
ECOLOGIA

JULIA SANCHES GARCIA

**Biodegradabilidade de espuma formadora de filme
aquoso (AFFF) em solo através de método
respirométrico**



Rio Claro - SP
2023

Julia Sanches Garcia

Biodegradabilidade de espuma formadora de filme aquoso (AFFF) em solo através de método respirométrico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

Orientador: Prof^o Ederio Dino Bidoia

Coorientador: Renato Nallin Montagnolli

Rio Claro - SP
2023

G216b

Garcia, Julia Sanches

Biodegradabilidade de espuma formadora de filme aquoso (AFFF) em solo através de método respirométrico / Julia Sanches Garcia. -- Rio Claro, 2023
46 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Ederio Dino Bidoia

Coorientador: Renato Nallin Montagnolli

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Contaminação ambiental. 4. AFFF.
I. Título.

Julia Sanches Garcia

Biodegradabilidade de espuma formadora de filme aquoso (AFFF) em solo através de método respirométrico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

M.a. Carolina Rosai Mendes

Prof. Dr. Guilherme Dilarri

Aprovado em: 08 de novembro de 2023

Assinatura do discente

Assinatura do orientador

Assinatura do coorientador

À minha família.
Sem vocês, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Em todos os anos da minha graduação, muitas foram as vezes que me peguei pensando nesse momento. O momento em que, próximo à conclusão do curso, eu me sentaria para escrever os meus agradecimentos. Sempre pensei nas palavras que escreveria aqui, nas pessoas a quem eu dedicaria esse trabalho. Mas ao longo do tempo muitas coisas foram mudando, muitas pessoas passaram pela minha vida, adquiri muitos conhecimentos e experiências. Mas antes de agradecer a todas as pessoas que foram essenciais tanto para a conclusão deste trabalho, quanto para a conclusão da minha graduação, preciso parar para agradecer a mim.

Ao longo dos anos, pude perceber o quanto eu cresci. O quanto eu aprendi dentro da ecologia, o quanto eu posso fazer. Aprendi muito sobre a minha força, garra, perseverança, persistência, dedicação, e o quanto eu sou capaz de fazer o que eu quiser. Então eu gostaria de agradecer a mim por todas longas horas de estudo, pelas noites em claro, pelos perrengues, por levantar da cama todos os dias para fazer o que precisava ser feito. O caminho até aqui não foi fácil, mas todos os momentos e todas as coisas que passei me trouxeram até aqui, e por isso eu só tenho a agradecer.

À minha mãe, Elaine Cristina Sanches, amor da minha vida... Obrigada por ser você, por nunca ter saído do meu lado mesmo nos momentos mais difíceis, por ser minha melhor amiga, minha maior fã e apoiadora. Por me ensinar a ser forte e não desistir dos meus sonhos. Você é a mais fundamental de todas as peças que compõem a minha vida.

Ao Carlos Fernando Sanches, meu tio-avô, que foi uma peça-chave para a minha escolha... Obrigada por me apresentar a ecologia, por toda a ajuda, pelas caronas, pelo carinho, por ser uma das minhas maiores inspirações. Sou eternamente grata pela oportunidade de fazer um campo com você para o Pantanal, essa viagem ficará para sempre na minha memória.

Às minhas tias, Fernanda e Ana, por todo o amor, carinho e apoio, vocês são a minha base. À família Sanches, no geral. Ao meu ex-padrasto, Luciano Cecagno, pela amizade e pelo carinho, e ao meu padrasto, James, por toda a força. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus bichinhos de estimação, Taylor, Pirraça, Chokito, e também às minhas estrelinhas Boris, Floquinho e Wednesday. Obrigada por todo amor e companheirismo, principalmente nos dias difíceis.

Às amigadas que foram essenciais para a minha sobrevivência na graduação: Eduardo, Lyvia, Aron, Emmanuelli, Elias e Sandy, agradeço pela companhia, auxílio, conversas, desabafos, pequenos surtos do dia-a-dia, risadas e tudo mais. Muitas pessoas passaram pela minha vida nesses anos de graduação, e embora algumas não estejam mais aqui, deixo o meu eterno obrigada a todos que, de alguma forma, colaboraram para tornar a vida acadêmica mais agradável. E à República RepTil, obrigada por ser minha segunda casa por todos esses anos, sou muito grata aos meninos pela amizade, conversas e risadas.

Aos professores e técnicos que fizeram parte da minha formação, obrigada por todos os ensinamentos e orientações. Ao professor Milton Cezar Ribeiro pelas conversas, confiança e acolhimento, ao Laboratório de Ecologia Espacial e Conservação (LEEC) e o PELD CCM (Pesquisa Ecológica de Longa Duração - Corredor Cantareira Mantiqueira).

Ao meu orientador, Dr. Ederio Dino Bidoia, por todo o apoio e ensinamentos, por todas as conversas e principalmente pela empatia. Gostaria que todos pudessem ter um orientador como você!

Ao meu co-orientador, Renato Montagnolli, pelo auxílio.

À equipe do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, agradeço à Carolina e Pedro pelas orientações e auxílio durante o trabalho. E principalmente ao Eduardo Novaes, meu parceiro de laboratório, pelas muitas horas de experimento e análises, pelas conversas enriquecedoras, pela paciência e pela ajuda em todas as etapas do meu trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001.

“A fina camada de solo que forma uma cobertura remendada por sobre os continentes controla a nossa existência e a de todos os outros animais terrestres. Sem o solo, as plantas terrestres como as conhecemos não cresceriam, e sem as plantas, nenhum animal conseguiria sobreviver”.

(Carson, 1962, p. 57).

RESUMO

A Espuma Formadora de Filme Aquoso (AFFF) é uma ferramenta fundamental no combate aos incêndios de Classe B, provocados por líquidos inflamáveis. Seu uso, embora necessário em situações emergenciais, pode causar sérios impactos ao meio ambiente, devido a persistência, toxicidade e potencial bioacumulativo dos compostos perfluorclorados (PFC's) presentes no AFFF, podendo contaminar o solo, o lençol freático, o ar e os organismos vivos. No entanto, é possível minimizar o impacto ambiental utilizando técnicas de biorremediação, bioaugmentação e bioestimulação. Neste trabalho, o método respirométrico de Bartha e Pramer foi utilizado para avaliar a eficácia dessas técnicas, tendo como objetivo principal analisar a biodegradação e a toxicidade do AFFF através dos microrganismos do solo, da adição do tensoativo Tween 80 para bioestimulação e adição de uma cultura de *Bacillus subtilis* para bioaugmentação, além disso também foi analisada a toxicidade do solo antes e após o experimento através do uso de sementes de alface (*Lactuca sativa*). As análises foram conduzidas ao longo de 10 semanas, e ao final do experimento foi possível concluir que as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação auxiliaram no processo de biodegradação do AFFF.

Palavras-chave: biodegradação; biorremediação; contaminação ambiental; AFFF.

ABSTRACT

Aqueous Film-Forming Foam (AFFF) is a critical tool in combating Class B fires, which are caused by flammable liquids. Its use, while necessary in emergency situations, can have serious environmental impacts due to the persistence, toxicity, and potential bioaccumulation of perfluorinated compounds (PFCs) present in AFFF, which can contaminate soil, groundwater, air, and living organisms. However, it is possible to minimize the environmental impact by using bioremediation, bioaugmentation, and biostimulation techniques. In this study, the Bartha and Pramer respirometric method was used to evaluate the effectiveness of these techniques, with the main objective of analyzing the biodegradation and toxicity of AFFF by soil microorganisms, the addition of the surfactant Tween 80 for biostimulation, and the addition of a *Bacillus subtilis* culture for bioaugmentation. Additionally, soil toxicity was also analyzed before and after the experiment using lettuce seeds (*Lactuca sativa*). The analyses were conducted over a period of 10 weeks, and at the end of the experiment, it was possible to conclude that bioaugmentation and biostimulation techniques aided in the AFFF biodegradation process.

Keywords: biodegradation; bioremediation; environmental contamination; AFFF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tetraedro do fogo.....	14
Figura 2: Método de extinção da espuma.....	16
Figura 3: Esquema do respirômetro de Bartha e Pramer.....	24
Figura 4 - Conteúdos dos ensaios antes da homogeneização.....	25
Figura 5 - Barthas armazenados na B.O.D.....	25
Figura 6 - Disposição das sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) para o teste de fitotoxicidade.....	27
Figura 7 - Produção de CO ₂ (mg) ao longo do tempo (semanas).....	30
Figura 8 - Produção de CO ₂ (mg) acumulado ao longo do tempo (semanas).....	32
Figura 9 - Ensaio 1 (Controle).....	33
Figura 10 - Ensaio 4 (Tratamento de bioestimulação).....	34
Figura 11 - Ensaio 2 e 5 (Tratamentos de bioaumentação).....	35
Figura 12 - Ensaio 3 e 7 (Sem tratamento).....	36
Figura 13 - Ensaio 6, 8, 9 e 10 (Combinação dos tratamentos de bioaumentação + bioestimulação).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes e quantidades dos ensaios de biodegradação.....	26
Tabela 2 - Variação semanal da condutividade nos ensaios de biodegradação.....	29
Tabela 3 - Valores acumulados da condutividade dos ensaios de biodegradação.....	31
Tabela 4 - Número de sementes germinadas nos testes inicial e final.....	39
Tabela 5 - Dados do índice de crescimento das sementes no teste inicial.....	40
Tabela 6 - Dados do índice de germinação no teste inicial.....	41
Tabela 7 - Dados do índice de crescimento das sementes no teste final.....	42
Tabela 8 - Dados do índice de germinação no teste final.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFFF	Espuma formadora de filme aquoso
Ca	Cálcio
CO₂	Dióxido de carbono
CRA	Comprimento da radícula na amostra
CRC	Comprimento da radícula no controle negativo
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
ICR	Índice de crescimento radicular
IG	Índice de germinação
K	Potássio
KOH	Hidróxido de potássio
K₂CO₃	Carbonato de potássio
LGE	Líquido gerador de espuma
Mg	Magnésio
NFPA	Associação Nacional de Proteção à Incêndios
Na	Sódio
PFCs	Perfluorclorados
PFOs	Perfluorooctano sulfonato
SGA	Número de sementes germinadas na amostra
SGC	Número de sementes germinadas no controle negativo
Zn	Zinco
ZnSO₄	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Incêndios.....	14
1.2 Classes de incêndio e métodos de extinção.....	15
1.3 Espumas.....	15
1.4 Espuma Formadora de Filme Aquoso (AFFF) e seus usos.....	16
1.5 Contaminação ambiental.....	17
1.6 Biorremediação do solo.....	18
1.7 Respirômetro de Bartha e Pramer.....	19
1.8 Teste de fitotoxicidade.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 METODOLOGIA.....	22
3.1 Local de estudo.....	22
3.2 Amostra de solo.....	22
3.3 Preparo de reagentes e soluções.....	22
a) Tween 80:.....	22
b) Hidróxido de Potássio (KOH):.....	23
c) AFFF:.....	23
3.4 Ensaio de biodegradação.....	23
3.5 Testes de fitotoxicidade.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Ensaio de biodegradação.....	29
4.2 Testes de fitotoxicidade.....	38
4.2.1 Testes iniciais.....	39
4.2.2 Testes finais.....	41
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incêndios

O fogo é uma reação química exotérmica chamada combustão, onde ocorre a liberação de luz e calor. Para que essa reação ocorra, são necessários quatro elementos, sendo eles o combustível (substância capaz de queimar e possibilitar a propagação do fogo, pode estar em estado sólido, líquido ou gasoso), o comburente (elemento químico que alimenta a reação de oxidação e combustão), o calor (energia capaz de iniciar, manter e propagar a reação entre o combustível e o comburente) e a reação em cadeia (série de reações que geram calor, ativando a queima do combustível na presença do comburente, enquanto ambos estiverem disponíveis) (Flores, Ornelas & Dias, 2016). Esses elementos formam o tetraedro do fogo, representado pela Figura 1.

Figura 1: Tetraedro do fogo.



Fonte: Blog Gestão de Segurança Privada.

Quando o fogo não pode ser controlado pelo homem e tem o potencial de se alastrar, causando danos e destruição, é classificado como um incêndio. De acordo com o Manual de Bombeiros desenvolvido por Flores, Ornelas e Dias (2016), os incêndios podem ser classificados de acordo com a sua proporção e com o tipo de combustível. Os combustíveis possuem propriedades específicas em relação ao seu estado físico, natureza química e função, podendo queimar de diferentes formas.

1.2 Classes de incêndio e métodos de extinção

As classes de incêndio foram elaboradas pela NFPA, sigla para *National Fire Protection Association* (Associação Nacional de Proteção à Incêndios), que agrupou os incêndios pelas propriedades dos materiais combustíveis (NFPA 10, 2018). Essa classificação ajuda os bombeiros a determinarem a abordagem correta para o combate aos incêndios com base nas propriedades específicas dos combustíveis envolvidos. São elas:

Classe A - combustíveis sólidos comuns, tais como madeira, papel, tecido, plástico e borracha. Queimam em superfície e profundidade, deixando resíduos pós queima. O método mais utilizado para sua extinção é o resfriamento utilizando água. No entanto, gases, pós e espumas podem ser utilizados.

Classe B - líquidos inflamáveis, líquidos combustíveis e gases inflamáveis, tais como gasolina, óleo diesel, querosene, tintas e álcool. Queimam apenas em superfície, não deixando resíduos após a queima. Os métodos de extinção mais utilizados são o abafamento através das espumas, e a quebra da reação em cadeia através dos pós. No caso dos gases inflamáveis, é feito o isolamento, retirando ou controlando o material combustível.

Classe C - equipamentos submetidos à energia elétrica, tais como eletrodomésticos, eletrônicos e motores elétricos. Os métodos de extinção mais utilizados são o CO₂, que atua por abafamento, e os pós químicos, que agirão através do abafamento, resfriamento, quebra da reação em cadeia e proteção contra a irradiação do calor.

Classe D - metais combustíveis, tais como o Sódio (Na), Zinco (Zn), Magnésio (Mg), Potássio (K) e Cálcio (Ca). O método de extinção mais utilizado é o pó químico, que agirá através do abafamento, quebrando a reação em cadeia.

Classe K - óleos vegetais. O método de extinção utilizado é o extintor de Classe K, que possui uma base de acetato de potássio e funciona através da saponificação (criação de uma espuma que irá reter o vapor e extinguir o fogo).

1.3 Espumas

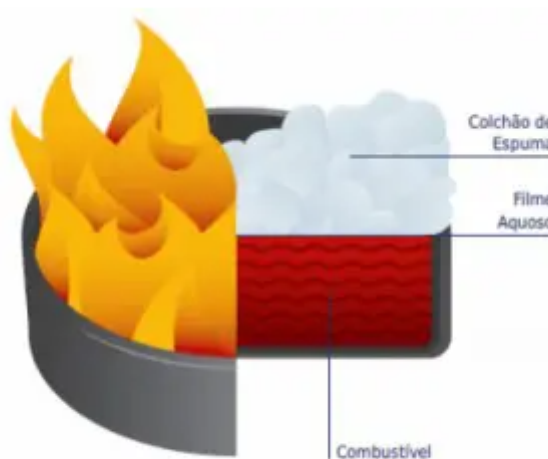
Para a extinção de incêndios de Classe B, foram desenvolvidas espumas como um método mais eficaz do que a água. Isso porque alguns líquidos são menos densos que a água, ou seja, flutuam sobre ela; e outros líquidos, como o álcool e a acetona, possuem a capacidade de se misturar com a água. As espumas possuem baixa densidade, se espalhando sobre a superfície do material em combustão, auxiliando na extinção do fogo através do abafamento e isolamento (Figueredo, 1998; Flores, Ornelas & Dias, 2016).

As espumas são sistemas termodinamicamente instáveis, com uma estrutura tridimensional formada por células líquidas e gasosas circundadas por uma membrana contínua. Essa estrutura se dá pelo agrupamento das bolhas geradas ao se dispersar um gás em um líquido que contém agentes espumantes (Figueredo, 1998).

É formada a partir da mistura de um líquido gerador de espuma (LGE) e água, tendo a introdução de ar através de um processo mecânico. Quando misturado à água, o LGE reduz a tensão superficial e a espuma garante maior aderência e penetração no combustível, se espalhando sobre o material em combustão, causando o abafamento através do isolamento entre o líquido inflamável e o oxigênio (Figueredo, 1998; Flores, Ornelas & Dias, 2016).

Na Figura 2, é possível observar como a espuma funciona na extinção do fogo:

Figura 2: Método de extinção da espuma.



Fonte: Bruno Alberto Gonçalves (2021).

1.4 Espuma Formadora de Filme Aquoso (AFFF) e seus usos

A Espuma Formadora de Filme Aquoso (AFFF, sigla para *aqueous film-forming foam*) foi desenvolvida pela Marinha Americana em 1962, tendo como base misturas de hidrocarbonetos e agentes fluorados tensoativos que permitem a formação do filme aquoso. É a espuma mais utilizada pelos Corpos de Bombeiros Militares (Figueredo, 1998; Flores, Ornelas & Dias, 2016; Montagnolli, 2015).

A AFFF é certificada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15511:2023) e pode ser utilizada com eficiência para a extinção de incêndios das classes A e B.

Nos incêndios florestais, a técnica mais utilizada no combate ao fogo é a água, devido a sua ampla disponibilidade, baixo custo e facilidade de transporte, além de possuir um calor específico alto. No entanto, a água evapora facilmente, e muitas vezes pode não ser suficiente para combater incêndios em condições de vento quente e seco. Por isso, aditivos químicos podem ser adicionados à água para aumentar a eficácia da supressão. Nesse caso, as espumas são utilizadas para diminuir a tensão superficial da água, aumentando a cobertura sobre os combustíveis e abafando o fogo, evitando o contato dos vapores inflamáveis com o ar e resfriando o combustível e sua superfície pela ação da mistura entre a água e a espuma (Timmermann, Pelozzi & De Oliveira, 2021).

Em incêndios que envolvem petróleo e seus derivados (óleo diesel, gasolina, querosene) é recomendado o uso das espumas para maior eficácia no combate ao fogo, pois são mais difíceis de extinguir devido ao grande volume de combustível disponível, que intensifica o fogo. Nesses casos, podem ser utilizadas em sistemas fixos (há um planejamento técnico adequado que evita que resíduos sejam liberados no ambiente) ou móveis (há um alto risco de poluição ambiental, os resíduos liberados no solo e na água possuem efeitos negativos) (Montagnolli, 2015).

1.5 Contaminação ambiental

Em situações emergenciais, onde há risco à vida e aos patrimônios locais, é imprescindível o uso de AFFF. No entanto, nesses casos, não há um uso racionado desse composto, ocorrendo a liberação de toneladas de AFFF no ambiente. Apesar de representarem uma vantagem no combate aos incêndios, podem causar danos a longo prazo na natureza devido a persistência, toxicidade e potencial bioacumulativo dos surfactantes compostos por perfluorclorados (PFCs), que possuem a capacidade de permear camadas profundas do solo, atingir o lençol freático, o ar e também os seres vivos (Montagnolli, 2015).

Tradicionalmente, as espumas para combate de incêndios Classe B eram compostas por fluorosurfactantes, produtos que possuem como base química o perfluorooctano sulfonato (PFOs), que ao se decomporem, geram produtos de degradação fluorados, que podem ser tóxicos, bioacumulativos e persistentes no ambiente (Moody e Field, 2000; Timmermann, Pelozzi & De Oliveira, 2021).

Os compostos perfluorclorados (PFCs) já foram detectados no ar, nas águas superficiais, residuais, subterrâneas, de chuva e potável, no solo e nos organismos vivos, incluindo o ser humano (Montagnolli, 2015).

A presença de espuma em ambientes aquáticos causa impacto negativo na qualidade da água, nos peixes e outras formas de vida, pois muitos dos íons presentes nesses compostos são letais para a vida aquática nas concentrações encontradas (Moody e Field, 2000; Timmermann, Pelozzi & De Oliveira, 2021).

Embora esses compostos sejam altamente resistentes, uma alternativa para diminuir o impacto ambiental é utilizar microrganismos. A degradação microbiana pode contribuir de forma significativa a longo prazo (Montagnolli, 2015).

1.6 Biorremediação do solo

A biorremediação é uma técnica de recuperação ambiental que utiliza os microrganismos para remover, reduzir ou transformar compostos poluentes em substâncias menos tóxicas. É uma tecnologia limpa, simples, eficaz e de melhor custo quando comparada com as alternativas convencionais, podendo ocorrer *in situ* (no local) e *ex situ* (fora do local contaminado) (Montagnolli, 2011).

Na biorremediação ocorre o processo de biodegradação, onde os microrganismos irão consumir o contaminante como fonte de energia, essas substâncias serão quebradas durante a atividade metabólica e transformadas em biomassa. Teoricamente, se o processo for 100% eficaz, o produto final seria água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂) (Montagnolli, 2011).

No caso de poluição por hidrocarbonetos, por exemplo, a biorremediação é o mecanismo mais eficiente para remover esses compostos do ambiente, pois estes são biodegradados primariamente por bactérias, leveduras e fungos, sendo as bactérias os agentes mais ativos (Montagnolli, 2011).

Neste trabalho, foram utilizadas duas técnicas de biorremediação, sendo elas:

- a) Bioaugmentação: consiste na inoculação de bactérias com potencial biodegradador para suplementação da microbiota local. Existem vários microrganismos que possuem potencial metabólico e são comumente utilizados em processos de biorremediação, dentre eles, podemos destacar o gênero *Bacillus*. (Montagnolli, 2011; Leonel, 2018).
- b) Bioestimulação: consiste na aplicação de nutrientes para promover o crescimento da microbiota local, ou de surfactantes (compostos orgânicos que promovem a atividade superficial) para promover o consumo do substrato a ser tratado (Montagnolli, 2011).

A respiração dos microrganismos do solo indica a atividade microbiana, o efeito da toxicidade e da biodegradação dos compostos orgânicos adicionados ao solo. Pode ser avaliada através da medida de consumo do oxigênio ou da produção de gás carbônico durante

o processo metabólico. Essa respiração pode ser avaliada em sistemas de fluxo contínuo ou em sistemas fechados (Cetesb, 1990).

1.7 Respirômetro de Bartha e Pramer

O Respirômetro de Bartha e Pramer (1965) é um sistema fechado, constituído por duas câmaras interligadas onde ocorre a biodegradação e a remoção do dióxido de carbono (CO₂) produzido. É um método simples e de baixo custo, sendo aceito como método adequado para determinar a biodegradação de resíduos no solo (Cetesb, 1990).

Utilizando os respirômetros, é possível avaliar a capacidade de biodegradação, bioaugmentação com a adição de uma cultura de *Bacillus subtilis*, e da bioestimulação com adição do surfactante Tween 80 diluído a 20%.

No entanto, é importante ressaltar que esse ensaio possui restrições, visto que é trabalhado em condições ideais de temperatura e pressão dentro do laboratório, se distanciando de situações reais.

1.8 Teste de fitotoxicidade

Em estudos ambientais, é imprescindível a realização de testes ecotoxicológicos para avaliar se a biodegradação reduziu o potencial tóxico do contaminante. Uma das formas de analisar o grau de toxicidade de um agente é a partir da germinação ou da não germinação de sementes.

A substância é considerada tóxica quando causa a mortalidade de pelo menos 40% dos organismos, e não tóxica quando a mortalidade é menor que 40% (Barbosa, 2000).

Em um estudo feito por Montagnolli (2011), foi feito o teste de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*) para demonstrar os efeitos da liberação do AFFF no ambiente. Nas sementes de alface, não houve germinação em nenhum dos ensaios contendo AFFF, mas as sementes sem exposição ao contaminante tiveram valores de germinação entre 90 e 100%, demonstrando que a acidez e os componentes orgânicos da substância podem ter inibido a germinação das sementes testadas. No entanto, ao longo do tempo ocorreu um aumento na germinação e consequente diminuição da toxicidade, e após 120 dias os ensaios com concentrações mais altas de AFFF continham cerca de 30 a 40% de germinação.

A alface é sensível à substâncias potencialmente tóxicas, por isso suas sementes são amplamente utilizadas em testes ecotoxicológicos. Além de agir como um bioindicador dos

possíveis riscos ao ambiente, é uma semente de rápida e fácil implementação, é confiável e é economicamente viável (Guevara et al, 2019; Vieira, Marcon e Droste, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos na biota pela biodegradação e toxicidade de AFFF por microrganismos em solo coletado na UNESP através do uso do método respirométrico de Bartha e Pramer, de acordo com a norma técnica da Cetesb.

2.2 Objetivos específicos

- I. Determinar a biodegradabilidade de AFFF em solo utilizando a atividade microbiana por respirometria;
- II. Analisar a bioestimulação através do uso do tensoativo Tween 80;
- III. Analisar a bioaumentação na degradabilidade de AFFF com presença de cultura de microrganismos;
- IV. Analisar a toxicidade do solo antes e depois da biodegradação dos contaminantes com o uso de sementes de rúcula (*Eruca sativa*) ou alface (*Lactuca sativa*);
- V. Analisar as variações na condutividade e pH ao longo do experimento.

3 METODOLOGIA

3.1 Local de estudo

O presente estudo foi desenvolvido na UNESP de Rio Claro, no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, situado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada.

3.2 Amostra de solo

O solo utilizado no experimento foi coletado no campus da UNESP de Rio Claro, próximo ao Departamento de Biologia Geral e Aplicada. Trata-se de um solo parcialmente arenoso (consistência parecida com areia, é permeável à água) e argiloso (consistência fina, impermeável à água).

Foi feita a coleta de 1 kg de solo e a peneiração em granulometria 1,68 mm para separação das diferentes frações do solo. Depois, foi armazenado em um recipiente coberto para utilização nos ensaios de biodegradação.

3.3 Preparo de reagentes e soluções

Estão listados abaixo os reagentes e soluções utilizados para a realização do trabalho, bem como o modo de preparo dos mesmos:

a) Tween 80:

É um tipo de surfactante. Os surfactantes agem como um detergente, diminuem o tamanho das gotas e aumentam a área superficial, permitindo uma maior penetração no combustível. Também permite que o ar e a água se misturem, formando uma barreira de espuma que isola o combustível do oxigênio (Timmermann, Pelozzi & De Oliveira, 2021). É utilizado em laboratórios no preparo de emulsões, com objetivo de diminuir a tensão superficial.

Para o preparo do Tween 80 (20%) foi pipetada uma parte do produto em um Becker, onde foi realizada a lavagem da ponteira com água ultra pura de osmose reversa. Com o auxílio de um bastão de vidro, a solução foi agitada lentamente até sua completa dissolução e transferida a um balão volumétrico, onde foi completada a proporção em 4 partes de água ultra pura de osmose reversa até atingir o volume de 20% do Tween 80.

b) Hidróxido de Potássio (KOH):

É um composto químico inorgânico, higroscópico (que absorve umidade do ar) altamente reativo, utilizado para neutralizar ácidos, reagir com sais, preparar soluções aquosas dentre outros.

Para o preparo da solução de KOH 0,2 M, foi pesada uma massa de 11,22 g de KOH, esse valor foi obtido ao se dividir o valor da massa molar dessa substância (56,1056 g) por 5. Essa massa foi diluída em um Becker contendo água ultra pura de osmose reversa e levada a um balão volumétrico contendo 1L de H₂O destilada e autoclavada.

A solução foi transferida para um recipiente de plástico fosco, pois reage com o vidro.

c) AFFF:

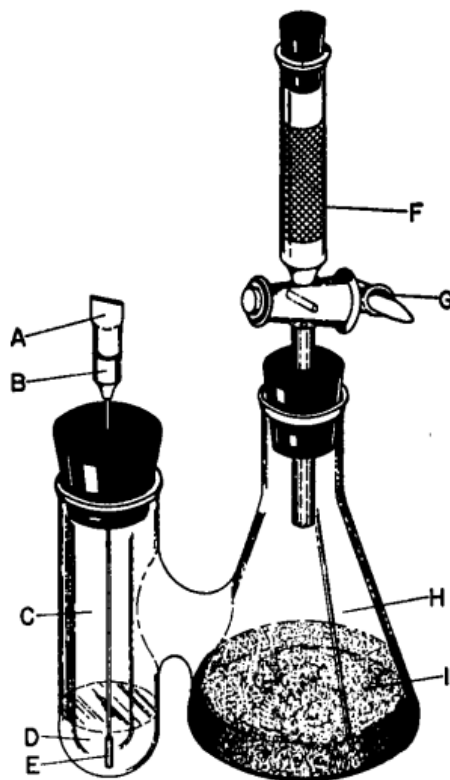
Não precisou ser diluído, pois utilizei a concentração própria do produto (6%).

3.4 Ensaio de biodegradação

A respiração do solo atua como um indicador de atividade microbiana. Esse comportamento pode ser avaliado através da medida do oxigênio consumido ou do gás carbônico produzido durante o processo de biodegradação de compostos orgânicos. Essa medida pode ser feita em sistemas de fluxo contínuo/sistemas fechados (Cetesb, 1990).

O respirômetro é um sistema fechado, constituído por duas câmaras interligadas, onde ocorre a biodegradação do resíduo e a remoção do CO₂ produzido no processo. Na Figura 3, é possível observar um esquema do respirômetro e seus principais componentes: a) tampa da cânula; b) cânula; c) braço lateral; d) solução de KOH; e) tubo; f) filtro de ascarita; g) válvula; h) frasco Erlenmeyer; i) solo (Bartha e Pramer, 1965; Cetesb, 1990).

Figura 3: Esquema do respirômetro de Bartha e Pramer.



Fonte: Retirado de Bartha e Pramer (1965).

Foram montados 10 ensaios de biodegradação em duplicatas, totalizando 20 frascos. O conteúdo dos ensaios variou na presença/ausência e quantidades do contaminante AFFF, da água ultrapura de osmose reversa, do surfactante Tween 80 (20%) e da cultura de microrganismos *Bacillus subtilis*. A única constante em todos os frascos é a quantidade de solo presente, sendo 50 g.

Para a montagem dos ensaios, o conteúdo de cada Bartha foi misturado até atingir um estado homogêneo (Figura 4). Os frascos foram armazenados em uma estufa incubadora BOD, a 28 °C (Figura 5).

Figura 4 - Conteúdos dos ensaios antes da homogeneização.



Fonte: autora.

Figura 5 - Barthas armazenados na B.O.D.



Fonte: autora.

Na Tabela 1, é possível observar os componentes e quantidades de cada frasco:

Tabela 1 - Componentes e quantidades dos ensaios de biodegradação.

Ensaio	Solo	AFFF 6 %	Água	Tween 80 (20%)	<i>Bacillus subtilis</i>
1	50 g	-	5,5 mL	-	-
2	50 g	-	-	-	5,5 mL
3	50 g	3 mL	2,5 mL	-	-
4	50 g	3 mL	1,5 mL	1 mL	-
5	50 g	3 mL	1,5 mL	-	1 mL
6	50 g	3 mL	1 mL	1 mL	0,5 mL
7	50 g	4 mL	1,5 mL	-	-
8	50 g	4 mL	-	1 mL	0,5 mL
9	50 g	2 mL	2 mL	1 mL	0,5 mL
10	50 g	4,5 mL	-	1 mL	0,5 mL

Fonte: autora.

Para que haja um monitoramento eficiente da taxa de formação de CO₂, é adicionado ao braço lateral do frasco 10 mL de uma solução de hidróxido de potássio (KOH), que irá reagir com o CO₂, capturando-o e formando carbonato de potássio (K₂CO₃) e água (H₂O) na solução.

Na metodologia tradicional, o KOH residual é titulado em uma solução padrão contendo ácido clorídrico (HCl) para quantificar a geração de CO₂ a partir do volume gasto de HCl (Cetesb, 1990). Para maior praticidade, eficiência e eliminação da probabilidade de erro humano, foi adotada uma metodologia desenvolvida por Faria, Marin-Morales e Angelis (2013), que utiliza medidas semanais de condutividade para confeccionar uma reta padrão. Através do uso de um condutivímetro, é possível medir a condutividade elétrica dos 10 mL de KOH residual misturados a 20 mL de água destilada isenta de CO₂.

O experimento foi realizado durante um período de 10 semanas (março de 2023 a maio de 2023), com análises semanais da condutividade. Ao final do experimento, foram calculados os níveis de CO₂ produzidos em função do tempo para cada ensaio.

3.5 Testes de fitotoxicidade

Para analisar a efetividade do processo de biodegradação dos tratamentos e se houve a remoção do AFFF, foram realizados ensaios de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) livres de melhoramentos genéticos e tratamentos. O teste foi feito antes e ao final do experimento, comparando a germinação e o crescimento radicular de cada amostra.

Para a montagem dos testes, todas as Placas de Petri foram devidamente esterilizadas. Cada placa recebeu um papel filtro, onde foram dispostas 20 sementes de alface conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Disposição das sementes de alface (*Lactuca sativa*) para o teste de fitotoxicidade.



Fonte: autora.

Os testes foram montados utilizando 1 g de solo de cada respirômetro e foram adicionados 4 mL de água ultra pura de osmose reversa. No controle positivo, foi utilizado 4 mL de sulfato de zinco (ZnSO_4) 0,05 mol, e no controle negativo foi utilizado 4 mL de água ultra pura de osmose reversa. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após a montagem, as placas foram identificadas, lacradas com plástico filme para evitar a perda de umidade e contaminação, cobertas por papel alumínio para simular um ambiente escuro e adequado para germinação, e, em seguida, foram levadas para uma incubadora B.O.D. à 21 °C por 120 horas (5 dias).

Após esse período, as placas foram retiradas da incubadora e submetidas à análise. As sementes germinadas foram contabilizadas, e com o auxílio de uma régua, as radículas foram medidas em centímetros.

Para a análise, foram calculados o Índice de Crescimento Radicular (ICR) e o Índice de Germinação (IG), utilizando as seguintes equações:

$$\text{ICR} = \text{CRA}/\text{CRC}$$

Onde:

ICR = Índice de Crescimento Radicular;

CRA = Comprimento da Radícula na Amostra;

CRC = Comprimento da Radícula no Controle Negativo.

$$\text{IG} = \text{ICR} \times (\text{SGA}/\text{SGC}) \times 100$$

Onde:

IG = Índice de Germinação;

SGA = Número de Sementes Germinadas na Amostra;

SGC = Número de Sementes Germinadas no Controle Negativo.

As amostras que apresentarem IG abaixo de 80% podem ser consideradas tóxicas, e acima de 80% podem ser consideradas não tóxicas (Youngi et al, 2012).

3.6 Análise de dados

Para determinar a eficácia da biodegradação do AFFF, os possíveis impactos nos ensaios bioestimulados pelo surfactante Tween 80 (20%), a efetividade da bioaumentação com *Bacillus subtilis* e a toxicidade do solo ao final do experimento, foi utilizado o software Excel para confecção dos gráficos e análise dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de biodegradação

Na Tabela 2, podemos observar os dados de condutividade coletados ao longo das 10 semanas de experimento.

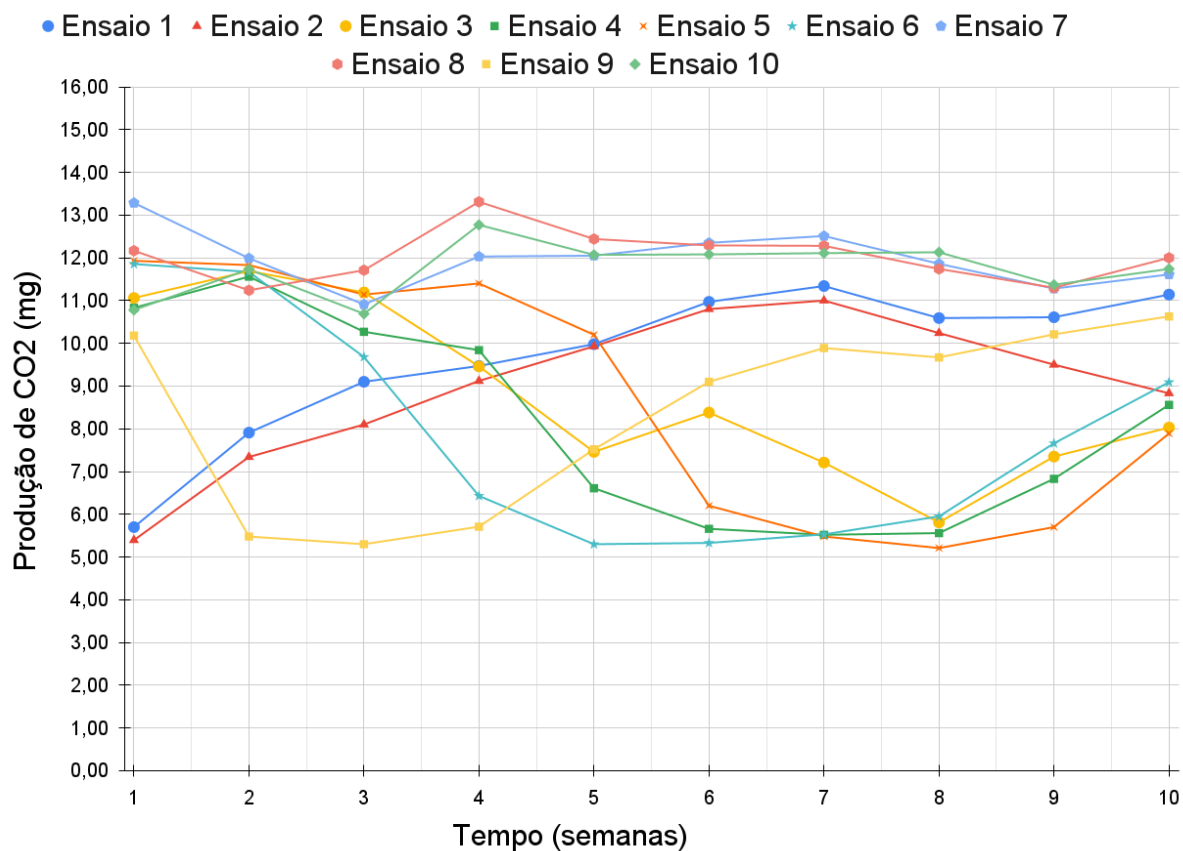
Tabela 2 - Variação semanal da condutividade nos ensaios de biodegradação.

Data/ amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22/03/2023	5,70	5,40	11,06	10,83	11,93	11,86	13,29	12,17	10,18	10,78
29/03/2023	7,91	7,34	11,69	11,56	11,83	11,67	11,99	11,24	5,48	11,73
05/04/2023	9,1	8,1	11,19	10,27	11,14	9,68	10,91	11,70	5,3	10,69
12/04/2023	9,47	9,12	9,46	9,84	11,4	6,43	12,03	13,31	5,71	12,77
19/04/2023	9,98	9,93	7,46	6,61	10,2	5,3	12,05	12,44	7,52	12,07
26/04/2023	10,97	10,8	9,38	5,66	6,2	5,33	12,35	12,29	9,1	12,08
03/05/2023	11,34	11	7,21	5,52	5,48	5,53	12,51	12,28	9,89	12,11
10/05/2023	10,59	10,24	5,81	5,56	5,21	5,95	11,86	11,74	9,67	12,13
17/05/2023	10,61	9,5	7,35	6,83	5,7	7,66	11,28	11,3	10,21	11,37
24/05/2023	11,14	8,82	8,03	5,56	7,89	9,09	11,61	12	10,36	11,74

Fonte: autora.

Através dos dados coletados, foi possível gerar um gráfico demonstrando a produção semanal de CO₂ advinda da respiração dos microrganismos em cada respirômetro (Figura 7).

Figura 7 - Produção de CO₂ (mg) ao longo do tempo (semanas).



Fonte: autora.

Para analisar a biodegradação em cada ensaio, foram somados os valores de condutividade semanal de cada sistema, resultando na produção de CO₂ acumulada ao longo do tempo (Tabela 3).

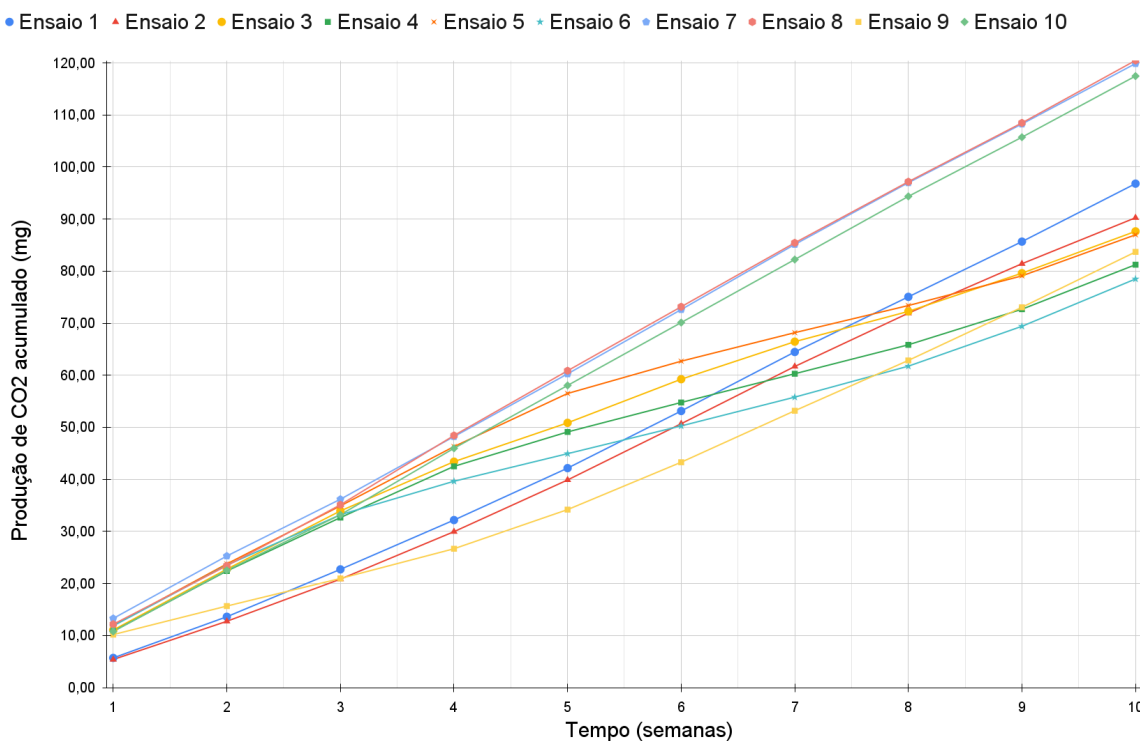
Tabela 3 - Valores acumulados da condutividade dos ensaios de biodegradação.

Data/ amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
22/03/2023	5,70	5,40	11,06	10,83	11,93	11,86	13,29	12,17	10,18	10,78
29/03/2023	13,61	12,74	22,75	22,39	23,76	23,53	25,28	23,41	15,66	22,51
05/04/2023	22,71	20,84	33,94	32,66	34,9	33,21	36,19	35,12	20,96	33,2
12/04/2023	32,18	29,96	43,4	42,5	46,3	39,64	48,22	48,43	26,67	45,97
19/04/2023	42,16	39,89	50,86	49,11	56,5	44,94	60,27	60,87	34,19	58,04
26/04/2023	53,13	50,69	59,24	54,77	62,7	50,27	72,62	73,16	43,29	70,12
03/05/2023	64,47	61,69	66,45	60,29	68,18	55,8	85,13	85,44	53,18	82,23
10/05/2023	75,06	71,93	72,26	65,85	73,39	61,75	96,99	97,18	62,85	94,36
17/05/2023	85,67	81,43	79,61	72,68	79,09	69,41	108,27	108,48	73,06	105,73
24/05/2023	96,81	90,26	87,64	81,24	86,98	78,5	119,88	120,48	83,69	117,47

Fonte: autora.

Através desses dados, foi possível originar um novo gráfico (Figura 8) com os valores de produção de CO₂ acumulado ao longo do tempo, o que permite avaliar a variação da respiração dos microrganismos dentro de cada ensaio, e quais foram os experimentos onde a biodegradação foi melhor sucedida.

Figura 8 - Produção de CO₂ (mg) acumulado ao longo do tempo (semanas).



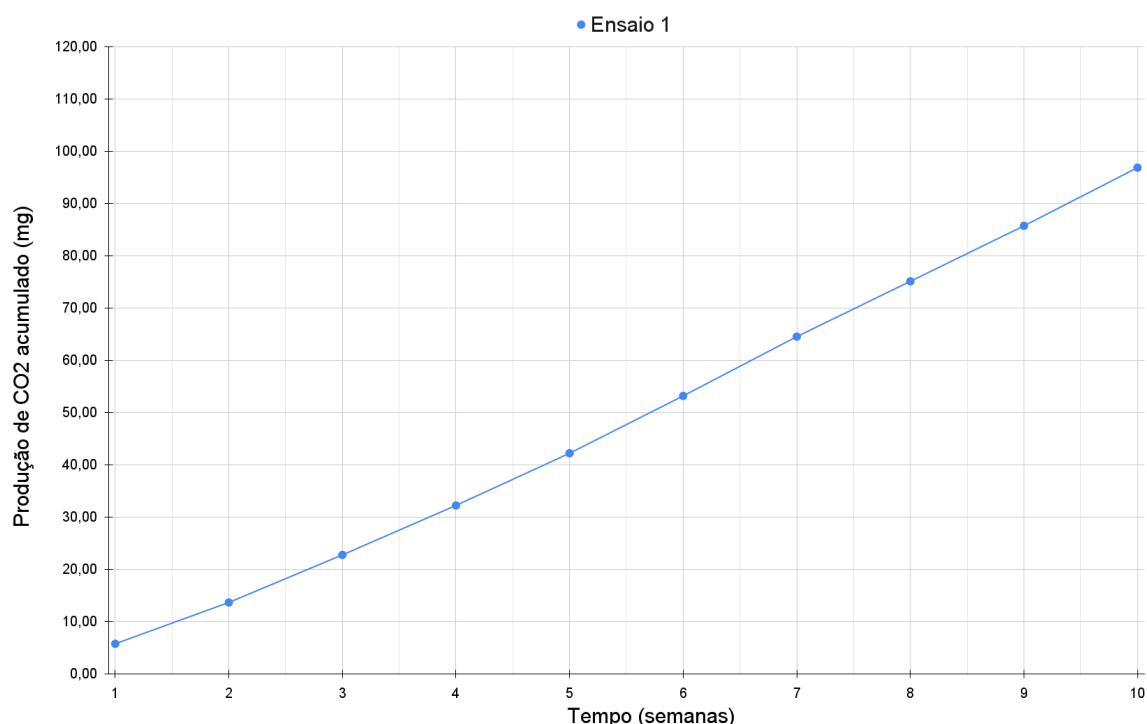
Fonte: autora.

Analisando a Figura 8, é possível observar que na primeira semana do experimento, os ensaios obtiveram valores semelhantes de produção de CO₂, o que pode indicar que a microbiota do solo estava se adaptando aos diferentes compostos presentes nos respirômetros, ou que não havia necessidade de consumir o contaminante devido os nutrientes presentes no solo.

O experimento 1 (50 g solo + 5,5 mL H₂O), representado pela Figura 9, é um ensaio controle, ou seja, não conta com a adição do contaminante AFFF, nem com os tratamentos de bioestimulação por Tween 80 (20%) ou bioaugmentação por *Bacillus subtilis*. Sendo assim, possui apenas os microrganismos naturais do solo.

Ao longo do tempo, é possível observar que o ensaio 1 teve uma das taxas mais baixas de produção de CO₂ até a sexta semana, tendo uma melhora a partir de então. Ao final do experimento, o ensaio tem uma curva de respirometria relativamente boa, apresentando o 4º valor mais alto (96,81 mg).

Figura 9 - Ensaio 1 (Controle).



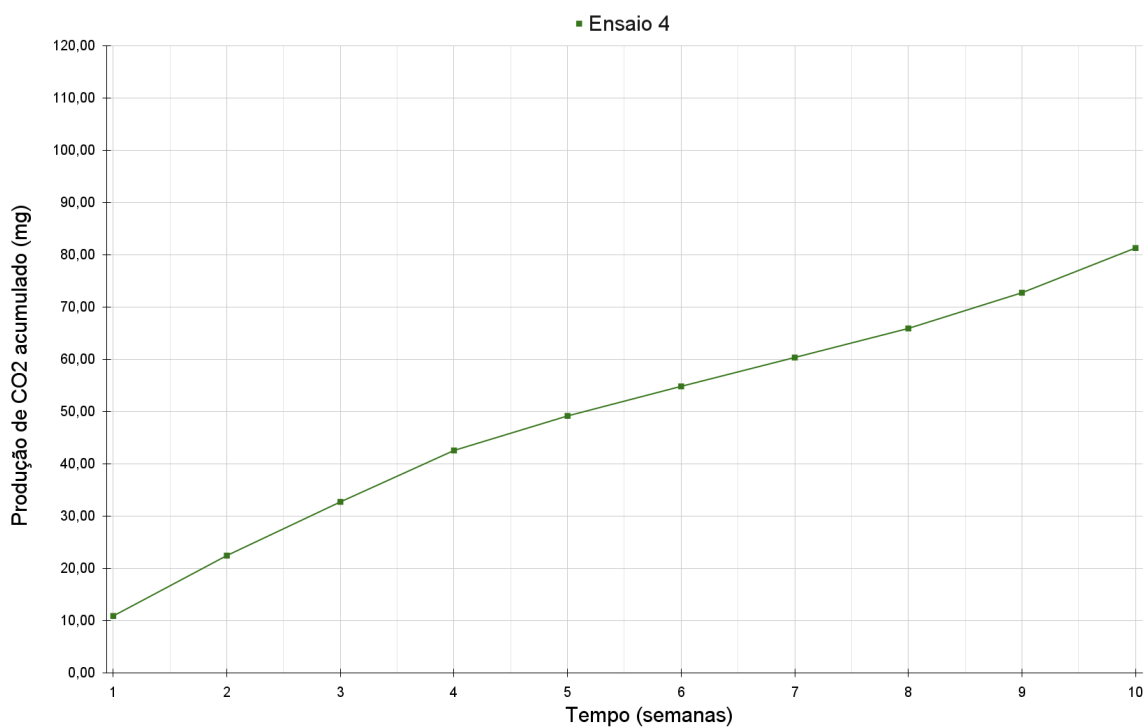
Fonte: autora.

O experimento 2 (50 g solo + 5,5 mL *B. subtilis*) possui uma curva similar à do experimento 1. Apresenta o valor mais baixo de produção de CO₂ nas duas primeiras semanas. Na terceira, apresenta valor similar ao experimento 9 (2 = 20,84 mg; 9 = 20,96 mg). Com o aumento da taxa de respiração, ultrapassa o experimento 9. Na sexta semana, apresenta valor um pouco maior que o experimento 6 (2 = 50,69 mg; 6 = 50,27 mg). Na sétima semana, ultrapassa o experimento 4 (2 = 61,69 mg; 4 = 60,29 mg). Na oitava semana atinge valores próximos de 3 e 5, até chegar ao 5º maior valor na taxa de respiração (90,26 mg), o que demonstra que a bioaugmentação não prejudica a produção de CO₂.

O experimento 3 (50 g solo + 3 mL AFFF + 2,5 mL H₂O) demonstra uma boa taxa de produção de CO₂ nas primeiras quatro semanas, a partir disso, começa a haver um leve declínio na curva de respirometria. Da oitava semana em diante, esse declínio se mostra mais acentuado, sendo o 6º maior valor na taxa de respiração (87,64 mg). Com a presença do contaminante AFFF na amostra e sem a aplicação dos tratamentos de bioaugmentação e bioestimulação, os microrganismos naturais do solo não demonstraram uma boa respirometria.

O experimento 4 (50 g solo + 3 mL AFFF + 1,5 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%)), representado pela Figura 10, é o único ensaio que contém isoladamente o tratamento com bioestimulação através do uso do surfactante Tween 80. Da primeira até a terceira semana, obteve valores parecidos com os experimentos 3, 5, 6, 7, 8 e 10, mas a partir de então passou a sofrer uma desaceleração na taxa de produção de CO₂ comparado aos outros experimentos. Da sétima semana em diante, a taxa desacelerou ainda mais, atingindo um dos valores mais baixos de respirometria ao final do experimento (81,24 mg), ficando acima somente do experimento 10 (78,50 mg). Apesar da adição do surfactante, que reduz a tensão superficial e facilita a respiração, os microrganismos naturais do solo não demonstraram aptidão na biodegradação do AFFF.

Figura 10 - Ensaio 4 (Tratamento de bioestimulação).



Fonte: autora.

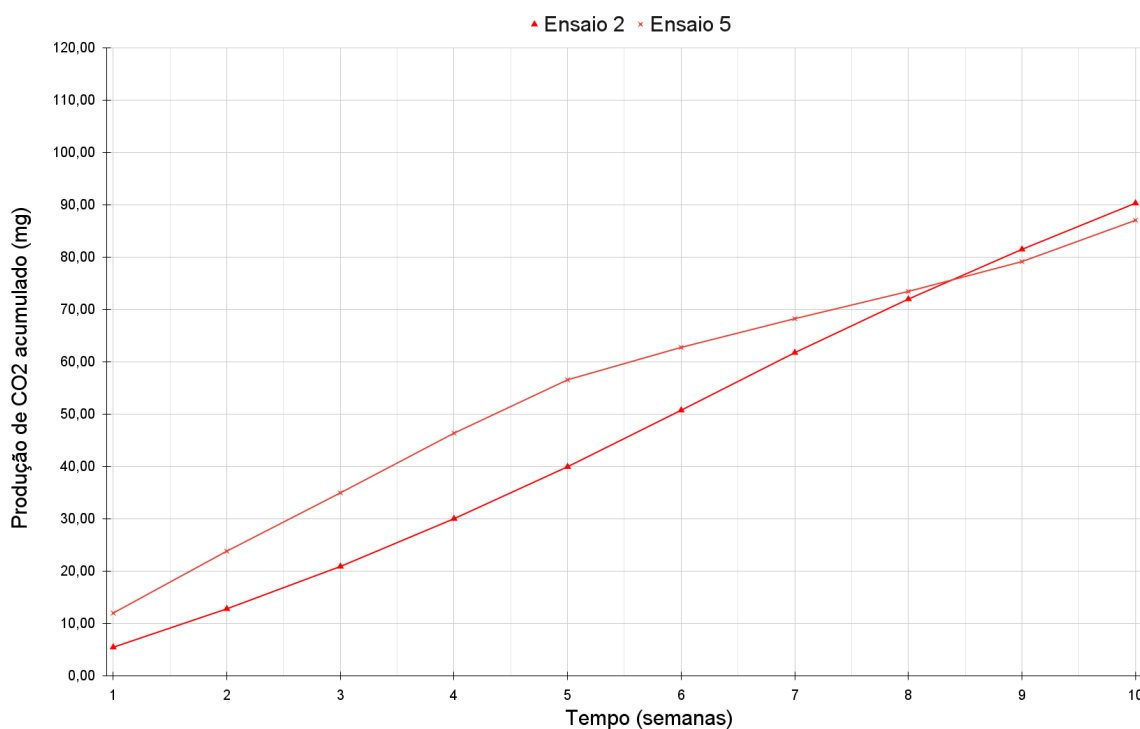
O experimento 5 (50 g solo + 3 mL AFFF + 1,5 mL H₂O + 1 mL *B. subtilis*) obteve valores muito próximos dos experimentos 3, 4, 6, 7, 8 e 10 nas primeiras quatro semanas. Na quinta, passou a ter valores similares ao ensaio 10 (5 = 56,5 mg; 10 = 58,04 mg), quase sobrepostos na Figura 8. A partir de então, passou a apresentar um declínio na taxa de produção de CO₂, que foi ainda mais marcante a partir da oitava semana, quando passou a

apresentar valores semelhantes ao do ensaio 3 (5 = 73,39 mg; 3 = 72,26 mg). Ao final do experimento, apresentou o 7º valor mais alto de respiração (86,98 mg).

Na Figura 11, podemos observar a relação entre os ensaios 2 (50 g solo + 5,5 mL *B. subtilis*) e 5 (50 g solo + 3 mL AFFF + 1,5 mL H₂O + 0,5 mL *B. subtilis*). Ambos contam com o tratamento de bioaumentação, no entanto, no ensaio 2 não há adição de contaminante ou água, demonstrando apenas os efeitos da adição de *B. subtilis* no solo. O ensaio 5, por outro lado, contém contaminante e água, além disso a quantidade de microrganismos adicionada foi bem menor.

Da primeira semana até a oitava, o ensaio 5 apresentou valores mais altos de produção de CO₂. A partir disso, há uma inversão e o ensaio 2 passa a apresentar melhores taxas de respiração até o final do experimento. Os resultados finais são, respectivamente, 2 = 90,26 mg e 5 = 86,98 mg.

Figura 11 - Ensaios 2 e 5 (Tratamentos de bioaumentação).



Fonte: autora.

O experimento 6 (50 g solo + 3 mL AFFF + 1 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) apresentou uma boa taxa de produção de CO₂ até a terceira semana, a partir de então obteve uma desaceleração na curva de respirometria. Da sexta semana em diante, foi decaindo em comparação aos outros sistemas, e na oitava semana ultrapassou o ensaio 9, que

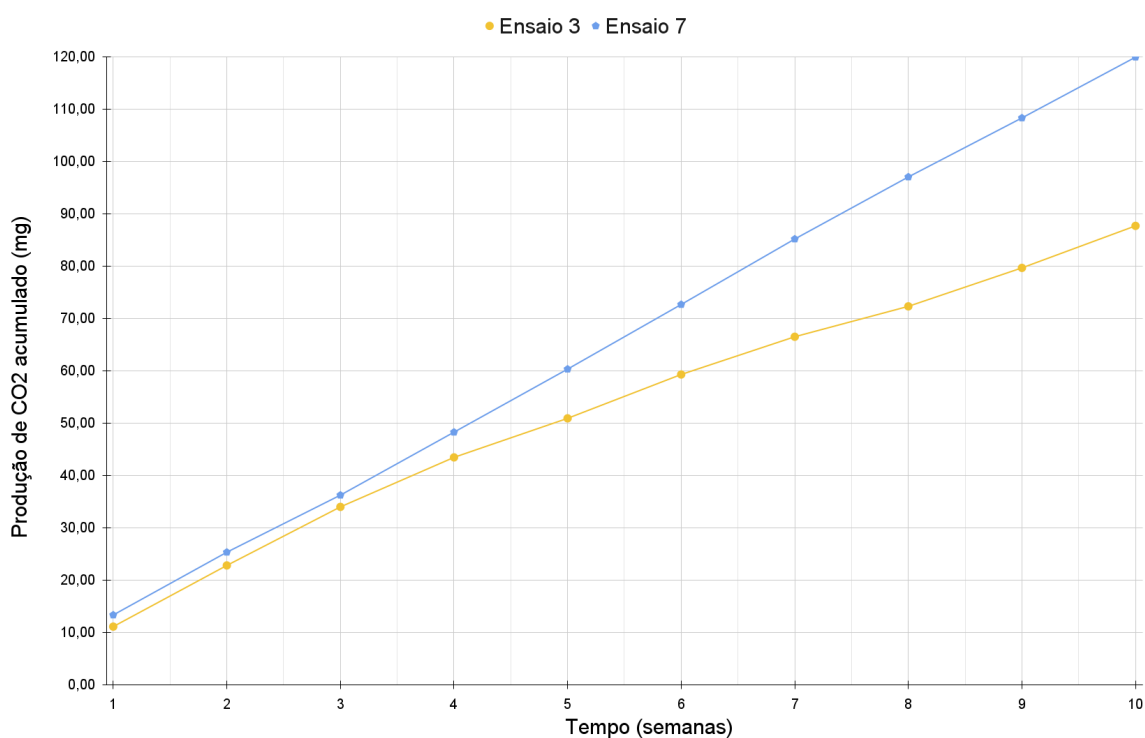
até então tinha o resultado mais baixo. Ao final do experimento, passou a apresentar o valor mais baixo de todos os ensaios, com valor acumulado de 78,50 mg.

O experimento 7 (50 g solo + 4 mL AFFF + 1,5 mL H₂O) apresentou os valores mais altos de produção de CO₂ nas primeiras três semanas. A partir da quarta semana, o ensaio 7 passou a ter uma sobreposição com o ensaio 8, ambos apresentando os valores mais altos da curva de respiração. Apesar de similar ao 8, o ensaio 7 passou a apresentar o segundo maior valor de produção de CO₂ nos ensaios, até chegar ao final do experimento, com valor de 119,88 mg.

Na Figura 12, é possível analisar os ensaios 3 (50 g solo + 3 ml AFFF + 2,5 mL H₂O) e 7 (50 g solo + 4 mL AFFF + 1,5 mL H₂O). Ambos tiveram os mesmos compostos e não contaram com tratamento de bioaugmentação e bioestimulação. No entanto, os compostos foram adicionados em diferentes quantidades para cada ensaio.

Apesar de terem valores aproximados nas primeiras três semanas, a partir da quarta começa a haver um descompasso entre os ensaios. O 7 passa a apresentar um crescimento na taxa de respiração dos microrganismos naturais do solo, atingindo um valor acumulado de 119,88 mg de CO₂ produzido, o que demonstra uma boa degradabilidade do contaminante. Enquanto isso, o 3 apresenta um declínio na taxa de respiração, atingindo um valor acumulado de 87,67 mg.

Figura 12 - Ensaios 3 e 7 (Sem tratamento).



Fonte: autora.

O experimento 8 (50 g solo + 4 mL AFFF + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) apresentou os segundos maiores resultados nas três primeiras semanas. Na quarta, teve uma sobreposição com o ensaio 7. Devido a similaridade nos resultados obtidos semanalmente, esses dois ensaios passam a quase se sobrepor até o final do experimento. No entanto, o ensaio 8 manteve os resultados mais altos até a última semana, apresentando um valor acumulado de produção de CO₂ de 120,48 mg, a maior curva de respirometria, demonstrando que este foi o ensaio com maior taxa de sucesso na biodegradação do AFFF.

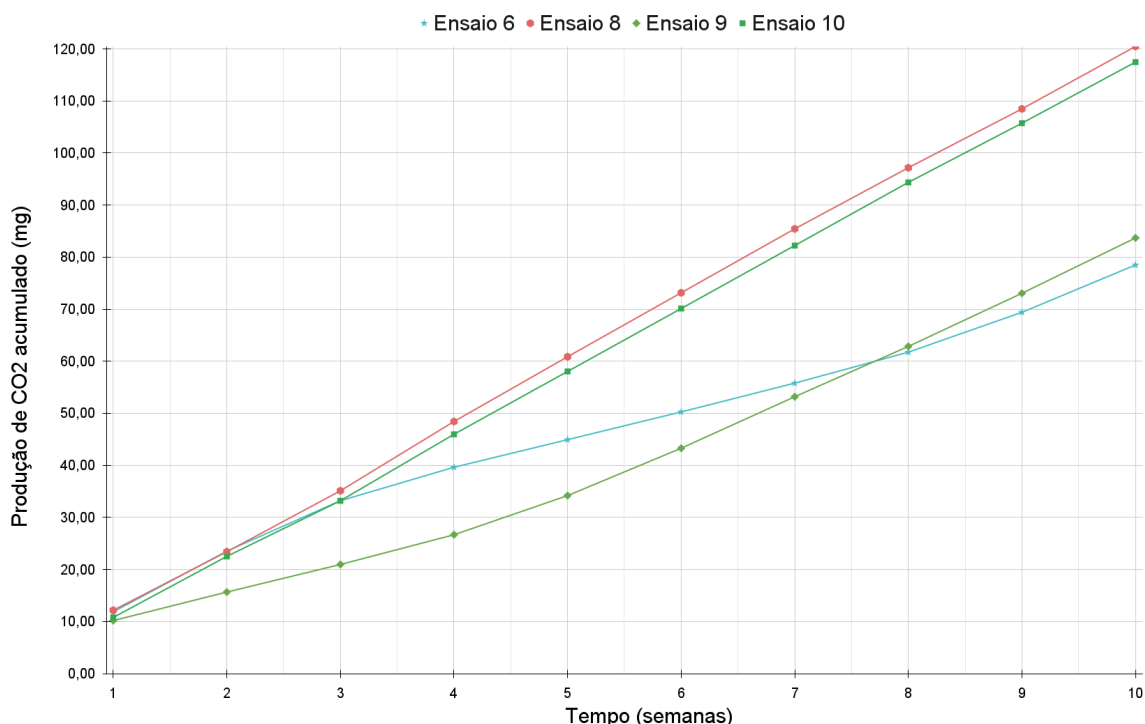
O experimento 9 (50 g solo + 2 mL AFFF + 2 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) apresentou uma baixa taxa de respiração desde a segunda semana. Na terceira, o valor se sobrepôs ao ensaio 2 (2 = 20,84 mg; 9 = 20,96 mg), apresentando os resultados mais baixos de produção de CO₂ até a oitava semana, quando passa a apresentar uma taxa de respiração maior do que no ensaio 6. Na semana seguinte, ultrapassou também o valor de 4, chegando ao final do experimento com a 8ª maior curva de respirometria (83,69 mg).

O experimento 10 (50 g solo + 4,5 mL AFFF + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) obteve uma boa taxa de produção de CO₂ durante todo o experimento. Isso se torna mais evidente a partir da quinta semana, quando passa a obter a 3ª maior curva de respirometria. Ao final do período de análises, o valor acumulado de produção de CO₂ atinge os 117,47 mg, sendo um dos ensaios com maior sucesso na biodegradação do AFFF.

Os experimentos 6 (50 g solo + 3 mL AFFF + 1 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*), 8 (50 g solo + 4 mL AFFF + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*), 9 (50 g solo + 2 mL AFFF + 2 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) e 10 (50 g solo + 4,5 mL AFFF + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) contam com a combinação dos tratamentos de bioaumentação com a adição de uma cultura de *Bacillus subtilis* e bioestimulação com a adição do surfactante Tween 80 (20%).

Na Figura 13, é possível observar as curvas de respirometria para cada um destes ensaios. O ensaio 6 obteve valores similares aos dos ensaios 8 e 10 nas três primeiras semanas. A partir de então, passou a obter resultados discrepantes até o final do experimento, apresentando valores mais baixos. Isso é facilmente observado a partir da oitava semana, quando ultrapassou o ensaio 9, que tinha os resultados mais baixos desde o início das análises. Uma possível explicação para a discrepância desses resultados é a composição dos sistemas. Nos ensaios 6 e 9 há a adição de água, enquanto nos ensaios 8 e 10 não há adição de água.

Figura 13 - Ensaios 6, 8, 9 e 10 (Combinação dos tratamentos de bioaugmentação + bioestimulação).



Fonte: autora.

Como citado anteriormente, os ensaios 8 e 10 apresentaram os maiores valores de produção de CO₂ acumulado, demonstrando maior sucesso na biodegradação do AFFF. Com isso, é possível considerar que a combinação do surfactante Tween 80 (20%) com a cultura de *B. subtilis* auxilia na degradação da matéria orgânica e do AFFF devido a atividade de emulsificação e quebra da tensão superficial, além da influência positiva da bioaugmentação na produção de CO₂ nesses sistemas.

4.2 Testes de fitotoxicidade

Os testes de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) demonstraram que os experimentos contaminados com AFFF obtiveram menores índices de germinação e índices de crescimento radicular, indicando que o contaminante impacta negativamente no desenvolvimento das sementes, tanto no teste inicial, quanto no teste final.

Na Tabela 4, podemos observar o número de sementes germinadas em cada placa de petri. Como os testes foram feitos em duplicatas, foi calculada a média do número de sementes que germinaram em cada placa para a aplicação nos cálculos.

Tabela 4 - Número de sementes germinadas nos testes inicial e final.

I N I C I A L	Teste	Número de sementes germinadas	F I N A L	Teste	Número de sementes germinadas
	Controle -	4,5		Controle -	1
	Controle +	0		Controle +	0
	1	3,5		1	0
	2	3,5		2	0
	3	0		3	0
	4	0		4	0
	5	0		5	1
	6	0		6	1
	7	0		7	0
	8	0		8	0,5
	9	0,5		9	0,5
	10	0		10	1

Fonte: autora.

4.2.1 Testes iniciais

Na Tabela 5, temos os valores de comprimento da radícula na amostra (CRA), comprimento da radícula no controle negativo (CRC) e índice de crescimento (ICR) das sementes para cada ensaio.

Tabela 5 - Dados do índice de crescimento das sementes no teste inicial.

Ensaio	CRA	CRC	ICR
1	1,21	1,21	1,00
2	1,14		0,94
3	0,00		0,00
4	0,00		0,00
5	0,00		0,00
6	0,00		0,00
7	0,00		0,00
8	0,00		0,00
9	0,25		0,21
10	0,00		0,00

Fonte: autora.

Na tabela 6, temos os valores do número de sementes germinadas na amostra (SGA), número de sementes germinadas no controle negativo (SGC) e índice de germinação (IG) das sementes para cada ensaio.

Tabela 6 - Dados do índice de germinação no teste inicial.

Ensaio	SGA	SGC	IG (%)
1	3,5	4,5	77,98
2	3,5		73,39
3	0		0,00
4	0		0,00
5	0		0,00
6	0		0,00
7	0		0,00
8	0		0,00
9	0,5		2,29
10	0		0,00

Fonte: autora.

Considerando os dados acima, que representam os valores obtidos nos ensaios antes do tratamento, os maiores valores relativos ao índice de germinação são, respectivamente, das amostras 1 (50 g solo + 5,5 mL H₂O) com 77% e 2 (50 g solo + 5,5 *B. subtilis*) com 73,39%. A amostra 9 (50 g solo + 2 mL AFFF + 2 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) obteve 2,29%, e as demais placas não apresentaram sementes germinadas.

As placas referentes aos ensaios 1 e 2 são as únicas que não contém AFFF em sua composição. Isso demonstra que a aplicação do AFFF no solo impacta negativamente na germinação e no crescimento das sementes. De acordo com Youngi et al. (2012), amostras que apresentam IG abaixo de 80% podem ser consideradas tóxicas.

4.2.2 Testes finais

Na Tabela 7, temos os valores de comprimento da radícula na amostra (CRA), comprimento da radícula no controle negativo (CRC) e índice de crescimento (ICR) das sementes para cada ensaio.

Tabela 7 - Dados do índice de crescimento das sementes no teste final.

Ensaio	CRA	CRC	ICR
1	0	1,6	0,00
2	0		0,00
3	0		0,00
4	0		0,00
5	0,75		0,47
6	0,3		0,19
7	0		0,00
8	0,35		0,22
9	0,15		0,09
10	0,55		0,34

Fonte: autora.

Na tabela 8, temos os valores do número de sementes germinadas na amostra (SGA), número de sementes germinadas no controle negativo (SGC) e índice de germinação (IG) das sementes para cada ensaio.

Tabela 8 - Dados do índice de germinação no teste final.

Ensaio	SGA	SGC	IG (%)
1	0	1	0,00
2	0		0,00
3	0		0,00
4	0		0,00
5	1		46,88
6	1		18,75
7	0		0,00
8	0,5		10,94
9	0,5		4,69
10	1		34,38

Fonte: autora.

Observando os dados acima, que representam os valores obtidos nos ensaios após o tratamento, os maiores valores relativos ao índice de germinação são, respectivamente, das amostras 5 (50 g solo + 3 mL AFFF + 1,5 mL H₂O + 1 mL *B. subtilis*) com 46,88%, 10 (50 g solo + 4,5 mL AFFF + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) com 34,38%, 6 (50 g + 3 mL AFFF + 1 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) com 18,75%, 8 (50 g solo + 4 mL AFFF + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) com 10,94% e 9 (50 g solo + 2 mL AFFF + 2 mL H₂O + 1 mL Tween 80 (20%) + 0,5 mL *B. subtilis*) com 4,69%. É possível notar que nenhuma amostra obteve IG acima de 80%, sendo assim, todas podem ser consideradas tóxicas.

Ao analisar a Figura 8 e as Tabelas 8 e 9, é notável que, dentre as amostras que apresentaram germinação, 8 e 10 foram os que apresentaram as maiores taxas de produção de CO₂, ou seja, apresentaram maior sucesso na biodegradação do AFFF (Figura 6). A amostra 5 apresentou o maior índice de germinação (46,88%), mas obteve uma das menores taxas de produção de CO₂, assim como as amostras 6 e 9. O ensaio 7, que obteve a segunda maior taxa de produção de CO₂, não apresentou germinação no teste de fitotoxicidade.

Outro ponto importante a se considerar é que mesmo no controle negativo o número de sementes e o índice de germinação foram baixos. Na amostra 1 (50 g solo + 5,5 mL H₂O) o índice de germinação no teste inicial apresentou um valor próximo a 80%, no entanto, não apresentou germinação no teste final, o que pode indicar um possível problema no lote de sementes que não foi detectado inicialmente.

5 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, foi possível observar que as técnicas de bioaumentação com a cultura de *Bacillus subtilis* representa uma influência positiva na produção de CO₂ nos Barthas, e de bioestimulação com a adição do surfactante Tween 80 (20%), que age quebrando a tensão superficial e promovendo a emulsificação auxiliaram no processo de biodegradação do contaminante AFFF.

Os testes de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) demonstraram um geral baixo índice de germinação em comparação com o controle negativo, no início e no final dos experimentos, indicando a influência negativa da presença desse contaminante para o desenvolvimento das sementes e a toxicidade das amostras, mesmo após os tratamentos de biodegradação.

São necessários novos estudos para analisar a toxicidade do AFFF e descobrir outros possíveis tratamentos de biodegradação, que não ofereçam riscos ao meio ambiente e que apresentem ampla disponibilidade e baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). 2023. *ABNT NBR 15511: Líquido Gerador de Espuma*.

BARBOSA, R. M. **Avaliação do impacto de lodos de estação de tratamento de água à biota aquática através de estudos toxicológicos**. 2000, 200p. Tese (doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2000.

BARTHA, R. & PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BLOG GESTÃO DE SEGURANÇA PRIVADA. **Teoria Básica do Fogo - Conceito e Triângulo do Fogo**. Disponível em <<https://gestaodesegurancaprivada.com.br/teoria-basica-do-fogo>>. Acesso em: 31/05/2023.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. 1. ed. São Paulo: Gaia, 2010. E-book. Disponível em: <https://plataforma.bvirtual.com.br>. Acesso em: 19 set. 2023.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. Solos - Determinação da Biodegradação de resíduos - Método respirométrico de Bartha. São Paulo: CETESB, 1990. 15p. (Norma Técnica L6350).

FARIA, A. U.; MARIN-MORALES, E. & ANGELIS, D. F. **Manual de protocolos de laboratório**. Rio Claro: Departamento de Bioquímica e Microbiologia - UNESP - IB, 2013.

FIGUEREDO, R. C. R.; RIBEIRO, F. A. L.; SABADINI, E. *Ciências de Espumas - Aplicação na Extinção de Incêndios*. Química Nova, v. 22, p. 126-130, 1998.

FLORES, B.; ORNELAS, E.; DIAS, L. E. **Fundamentos de combate a incêndio - Manual de Bombeiros. Goiânia (GO): Corpo de Bombeiros Militar do Estado de Goiás**, 2016.

GONÇALVES, B. A. **Líquido Gerador de Espuma (LGE)**. Teros, 2021. Disponível em <https://terosincendio.com.br/liquido-gerador-de-espuma-lge/>. Acesso em 15 de setembro de 2023.

GUEVARA, M. D. F. et al. Fitotoxicidade em águas residuárias domésticas utilizando sementes como bioindicadores. **Revista DAE**, v. 67, n. 216, p. 44-51, 2019.

LEONEL, Lillian Vieira et al. Biorremediação do solo. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 26, n. 51, p. 37-52, 2018.

MONTAGNOLLI, R. N. Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. 2011. 249 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rio Claro/SP.

MONTAGNOLLI, R. N. Incêndios de petróleo e petroquímicos: Biorremediação de áreas afetadas. 2015. 267 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rio Claro/SP.

MOODY, C. A.; FIELD, J. A. Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environmental science & technology*, v. 34, n. 18, p. 3864-2870, 2000.

National Fire Protection Association (NFPA). (2018). *NFPA 10: Standard for Portable Fire Extinguishers*.

TIMMERMANN, M. A. S.; PELOZZI, T. L. A.; DE OLIVEIRA, A. A. M. Utilização de espumas biodegradáveis no combate a incêndios florestais. **Ignis: Revista Técnico Científica do Corpo de Bombeiros Militar de Santa Catarina**, v. 6, n. esp., p. 1-15, 2021.

VIEIRA, C.; MARCON, C.; DROSTE, A. Phytotoxic and cytogenotoxic assessment of glyphosate on *Lactuca sativa* L. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, 2022.

YOUNGI et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 76, p. 182-186, 2012.