n. 249, p. 81-84, 30 dez. 2009. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/CONAMA/REA0420-281209.PDF>. Acesso em: 01 nov. 2023.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 460, de 30 de dezembro de 2013. Altera a Resolução no 420, de 28 de dezembro de 2009, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 150, n. 253, p. 153, 30 dez. 2013. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/CONAMA/RE0460-301213.pdf>. Acesso em: 01 nov. 2023.

COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Evaluation of solvent extraction by ultrasound by using high performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. **Química Nova**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 2026–2033, 2009.

COUTO, F. R. *et al.* Physical, chemical and microbiological characterization of the soils contaminated by iron ore tailing mud after Fundão Dam disaster in Brazil. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 158, n. October 2020, p. 103811, 2021.

DA SILVA, I. G. S. *et al.* Soil bioremediation: Overview of technologies and trends. **Energies**, [s. l.], v. 13, n. 18, 2020.

DE SOUZA, E. S. *et al.* Assessment of risk to human health from simultaneous exposure to multiple contaminants in an artisanal gold mine in Serra Pelada, Pará, Brazil. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 576, p. 683–695, 2017.

DELEGAN, Y. A. *et al.* Characterization and genomic analysis of highly efficient thermotolerant oil-degrading bacterium *Gordonia* sp. 1D. **Folia Microbiologica**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 41–48, 2019.

DELERUE, F. *et al.* A multi-site approach to investigate the role of toxicity and confounding factors on plant bioassay results. **Chemosphere**, [s. l.], v. 219, p. 482–492, 2019.

DENNIS, J. J.; ZYLSTRA, G. J. Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 341, n. 3, p. 753–768, 2004.

DING, D. *et al.* A review on the sustainability of thermal treatment for contaminated soils. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 253, p. 449–463, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.118>. Acesso em: 24 nov. 2023.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Itaguaí: Embrapa; CNPAB, 1995. 60 p.

DOS SANTOS, H. G. *et al.* **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 6 ed., reved. Brasília: Embrapa, 2025.

DOVLETYAROVA, E. A. *et al.* Sensitivity of microbial bioindicators in assessing metal immobilization success in smelter-impacted soils. **Chemosphere**, [s. l.], v. 359, n. January, p. 142296, 2024.

DU, J. *et al.* The relationships between soil physicochemical properties, bacterial communities and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soils proximal to coking plants. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 298, n. December 2021, p. 118823, 2022.

EATON, R. W.; CHAPMAN, P. J. Bacterial metabolism of naphthalene: Construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 174, n. 23, p. 7542–7554, 1992.

ELUMALAI, P. *et al.* Enhanced biodegradation of hydrophobic organic pollutants by the bacterial consortium: Impact of enzymes and biosurfactants. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 289, n. August, p. 117956, 2021.

EOM, I. C. *et al.* Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 190–205, 2007.

FERNÁNDEZ, M. D. *et al.* Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 62, n. 2 SPEC. ISS., p. 174–184, 2005.

FERREIRA, A. S.; CAMARGO, F. A. O.; VIDOR, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 991–996, 1999.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).

World Reference Base. Rome: FAO, 2015.

GARCÍA-CARMONA, M. *et al.* Evaluation of remediation techniques in soils affected by residual contamination with heavy metals and arsenic. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 191, p. 228–236, 2017.

GAWRYLUK, A.; KRZYSZCZAK, J. Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Germination and Initial Growth of Selected Lawn Grass Species in Soil Polluted with PAHs. **Journal of Ecological Engineering**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 175–186, 2024.

GOU, Y. *et al.* Low-temperature thermal-enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aged subsurface soil. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 454, n. P2, p. 140143, 2023.

GOU, Y. *et al.* Study on the accelerated biodegradation of PAHs in subsurface soil via coupled low-temperature thermally treatment and electron acceptor stimulation based on metagenomic sequencing. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 465, n. 19, p. 133265, 2024.

GUEVARA-LUNA, J. *et al.* Isolated Bacteria From Hot Springs Able To Use Hydrocarbons As Carbon Source. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, [s. l.], v. 38, n. Special issue 3, p. 68–77, 2022.

GUNDLAPALLI, M. *et al.* Biodegradation of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: Insights into bacterial activities and bioremediation techniques. **Sustainable Chemistry for the Environment**, [s. l.], v. 7, n. July, p. 100146, 2024.

GÜNTHER, W. M. R. Áreas Contaminadas no Contexto da Gestão Urbana. **São Paulo em Perspectiva**, São Paulo, v. 20, n.2, p. 105-117, abr./jun. 2006.

GUPTA, A.; GUPTA, R.; SINGH, R. L. Microbes and Environment. *In*: SINGH, R. L. (org.). **Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 43–84.

HAN, Z. *et al.* Lab-scale removal of PAHs in contaminated soil using electrical resistance heating: Removal efficiency and alteration of soil properties. **Chemosphere**, [s. l.], v. 239, p. 124496, 2020.

HANKE, A. *et al.* Selective pressure of temperature on competition and cross-feeding within denitrifying and fermentative microbial communities. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. JAN, p. 1–14, 2016.

HAO, P. *et al.* Characterization and low-temperature biodegradation mechanism of 17 β -estradiol-degrading bacterial strain *Rhodococcus* sp. RCBS9. **Environmental Research**, [s. l.], v. 240, n. P2, p. 117513, 2024.

HAWROT-PAW, M. *et al.* Ecotoxicity of soil contaminated with diesel fuel and biodiesel. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

HEIDARI, P.; PANICO, A. Sorption Mechanism and Optimization Study for the

Bioremediation of Pb(II) and Cd(II) Contamination by Two Novel Isolated Strains Q3 and Q5 of *Bacillus* sp. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 17, n. 11, p. 4059, 2020.

HERNANDEZ, D. J. *et al.* Environmental stress destabilizes microbial networks. **ISME Journal**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1722–1734, 2021.

HESNAWI, R. M.; MOGADAMI, F. S. Bioremediation of Libyan Crude Oil-Contaminated Soil under Mesophilic and Thermophilic Conditions. **APCBEE Procedia**, [s. l.], v. 5, p. 82–87, 2013.

HORIMOUTI, T.A.T. **Efeitos da Aplicação de Remediação Térmica na Microbiota do Solo de Áreas Contaminadas por Compostos Orgânicos**. 2019. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) – Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, Diadema, 2019.

HORST, J. *et al.* In Situ Thermal Remediation for Source Areas: Technology Advances and a Review of the Market From 1988–2020. **Groundwater Monitoring & Remediation**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 17–31, 2021. Disponível em: <https://ngwa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gwmr.12424>. Acesso em: 24 nov. 2023.

HOU, S. *et al.* Impacts of a novel strain QY-1 allied with chromium immobilizing materials on chromium availability and soil biochemical properties. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 382, n. June 2019, p. 121093, 2020.

HUSSAIN, A. *et al.* In-situ, Ex-situ, and nano-remediation strategies to treat polluted soil, water, and air – A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 289, n. December 2021, p. 133252, 2022.

IMPERATO, V. *et al.* Genomic diversity of two hydrocarbon-degrading and plant growth-promoting pseudomonas species isolated from the oil field of bóbrka (Poland). **Genes**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2019.

IZMALKOVA, T. Y. *et al.* The organization of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas putida* strain AK5. **Research in Microbiology**, [s. l.], v. 164, n. 3, p. 244–253, 2013.

JIANG, G. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ambient air of Guangzhou city: Exposure levels, health effects and cytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 262, n. July, 2023.

JIAO, S. *et al.* Microbial succession in response to pollutants in batch-enrichment culture. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. October 2015, p. 1–11, 2016.

KAUR, B.; KAUR, J.; GUPTA, B. Augmentation of degradation prospects of dioxygenases from the crude extract of an efficient bacterial strain, using pyrene as sole carbon source. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 28, p. 1690–1694, 2020.

KAUR, G. *et al.* Novel BTEX-degrading strains from subsurface soil: Isolation, identification and growth evaluation. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 335, n. July, p. 122303, 2023.

KAUR, G.; KROL, M.; BRAR, S. K. Geothermal heating: Is it a boon or a bane for bioremediation?. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 287, n. March, p. 117609, 2021.

KESAVAN, S.; GOUSUDDIN INAMDAR, M.; MUTHUNARAYANAN, V. Concentration of benzene, toluene, naphthalene and acenaphthene on selected bacterial species. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 37, n. Part 2, p. 273–279, 2020.

KICIŃSKA, A.; DMYTROWSKI, P. Anthropogenic impact on soils of protected areas—example of PAHs. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1524, 2023.

KWAK, J. Il; KIM, D.; AN, Y. J. Evidence of soil particle-induced ecotoxicity in old abandoned mining area. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 470, n. March, p. 134163, 2024.

LAMY, E. *et al.* Relationships of respiratory quotient to microbial biomass and hydrocarbon contaminant degradation during soil bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 83, p. 85–91, 2013.

LEE, S.; OH, B.; KIM, J. Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 7, p. 2578–2587, 2008.

LEE, Yunho; LEE, Yunhee; JEON, C. O. Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by Paraburkholderia aromaticivorans BN5 isolated from petroleum-contaminated soil. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 24–30, 2019.

LEITE, E. C. P. *et al.* Thermally-induced changes in tropical soils properties and potential implications to sequential nature-based solutions. **Journal of Contaminant Hydrology**, [s. l.], v. 241, n. September 2020, 2021.

LEMMING, G. *et al.* Optimizing the environmental performance of in situ thermal remediation technologies using life cycle assessment. **Groundwater Monitoring and Remediation**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 38–51, 2013.

LENTENDU, G. *et al.* Effects of long-term differential fertilization on eukaryotic microbial communities in an arable soil: A multiple barcoding approach. **Molecular Ecology**, [s. l.], v. 23, n. 13, p. 3341–3355, 2014.

LI, J. *et al.* Low temperature thermal desorption-chemical oxidation hybrid process for the remediation of organic contaminated model soil: A case study. **Journal of Contaminant Hydrology**, [s. l.], v. 243, n. October 2020, p. 103908, 2021.

LI, J. *et al.* Remediation of heavy metal-contaminated mine soils using smoldering combustion technology. **Environmental Technology & Innovation**, [s. l.], v. 32, p. 103333, 2023.

LI, S. *et al.* Cloning and characterisation of four catA genes located on the chromosome and large plasmid of Pseudomonas putida ND6. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 34, p. 83–90, 2018.

LIMA, M. P. R. *et al.* Carbaryl toxicity prediction to soil organisms under high and low temperature regimes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 114, p. 263–272,

2015.

LIMA, O. de *et al.* Soil catenas in a pilot sub-basin in the region of Itajubá, Minas Gerais state, Brazil, for environmental planning. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 42, n. 3Supl1, p. 1511–1528, 2021.

LIU, Y. *et al.* Display of a novel carboxylesterase CarCby on Escherichia coli cell surface for carbaryl pesticide bioremediation. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–14, 2022.

LIU, Y. *et al.* The optimum temperature of soil microbial respiration: Patterns and controls. **Soil Biology and Biochemistry**, [s. l.], v. 121, n. February, p. 35–42, 2018.

ŁYSZCZARZ, S. *et al.* Effect of forest and agricultural land use on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil properties and possible pollution sources. **Forest Ecology and Management**, [s. l.], v. 490, p. 119105, 2021.

ŁYSZCZARZ, S.; LASOTA, J.; BŁOŃSKA, E. Polycyclic aromatic hydrocarbons accumulation in soil horizons of different temperate forest stands. **Land Degradation & Development**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 945–959, 2022.

MA, J. *et al.* Remediation of PBDEs-metal co-contaminated soil by the combination of metal stabilization, persulfate oxidation and bioremediation. **Chemosphere**, [s. l.], v. 252, p. 126538, 2020.

MAHAJAN, M. C.; PHALE, P. S.; VAIDYANATHAN, C. S. Evidence for the involvement of multiple pathways in the biodegradation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas putida* CSV86. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 161, n. 5, p. 425–433, 1994.

MALLAH, Manthar Ali *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overreview. **Chemosphere**, [s. l.], v. 296, n. October 2021, 2022.

MARTINS, E. da S. *et al.* Contagem microbiana, atividade de β -glicosidase e isolamento de fungos termofílicos/termotolerantes em solos com cultivo convencional e agroecológico. **Revista de Geografia - PPGeo - UFJF**, Juiz de Fora, v. 14, n. 1, p. 188–204, 2024.

MCGEOCH, M. A. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, [s. l.], v. 73, n. 02, p. 181–201, 1998.

MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Soil and brownfield bioremediation. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1244–1249, 2017.

MEHETRE, G. T.; DASTAGER, S. G.; DHARNE, M. S. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 679, p. 52–60, 2019.

MELLONI, R. *et al.* Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**,

[s. l.], v. 28, n. 1, p. 85–93, 2004.

MENDES, G. P. *et al.* Treatability studies of naphthalene in soil, water and air with persulfate activated by iron(II). **Journal of Environmental Sciences**, [s. l.], v. 90, p. 67–77, 2020.

MOHAPATRA, B.; PHALE, P. S. Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, n. March, p. 1–28, 2021.

MORADI, A.; SMITS, K. M.; SHARP, J. O. Coupled thermally-enhanced bioremediation and renewable energy storage system: Conceptual framework and modeling investigation. **Water (Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 10, 2018.

MOREIRA, A. A. *et al.* Biodegradable plastic designed to improve the soil quality and microbiological activity. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 158, p. 52–63, 2018.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MURRAY, A. M. *et al.* Chlorinated ethene plume evolution after source thermal remediation: Determination of degradation rates and mechanisms. **Journal of Contaminant Hydrology**, [s. l.], v. 227, n. August, p. 103551, 2019.

MUSKUS, A. M. *et al.* Degradation of glyphosate in a Colombian soil is influenced by temperature, total organic carbon content and pH. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 259, p. 113767, 2020.

NIKINMAA, M. Bioindicators and Biomarkers. **An Introduction to Aquatic Toxicology**, [s. l.], n. Chapter 5, p. 147–155, 2014.

NZILA, A. Current Status of the Degradation of Aliphatic and Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Thermophilic Microbes and Future Perspectives. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2782, 2018.

O'BRIEN, P. L. *et al.* Thermal remediation alters soil properties – a review. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 206, p. 826–835, 2018.

ODUM, E. P. The strategy of ecosystem development. **Science**, [s. l.], v. 164, n. 3877, p. 262–270, 1969.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. **Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test**. Paris: OECD Publishing, 2006. 21 p. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test_9789264070066-en. Acesso em: 05 abr. 2024.

ONWOSI, C. O. *et al.* Principal component analysis reveals microbial biomass carbon as an effective bioindicator of health status of petroleum-polluted agricultural soil. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 41, n. 24, p. 3178–3190, 2020.

- PALANIVEL, T. M. *et al.* Bioremediation of copper by active cells of *Pseudomonas stutzeri* LA3 isolated from an abandoned copper mine soil. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 253, n. October 2019, p. 109706, 2020.
- PANIAGUA-LÓPEZ, M. *et al.* Soil remediation approach and bacterial community structure in a long-term contaminated soil by a mining spill (Aznalcóllar, Spain). **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 777, p. 145128, 2021.
- PANKHURST, C. E. *et al.* Evaluation of Soil Biological Properties as Potential Bioindicators of Soil Health. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, [s. l.], v. 35, n. 7, p. 1015–1028, 1995.
- PAPE, A. *et al.* Impacts of thermal and smouldering remediation on plant growth and soil ecology. **Geoderma**, [s. l.], v. 243–244, p. 1–9, 2015.
- PARMAR, T. K.; RAWTANI, D.; AGRAWAL, Y. K. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. **Frontiers in Life Science**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 110–118, 2016.
- PATEL, A. B. *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. November, 2020.
- PATOWARY, R. *et al.* Biodegradation of hazardous naphthalene and cleaner production of rhamnolipids — Green approaches of pollution mitigation. **Environmental Research**, [s. l.], v. 209, n. December 2021, 2022.
- PENG, C. *et al.* Bacterial diversity and competitors for degradation of hazardous oil refining waste under selective pressures of temperature and oxygen. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 427, n. December 2021, p. 128201, 2022.
- PENG, W. *et al.* Bioremediation of cadmium- and zinc-contaminated soil using *Rhodobacter sphaeroides*. **Chemosphere**, [s. l.], v. 197, p. 33–41, 2018.
- PHALE, P. S.; SHAH, B. A.; MALHOTRA, H. Variability in assembly of degradation operons for naphthalene and its derivative, carbaryl, suggests mobilization through horizontal gene transfer. **Genes**, [s. l.], v. 10, n. 8, 2019.
- PICCARDI, P.; VESSMAN, B.; MITRI, S. Toxicity drives facilitation between 4 bacterial species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 32, p. 15979–15984, 2019.
- PIETIKÄINEN, J.; PETTERSSON, M.; BÅÅTH, E. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 49–58, 2005.
- PREUSS, R.; ANGERER, J.; DREXLER, H. Naphthalene - an environmental and occupational toxicant. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, [s. l.], v. 76, n. 8, p. 556–576, 2003.
- PULLEMAN, M. *et al.* Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services-an overview of European approaches. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, [s.

l.], v. 4, n. 5, p. 529–538, 2012.

R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.** Vienna: R Core Team, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 25 jan. 2025.

RABANI, M. S. *et al.* Characterization and Identification of Naphthalene Degrading Bacteria Isolated from Petroleum Contaminated Sites and Their Possible Use in Bioremediation. **Polycyclic Aromatic Compounds**, [s. *l.*], v. 42, n. 3, p. 978–989, 2022.

RAVI, A. *et al.* Characterization of petroleum degrading bacteria and its optimization conditions on effective utilization of petroleum hydrocarbons. **Microbiological Research**, [s. *l.*], v. 265, n. May, p. 127184, 2022.

RESNICK, S.; LEE, K.; GIBSON, D. Pseudomonas sp strain NCIB 9816. **Journal of Industrial Microbiology**, [s. *l.*], v. 4, n. 17, p. 438–457, 1996.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s. *l.*], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

ROOHIDEHKORDI, I.; KROL, M. M. Applicability of ground source heat pumps as a bioremediation-enhancing technology for monoaromatic hydrocarbon contaminants. **Science of the Total Environment**, [s. *l.*], v. 778, p. 146235, 2021.

ROY, A. *et al.* Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource Technology**, [s. *l.*], v. 253, n. January, p. 22–32, 2018.

SANTOS, R. D. *et al.* **Manual de Descrição e Coleta de Solo no Campo.** 7 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2015. 102 p.

SHEN, X. *et al.* Influencing mechanisms of siderite and magnetite, on naphthalene biodegradation: Insights from degradability and mineral surface structure. **Journal of Environmental Management**, [s. *l.*], v. 299, n. August, p. 113648, 2021.

SILVA, Í. S. *et al.* Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**, [s. *l.*], v. 100, n. 20, p. 4669–4675, 2009.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, [s. *l.*], v. 178, p. 359–367, 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** 7ed. Boston: Cengage Learning, 2017. 992 p.

SONWANI, R. K. *et al.* Studies on optimization of naphthalene biodegradation using surface response methodology: Kinetic study and performance evaluation of a pilot scale integrated aerobic treatment plant. **Process Safety and Environmental Protection**, [s. *l.*], v. 132, p. 240–248, 2019.

SÖRENGÅRD, M.; LINDH, A. S.; AHRENS, L. Thermal desorption as a high removal remediation technique for soils contaminated with per- And polyfluoroalkyl substances (PFASs). **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 6 June, p. 1–10, 2020.

STEFFAN, J. J. *et al.* The effect of soil on human health: an overview. **European Journal of Soil Science**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 159–171, 2018.

STROUD, J. L. *et al.* Metal(loid) bioaccessibility dictates microbial community composition in acid sulfate soil horizons and sulfidic drain sediments. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 48, n. 15, p. 8514–8521, 2014.

SUN, L. *et al.* Characteristics of organic pollutants and their effects on the microbial composition and activity in the industrial soils of Pearl River Delta, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 256, n. 1, p. 114844, 2023.

SUN, Z. *et al.* Thermally enhanced anoxic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a highly contaminated aged soil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 107236, 2022.

TAO, W. *et al.* Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons by the thermophilic bioemulsifier-producing *Aeribacillus pallidus* strain SL-1. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 189, n. November 2019, p. 109994, 2020.

TEIXEIRA, P. C. *et al.* **Manual de métodos de análise de solo**. 3ª edição revista e atualizada. Brasília: EMBRAPA Solos, 2017. 574 p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1085209/manual-de-metodos-de-analise-de-solo>. Acesso em: 04 abr. 2024.

THIMMARAYAN, S. *et al.* Biodegradation of naphthalene – Ecofriendly approach for soil pollution mitigation. **Environmental Research**, [s. l.], v. 240, n. P1, p. 117550, 2024.

TIRKEY, S. R.; RAM, S.; MISHRA, S. Naphthalene degradation studies using *Pseudomonas* sp. strain SA3 from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat. **Heliyon**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e06334, 2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução: Aristóbolo Mendes da Silva *et al.* 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRIPLETT KINGSTON, J. L.; DAHLEN, P. R.; JOHNSON, P. C. State-of-the-Practice Review of In Situ Thermal Technologies. **Groundwater Monitoring & Remediation**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 64–72, 2010. Disponível em: <https://ngwa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-6592.2010.01305.x>. Acesso em: 24 nov. 2023.

URIONABARRENETXEA, E. *et al.* Application of in situ bioremediation strategies in soils amended with sewage sludges. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 766, p. 144099, 2021.

US EPA – Environmental Protection Agency. **Polycyclic Aromatic Compounds**. Washington, D.C., 2024. Disponível em:

https://ordspub.epa.gov/ords/guideme_ext/f?p=guideme:gd::::gd:pacs. Acesso em: 26 nov. 2023.

US EPA – Environmental Protection Agency. **Priority Pollutant List**. Washington, D.C., 2014. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2023.

US EPA – Environmental Protection Agency. **SW-846 Test Method 3550C: Ultrasonic Extraction**. Washington, D.C., 2024. Disponível em: <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3550c-ultrasonic-extraction>. Acesso em: 26 nov. 2023.

US EPA – United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines (OPPTS 850.4200): Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**. Washington: US EPA, 1996. 8 p. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P100RF5I.txt>. Acesso em: 05 abr. 2024.

USMAN, M. Comment on “thermal remediation alters soil properties – A review”. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 249, n. December 2017, p. 107051, 2019.

VEERASAMY, V. *et al.* Exploring the bacterial genetic diversity and community structure of crude oil contaminated soils using microbiomics. **Environmental Research**, [s. l.], v. 236, n. P2, p. 116779, 2023.

VENKATRAMAN, G. *et al.* Environmental impact and human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and remedial strategies: A detailed review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 351, n. July 2023, p. 141227, 2024.

VERMA, P. K. *et al.* Atmospheric chemistry and cancer risk assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Nitro-PAHs over a semi-arid site in the Indo-Gangetic plain. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 317, n. May, p. 115456, 2022.

VETROVA, A. A. *et al.* Development of Microbial Consortium for Bioremediation of Oil-Contaminated Soils in the Middle Ob Region. **Eurasian Soil Science**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 651–662, 2022.

VIDONISH, J. E. *et al.* Thermal Treatment of Hydrocarbon-Impacted Soils: A Review of Technology Innovation for Sustainable Remediation. **Engineering**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 426–437, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/J.ENG.2016.04.005>. Acesso em: 24 nov. 2023.

WANG, H. *et al.* Ecological and health risk assessments of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils around a petroleum refining plant in China: A quantitative method based on the improved hybrid model. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 461, n. August 2023, p. 132476, 2024.

WANG, P. *et al.* A high-efficiency phenanthrene-degrading *Diaphorobacter* sp. isolated from PAH-contaminated river sediment. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 746, p. 140455, 2020.

WANG, Q. *et al.* Thermally enhanced bioremediation: A review of the fundamentals and

applications in soil and groundwater remediation. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 433, n. March, p. 128749, 2022.

WANG, S. *et al.* Assessing the ecological impacts of polycyclic aromatic hydrocarbons petroleum pollutants using a network toxicity model. **Environmental Research**, [s. l.], v. 245, n. October 2023, p. 117901, 2024.

WANG, S. *et al.* Insights into electro-bioremediation of PAH-contaminated soil under polarity reversal conditions: Effect of effective current intensity and soil properties on microbial function. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 478, n. August, p. 147493, 2023.

WANG, S.; GUO, S. Effects of soil organic carbon metabolism on electro-bioremediation of petroleum-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 459, n. July, p. 132180, 2023.

WANG, X. *et al.* Microbial communities in petroleum-contaminated seasonally frozen soil and their response to temperature changes. **Chemosphere**, [s. l.], v. 258, p. 127375, 2020.

WANG, Z. *et al.* Co-metabolic degradation of naphthalene and pyrene by acclimated strain and competitive inhibition kinetics. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 505–513, 2019.

WEI, M.; XIA, T.; HE, Y. Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Thermal Desorption from a Coking Plant Soil: Effects of Vacuum-Enhanced and Alkali-Assisted on Removal Efficiencies. **Environmental Engineering Science**, New Rochelle, v. 39, n. 1, p. 48–55, 2022. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ees.2020.0447>. Acesso em: 26 nov. 2023.

WEISSENFELS, W.; KLEWER, H.-J.; LANGHOFF, J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 689–696, 1992.

WOŁĘJKO, E. *et al.* Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides – A review. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 147, p. 103356, 2020.

WOLLUM II, A. G. Cultural Methods for Soil Microorganisms. In: PAGE, A.L. (editor) **Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties**. 2 ed. Madison: American Society of Agronomy, Inc., 1982. cap. 37, p. 781 – 802

YAMAZAKI, Y. *et al.* Effect of elevated temperature on cis-1,2-dichloroethene dechlorination and microbial community structure in contaminated soils—A biostimulation approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 103682, 2020.

YAMAZAKI, Y. *et al.* Temperature dependence of sequential chlorinated ethenes dechlorination and the dynamics of dechlorinating microorganisms. **Chemosphere**, [s. l.], v. 287, n. P1, p. 131989, 2022.

YANG, Z. *et al.* Biodegradation potential assessment by using autochthonous microorganisms from the sediments from Lac Mégantic (Quebec, Canada) contaminated with light residual oil. **Chemosphere**, [s. l.], v. 239, p. 124796, 2020.

ZAMULINA, I. V. *et al.* Soil organic matter and biological activity under long-term contamination with copper. **Environmental Geochemistry and Health**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 387–398, 2022.

ZARINKAMAR, F.; REYPOUR, F.; SOLEIMANPOUR, S. Effect of Diesel Fuel Contaminated Soil on the Germination and the Growth of *Festuca arundinacea*. **Research Journal of Chemical and Environmental Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 37–41, 2013.

ZAWIERUCHA, I. *et al.* Ecotoxicity and bioremediation potential assessment of soil from oil refinery station area. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 337–346, 2022.

ZEMAN, N. R. *et al.* Temperature impacts on anaerobic biotransformation of LNAPL and concurrent shifts in microbial community structure. **Biodegradation**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 569–585, 2014.

ZENELI, A. *et al.* Monitoring the biodegradation of TPH and PAHs in refinery solid waste by biostimulation and bioaugmentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 103054, 2019.

ZENG, J. *et al.* Effects of polycyclic aromatic hydrocarbon structure on PAH mineralization and toxicity to soil microorganisms after oxidative bioremediation by laccase. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 287, n. February, p. 117581, 2021.

ZENG, J. *et al.* Low-temperature thermally enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil: Effects on fate, toxicity and bacterial communities. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 335, n. May, p. 122247, 2023.

ZHANG, G. *et al.* The effects of different biochars on microbial quantity, microbial community shift, enzyme activity, and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Geoderma**, [s. l.], v. 328, n. December 2017, p. 100–108, 2018.

ZHANG, P. *et al.* Study on the Breeding and Characterization of High-Efficiency Oil-Degrading Bacteria by Mutagenesis. **Water**, [s. l.], v. 14, n. 16, p. 2544, 2022.

ZHAO, X. *et al.* Microbial diversity and activity of an aged soil contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 871–883, 2018.

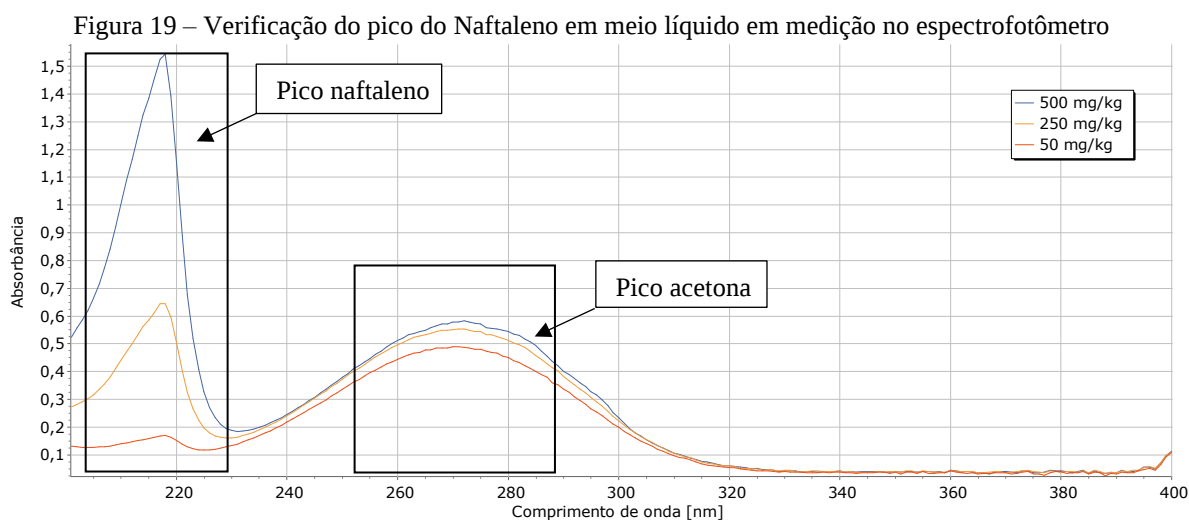
ZHAO, Z. *et al.* The ecological response and distribution characteristics of microorganisms and polycyclic aromatic hydrocarbons in a retired coal gas plant post-thermal remediation site. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 857, n. September 2022, p. 159314, 2023.

ZHENG, W.; CUI, T.; LI, H. Combined technologies for the remediation of soils contaminated by organic pollutants. A review. **Environmental Chemistry Letters**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 2043–2062, 2022.

APÊNDICE A – TESTES DE DETERMINAÇÃO DO NAFTALENO POR ESPECTROFOTOMETRIA

O teste da metodologia de quantificação do naftaleno por espectrofotometria teve como objetivo validar a aplicabilidade da adaptação da metodologia. Para testar a metodologia de quantificação do naftaleno foram realizados uma série de ensaios testes. Inicialmente, os testes focaram no equipamento a ser utilizado, pois os estudos realizados, bem como os métodos existentes sugerem a utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Foi testada a aplicação do Espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis Spectrometer) para verificação da capacidade do equipamento em detectar o contaminante alvo.

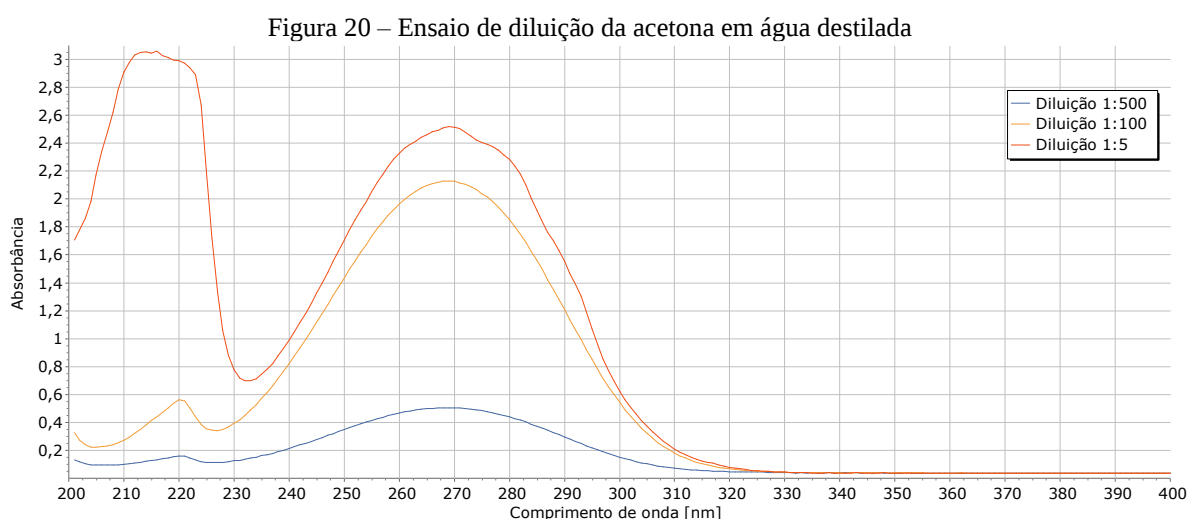
O uso do espectrofotômetro visa simplificar a quantificação de contaminantes – hidrocarbonetos, no solo; visto que este equipamento apresenta maior simplicidade, rapidez, robustez e baixo custo (Cloarec *et al.*, 2002). Assim, inicialmente verificou-se a capacidade do espectrofotômetro em quantificar o analito. Deste modo, a partir da leitura no espectrofotômetro foram avaliados três níveis de concentrações de naftaleno em solução, de modo que foi possível identificar o pico do contaminante entre 210 e 220 nm e o pico da acetona – aproximadamente em 270 nm (Figura 19); o que confirma a seletividade na detecção do naftaleno pelo equipamento.



Fonte: Autoria Própria.

Partindo para análise do solvente a ser utilizado, foram realizados ensaios com a acetona, o solvente a ser aplicado, visto que o método 3550C da EPA (US EPA, 2007) indica a utilização de acetona /diclorometano (1:1, v/v). Devido as características da acetona, principalmente sua alta miscibilidade em água e alta extração do naftaleno levaram a sua escolha como solvente deste estudo, além da indicação de aplicação de outros trabalhos (Cotta;

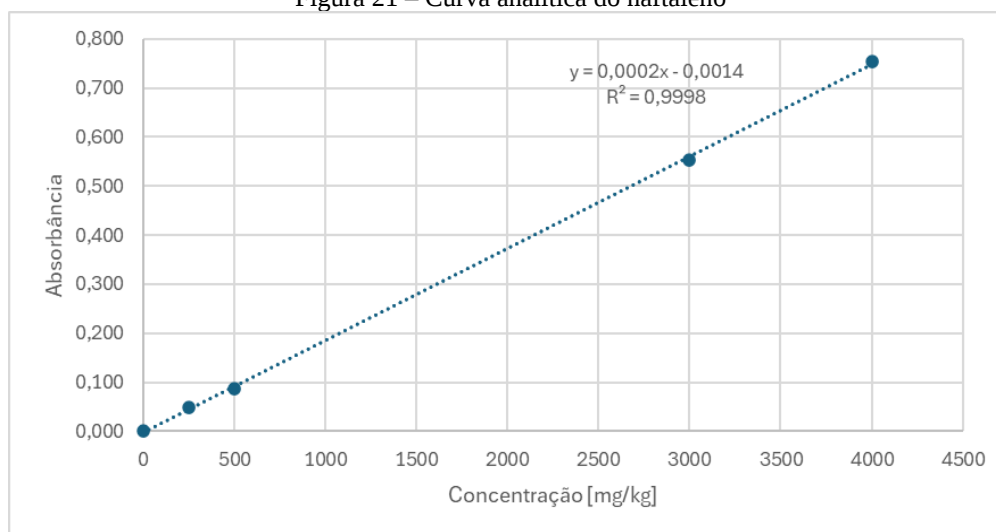
Rezende; Landgraf, 2009). A miscibilidade em água foi fundamental diante da necessidade de diluição da amostra para leitura no espectrofotômetro, pois foi observado que a diluição do naftaleno em acetona apresentou resultado fora da capacidade de medição do equipamento – altos valores de absorbância, acima de 2, em que o adequado seriam valores entre 0,1 e 1 (Skoog; Holler; Crouch, 2018). De modo a reduzir a resposta de absorbância e possibilitar a construção da curva analítica do contaminante foram testadas as seguintes proporções de diluição em água destilada: 1:1; 1:2; 1:5; 1:100 e 1:500. No ensaio de diluição foi verificado, visualmente e avaliando os valores de absorbância em faixa ótima de leitura, que a proporção de diluição de 1:500 possibilitou o melhor pico de detecção do naftaleno, em concentração de 500 mg/kg (Figura 20).



Fonte: Autoria Própria.

Após a seleção do equipamento, do solvente e da diluição foi realizado o ensaio para construção da curva analítica do naftaleno (Brito *et al.*, 2003; Ribani *et al.*, 2004). Assim, os procedimentos constituíram da elaboração de uma solução padrão estoque de 10.000 mg/kg, em acetona, que foi diluída separadamente em acetona nas seguintes concentrações: 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 mg/kg. Posteriormente estas soluções foram diluídas em água destilada na proporção 1:500 e assim foi realizada a leitura no espectrofotômetro. A curva construída contempla concentrações de 0 a 4000 mg de naftaleno/kg de solo (Figura 21) e possibilita a associação entre as concentrações e a absorbância medida.

Figura 21 – Curva analítica do naftaleno



Fonte: Autoria Própria.

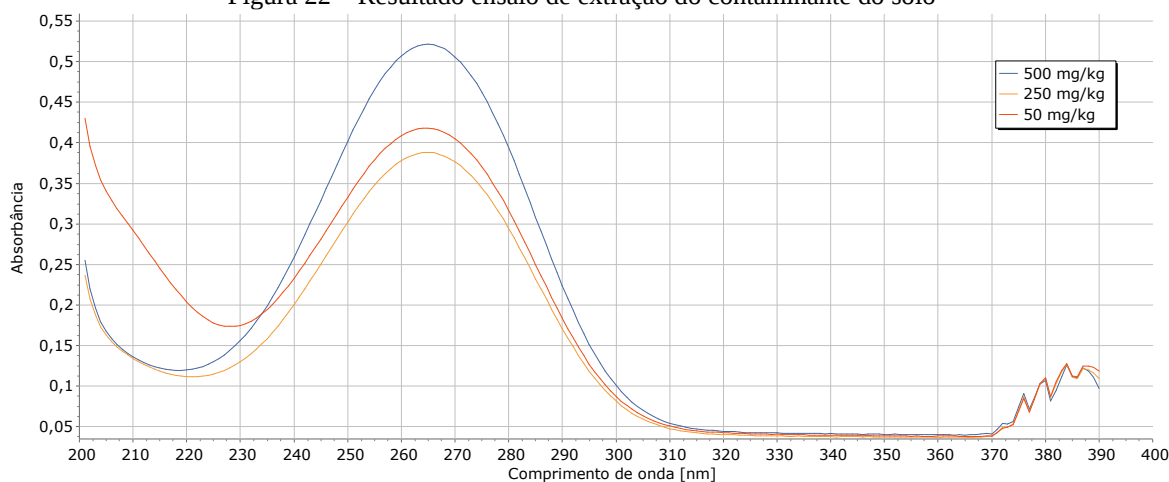
De posse da curva analítica, os ensaios de contaminação e extração do solo foram iniciados, pois até este ponto foram realizados ensaios apenas em meio líquido – acetona e água. A contaminação nos primeiros ensaios foi realizada conforme método descrito por Brinch, Ekelund e Jacobsen (2002). Nesse sentido, uma solução estoque de naftaleno dissolvido em acetona foi preparado, sendo utilizado volume adequado da solução para contaminação da amostra de solo. Após adição da solução em 25% da amostra, aguardou-se um período de 16 horas com a amostra aberta para evaporação do solvente orgânico da solução adicionada, após este período houve a homogeneização dos 75% de solo restantes.

Para o processo de extração foi utilizado o método de ultrassom: 2 g de solo de cada amostra foram pesados em um recipiente fechado, em seguida, foi adicionado 2 g de Sulfato de sódio anidro e 10 ml de solvente (Acetona), conforme método 3550C da EPA (US EPA, 2007). As amostras foram levadas para banho de ultrassom – ECO-SONICS Q 3.0/40-A, 40kHz, durante 30 min e centrifugadas por 15 min.

Para quantificar a concentração de naftaleno presente nas amostras, foi produzida uma curva analítica utilizando o Espectrofotômetro (PerkinElmer Lambda 25 UV/Vis Spectrometer), utilizando o solvente a ser aplicado na extração, de modo a simular as amostras que seriam posteriormente avaliadas. Uma varredura foi realizada na região do visível e ultravioleta, entre os comprimentos de onda de 200 e 700 nm, foi verificado pico de absorbância para o NAP em 220 nm, em que este comprimento utilizado para elaboração da curva.

Com base nesta metodologia, buscou-se validar o método de contaminação e extração para três níveis de contaminação – 50, 250 e 500 mg/kg, porém não foi verificado pico de leitura (Figura 22).

Figura 22 – Resultado ensaio de extração do contaminante do solo



Fonte: Autoria Própria.

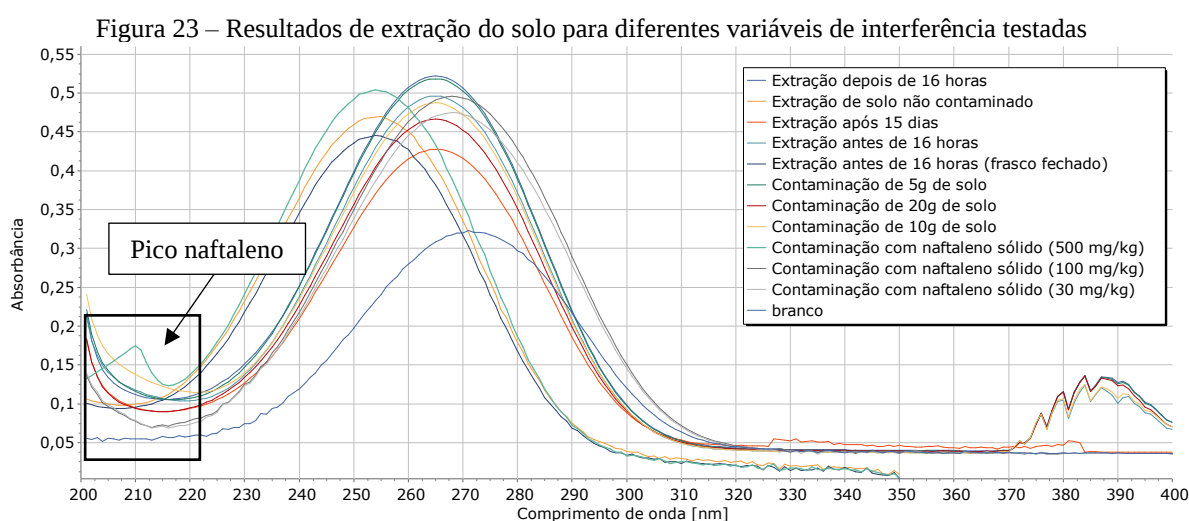
Como não foi identificada resposta por meio da metodologia de contaminação testada houve a repetição destes ensaios, avaliando as variáveis com possível interferência no processo de contaminação e extração do contaminante do solo. A Tabela 1 apresenta as variáveis e os ensaios realizados.

Tabela 4 - Variáveis e ensaios aplicados para verificação da metodologia de contaminação do solo

Variável	Ensaio realizado
Tempo de evaporação	Extração antes e depois das 16 horas de contaminação com naftaleno diluído em acetona
Perda do contaminante por volatilização	Extração realizada após 16 horas com frasco fechado
Interferência de outros compostos do solo na extração	Extração do solo com adição apenas da acetona, sem naftaleno
Massa de solo contaminado	Testes com massas pequenas (1 e 5 g), médias (10 g) e altas (25 g)
Tempo de exposição ao ultrassom	Testes com 30 e 60 minutos
Tempo de contaminação	Contaminação imediata e extração após 2 semanas
Porção de acetona adicionada	Adição da proporção de Brinch; Ekelund; Jacobsen (2002): 100 µl para 1 g de solo e o dobro: 200 µl para 1 g de solo
Formas de contaminação	Naftaleno diluído em acetona Naftaleno sólido – em pó

Fonte: Autoria Própria.

Assim, foram realizados diversos ensaios buscando identificar as variáveis com possíveis interferências, tanto no processo de contaminação, como na extração. Entretanto, os ensaios das variáveis avaliadas não proporcionaram resultado para mensuração do contaminante, embora houve baixa resposta, próximo ao branco, no comprimento de onda de detecção do analito para a contaminação com naftaleno sólido. A inexistência do pico relevante do naftaleno indica que nas amostras extraídas a concentração do contaminante se encontra abaixo dos limites de detecção do equipamento utilizado. Apenas altas concentrações de contaminação de Naftaleno (500 mg/kg) apresentaram picos de leitura no equipamento (Figura 23).



Fonte: Autoria Própria.

Portanto, a concentração do contaminante influencia diretamente na eficiência da detecção do naftaleno pelo espectrofotômetro (Ribani *et al.*, 2004), sendo esta uma limitação estrutural que impossibilitou quantificar a degradação do naftaleno, pois conforme o andamento do experimento a concentração presente nas amostras não seria detectada, devido à degradação do contaminante ao longo do tempo. Para futuros estudos indica-se a aplicação da metodologia original utilizando o HPLC ou ainda a associação do HPLC, UV-Vis e fluorescência (Cotta; Rezende; Landgraf, 2009).

A metodologia de contaminação do solo foi estabelecida conforme os testes de extração realizados, em que foi verificada melhor extração de solos contaminados com naftaleno sólido, em pó, portanto no experimento utilizou-se o composto sólido para contaminação do solo.