

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**ANÁLISE DA BIODEGRADAÇÃO E ECOTOXICIDADE DE QUEROSENE DE
AVIAÇÃO E ESPUMA FORMADORA DE FILME AQUOSO EM SOLO**

Maurício Miguel Fragali Pane

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia (orientador)

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (coorientador)

Rio Claro (SP)

2022

MAURÍCIO MIGUEL FRAGALI PANE

**ANÁLISE DA BIODEGRADAÇÃO E
ECOTOXICIDADE DE QUEROSENE DE
AVIAÇÃO E ESPUMA FORMADORA DE
FILME AQUOSO EM SOLO**

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro Ambiental.

Rio Claro – SP

2022

P191a Pane, Maurício Miguel Fragali
Análise da biodegradação e ecotoxicidade de querosene de aviação
e espuma formadora de filme aquoso em solo / Maurício Miguel
Fragali Pane. -- Rio Claro, 2022
54 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia
Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia
Coorientador: Renato Nallin Montagnolli

1. Biodegradação. 2. Hidrocarbonetos. 3. Surfactantes. 4. Solos. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

MAURÍCIO MIGUEL FRAGALI PANE

**ANÁLISE DA BIODEGRADAÇÃO E ECOTOXICIDADE DE
QUEROSENE DE AVIAÇÃO E ESPUMA FORMADORA
DE FILME AQUOSO EM SOLO**

Trabalho de Formatura apresentado ao
Instituto de Geociências e Ciências
Exatas - Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho, para obtenção do grau de
Engenheiro Ambiental.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (coorientador)

Profa. Dra. Elis Marina Turini Claro

Profa. Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Rio Claro, 09 de março de 2022

Maurício Miguel Fragali Pane

Assinatura do aluno

Renato N. Montagnolli

assinatura do coorientador

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que tanto amo, Marina Pane e Marcos Pane, por acreditarem em mim e em meu propósito de impactar positivamente o mundo como Engenheiro Ambiental. Mesmo com diversos obstáculos enfrentados, vocês batalharam diariamente para concretizar minha tão almejada formação. Tenho muito orgulho e admiração por vocês.

Aos meus irmãos, Mariana Pane, Manoela Pane e Marcos Pane, que desde o meu ingresso na universidade me acolheram e incentivaram a buscar o máximo de experiências que a querida UNESP poderia me proporcionar. De Presidente Prudente a Bauru e Araraquara, o laço fraternal e unespiano de vocês me inspiraram e me motivaram a alcançar grandes feitos.

Aos meus queridos Giuliana Relva, Rogério Vilela, Thales Leandro e Eduardo Santos, que sempre acreditaram no meu potencial e me ajudaram em cada desafio. Vocês foram e são grandes referências para mim no âmbito pessoal e profissional, exemplificando o sentido de determinação, inovação, qualidade e empatia.

Aos meus amigos que a UNESP me apresentou, Karina Chung, Soraya Carvalho, Larissa Carnicel, Natalia Garcia, Mikaella Uemura, Thaís Yoshinaga, Júlia Martins, Filipe Ribeiro, Carolina Hotta, Bruna Ferrari, Gabriela Veneziani e Rafaela Flores. Considero-me uma pessoa de sorte por ter cruzado o caminho de vocês e poder aprender tanto com cada um.

Aos meus professores Dra. Vânia Rosolen, Me. Francisco Bauke, Dra. Clauciana Schmidt, Dr. Northon Penteado, Dra. Telma de Souza, Dr. André Rodrigues, Dra. Carolina Barbosa, Dr. Pedro Brasil, Dr. Marcus de Castro e Dra. Livia Helene, por lecionarem conhecimentos da estrutura curricular e serem grandes exemplos de profissionais de excelência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, ao meu coorientador Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli e aos meus colegas de trabalho, Marina Turini, Carolina Rosai, Rubens Moraes, Jaqueline Matos e Pedro Mainardi, por todo aprendizado e assistência fornecidos durante todo o tempo de pesquisa.

Ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Jardim Experimental do Instituto de Biociências de Rio Claro e ao Aeroporto Internacional de Viracopos, por proporcionarem infraestrutura, amostras e equipamentos necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa por meio do programa PIBIC.

Você não pode passar por um único dia sem causar algum impacto no mundo ao seu redor. O que você faz, faz a diferença, e você tem que decidir o tipo de diferença que deseja fazer.

— Jane Goodall

RESUMO

Exercícios de emergência aérea são obrigatórios a cada três anos nos aeroportos brasileiros. Tais simulações liberam espumas formadoras de filme aquoso (AFFF) e querosene de aviação (QAV) no solo local. A presença de compostos fluorados na composição química da AFFF representa elevado risco de contaminação ambiental, decorrente da sua persistência e do potencial bioacumulativo. Já os hidrocarbonetos presentes no QAV não são inibidores de atividade microbiana, porém sua liberação diretamente no solo pode contaminar aquíferos e nascentes. Portanto, analisar a biodegradação e a ecotoxicidade de contaminantes provenientes de simulações de emergência aérea é fundamental para estabelecer a eficiência da biorremediação do solo e avaliar riscos ambientais em longo prazo. Para tanto, foram elaborados ensaios com solos da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP) que analisaram a biodegradação da AFFF e do QAV por meio da respirometria de Bartha e Pramer e modelagem matemática, ao passo que a ecotoxicidade foi analisada via métodos de disco-difusão de Kirby-Bauer e de germinação de sementes. Embora tenha ocorrido a biodegradação dos contaminantes nos ensaios, é provável que subprodutos da degradação potencialmente tóxicos sejam acumulados no meio. Além disso, fatores como a concentração e a composição química do contaminante influenciam no seu potencial de biodegradação. O emprego do método de disco-difusão de Kirby-Bauer evidenciou o potencial biorremediador de um microrganismo nativo do solo de VCP. O índice de germinação de sementes foi afetado por altas concentrações de AFFF e em situações de cocontaminação com QAV. Por fim, este estudo propõe que sejam elaborados planos de manejo e de remediação do solo após simulações de emergência aérea frente ao efeito ambiental negativo da AFFF e QAV. O emprego da biorremediação do solo e do desenvolvimento de biossurfactantes financeiramente acessíveis também é essencial para garantir menor impacto ambiental após simulações de emergência aérea, que devem ser rigorosamente fiscalizadas do ponto de vista ambiental pelas autoridades competentes.

Palavras-chave: AFFF, contaminação, degradação, QAV, toxicidade.

ABSTRACT

In Brazilian airports, fire emergency exercises are mandatory every three years. Such practices release aqueous film-forming foam (AFFF) and jet fuel (QAV) in the soil. Fluorinated compounds in the AFFF chemical composition represent a high risk of contamination due to their persistence in the environment and bioaccumulative potential. Hydrocarbons present in QAV are not inhibitors of microbial activity. However, QAV released directly into the soil can contaminate aquifers and springs. In this sense, analyzing the biodegradation and ecotoxicity of contaminants from fire emergency exercises is fundamental to establishing soil bioremediation efficiency and evaluating long-term environmental risks. Soils from the Universidade Estadual Paulista (UNESP) and Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP) were studied to analyze the biodegradation of AFFF and QAV through Bartha and Pramer respirometry and mathematical modeling. The Kirby-Bauer disk diffusion method and seed germination were employed for ecotoxicological analyses. The results showed that contaminant biodegradation occurs, while soils are likely to accumulate potentially toxic degradation by-products. In addition, factors such as the concentration and chemical composition of the contaminant influence its biodegradation potential. The Kirby-Bauer disk-diffusion method showed the bioremediation potential of a microorganism native to the VCP soil. Seed germination index was affected by high concentrations of AFFF and in essays of co-contamination with QAV. Lastly, this study proposes that soil management and remediation plans be developed after air emergency simulations in the face of the negative environmental effect of AFFF and QAV. Proposals on soil bioremediation and the development of affordable biosurfactants are pivotal to ensure less environmental impact after fire emergency exercises. These simulations must be strictly monitored from an environmental perspective by the competent authorities.

Keywords: AFFF, contamination, degradation, jet fuel, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de satélite da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Rio Claro (IBRC), com indicação da área de amostragem (marcação em vermelho).....	17
Figura 2 – Imagem de satélite do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP), em Campinas, com indicação da área amostragem (marcação em azul).	17
Figura 3 – Amostras de solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (A) e do Aeroporto de Viracopos (VCP) (B) enterradas no Jardim Experimental, do Instituto de Biociências de Rio Claro (IBRC).	18
Figura 4 – Esquema representativo de um respirômetro de Bartha e Pramer (CETESB, 1990), contendo tampa da cânula (A), cânula de diâmetro de 1,0 a 2,0 mm (B), rolha de borracha (C), braço lateral de diâmetro de 40,0 mm e altura de 100,0 mm (D), solução de KOH 0,2 N (E), meio sólido com a substância analisada (F), frasco Erlenmeyer de 250,0 ml (G), válvula (H), suporte de lã de vidro ou algodão (I), filtro de cal sodada com diâmetro de 15,0 mm e altura de 40,0 mm (J).....	19
Figura 5 – Montagem dos frascos respirométricos de acordo com os ensaios propostos na Tabela 1 (A); respirômetros em diferentes concentrações preparados para o experimento (B); processo de titulação do KOH 0,2 N residual a partir da adição da solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N (C); coleta do KOH residual de cada respirômetro com auxílio de uma seringa e purificação dos frascos a partir de bomba de ar (D).....	20
Figura 6 – Princípio do teste de suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão de Kirby-Bauer.....	23
Figura 7 – Inoculação de microrganismos (<i>Bacillus subtilis</i> e microrganismo mais recorrente no plaqueamento do solo de VCP) em placas de Petri contendo Ágar Nutriente por espalhamento em placa (<i>spread-plate</i>) (A); adição dos discos embebidos em contaminantes nas placas de Petri (B); placa de Petri contendo os seis discos de modo equidistante (C); placas invertidas em incubadora (D).	24
Figura 8 – Início da etapa de extração dos contaminantes dos solos em mesa agitadora (A); transferência da amostragem para tubo tipo falcon (B); amostragem após centrifugação (C); montagem dos ensaios ecotoxicológicos (D).	27
Figura 9 – Adição das 20 sementes na placa de Petri contendo papel de filtro (A); contagem da germinação das sementes após 120 horas em estufa incubadora (B); mensuração do comprimento das raízes com o auxílio de régua (C).	27

Figura 10 – Produção de CO ₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), A1 (0,5 ml de AFFF 6%), A2 (1,0 ml de AFFF 6%), A3 (5,0 ml de AFFF 6%), A4 (50,0 ml de AFFF 6%) e A5 (100,0 ml de AFFF 6%). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).	28
Figura 11 – Produção de CO ₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), Q1 (0,5 ml de QAV), Q2 (1,0 ml de QAV) e Q3 (2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).	29
Figura 12 – Produção de CO ₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), B1 (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2 (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).	29
Figura 13 – Produção acumulada de CO ₂ em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em C-U (solo controle), A1-U (0,5 ml de AFFF 6%), A2-U (1,0 ml de AFFF 6%), A3-U (5,0 ml de AFFF 6%), A4-U (50,0 ml de AFFF 6%), A5-U (100,0 ml de AFFF 6%), Q1-U (0,5 ml de QAV), Q2-U (1,0 ml de QAV), Q3-U (2,5 ml de QAV), B1-U (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV), B2-U (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV), C-V (solo controle), A1-V (0,5 ml de AFFF 6%), A2-V (1,0 ml de AFFF 6%), A3-V (5,0 ml de AFFF 6%), A4-V (50,0 ml de AFFF 6%), A5-V (100,0 ml de AFFF 6%), Q1-V (0,5 ml de QAV), Q2-V (1,0 ml de QAV), Q3-V (2,5 ml de QAV), B1-V (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2-V (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).	32
Figura 14 – Diâmetro do halo (disco-difusão de Kirby-Bauer) para os contaminantes em <i>Bacillus subtilis</i> e microrganismo nativo isolado do solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).	37
Figura 15 – Halos formados para <i>Bacillus subtilis</i> (A) e microrganismo nativo do solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP) (B). As imagens (A) e (B) exemplificam apenas uma das triplicatas utilizadas para o cálculo da susceptibilidade.	38
Figura 16 – Índice de germinação de sementes para o solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP). C (solo controle), A1 (0,5 ml de AFFF 6%), A2 (1,0 ml de AFFF 6%), A3 (5,0 ml de AFFF 6%), A4 (50,0 ml de AFFF 6%), A5 (100,0 ml de AFFF 6%), Q1 (0,5 ml de QAV), Q2 (1,0 ml de QAV), Q3 (2,5 ml de QAV), B1 (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV), B2 (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV).	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ensaios de respirometria realizados em triplicata para o solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e em duplicata para o solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP). AFFF = espuma formadora de filme aquoso. QAV = querosene de aviação	20
Tabela 2 – Ensaios elaborados para extração dos contaminantes das amostras de solo.....	25
Tabela 3 – Média de produção semanal de CO ₂ para os ensaios respirométricos de mesmo contaminante.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

± – mais ou menos

°C – grau Celsius

μmol – micromol

A1 – 0,5 ml de AFFF 6%

A2 – 1,0 ml de AFFF 6%

A3 – 5,0 ml de AFFF 6%

A4 – 50,0 ml de AFFF 6%

A5 – 100,0 ml de AFFF 6%

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AFFF – espuma formadora de filme aquoso

ANAC – Agência Nacional de Aviação Civil

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATAG – *Air Transport Action Group*

atm – pressão atmosférica

B – gás carbônico produzido

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

B1 – cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV

B2 – cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV

Bmax – valor máximo de biodegradação previsto

Bo – produção inicial de CO₂

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

C – Controle

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental

cf – confira

cm – centímetros

CO₂ – dióxido de carbono

D – volume de HCl 0,1 N gasto em ml na titulação do branco (HCl puro)

E – volume de HCl 0,1 N gasto em ml na titulação do ensaio

e.g. – por exemplo

e.i. – isto é

EMa – alongamento médio na amostra

EMc – alongamento médio no controle

ERR – elongação radicular relativa

ESEA – Exercício Simulado de Emergência Aeronáutica

GR – germinação relativa

H₂O – água deionizada

HCl 0,1 N – ácido clorídrico 0,1 N

IBRC – Instituto de Biociências de Rio Claro

IG – índice de germinação

kg – quilograma

KOH 0,2 N – hidróxido de potássio 0,2 N

mg – miligrama

ml – mililitro

mm – milímetro

NaCl – cloreto de sódio

NBR – Norma Brasileira

OECD – *Organization for the Economic Cooperation and Development*

PCO₂ – produção de gás carbônico

PFAS – per- e poli fluoralquiladas

PFCAs – ácidos carboxílicos perfluorados

PFCs – surfactantes fluorados

PFOA – perfluoroctanoatos

PFOS – perfluoroctano sulfonatos

Q1 – 0,5 ml de QAV

Q2 – 1,0 ml de QAV

Q3 – 2,5 ml de QAV

QAV – querosene de aviação

r – taxa máxima de produção específica

R² – índice de correlação

RBAC – Regulamentos Brasileiros da Aviação Civil

rpm – rotação por minuto

SGa – número de sementes germinadas na amostra

SGc – número de sementes germinadas no controle

t – tempo

T Bmax – tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto

U – UNESP

UNESP – Universidade Estadual Paulista

V – VCP

VCP – Aeroporto Internacional de Viracopos

θHCl – fator do HCl 0,1 N

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos	16
3 METODOLOGIA.....	16
3.1. Áreas de estudo e amostragem de solo	16
3.2. Preparo do inóculo	18
3.3. Biodegradação de QAV e AFFF 6% pela microbiota nativa.....	19
3.4. Modelagem matemática	21
3.5. Ecotoxicidade por disco-difusão de Kirby-Bauer.....	22
3.6. Ecotoxicidade por germinação de sementes	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Biodegradação de contaminantes pela microbiota nativa.....	28
4.2. Prognóstico cinético da biodegradação de contaminantes pela microbiota nativa	31
4.3. Ecotoxicidade por disco-difusão de Kirby-Bauer.....	37
4.4. Ecotoxicidade por germinação de sementes	39
5 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÊNDICE I.....	48

1 INTRODUÇÃO

Conforme estabelecido no Regulamento Brasileiro de Aviação Civil - RBAC/ANAC nº 153 (2018), a cada três anos aeroportos brasileiros devem realizar o Exercício Simulado de Emergência Aeronáutica (ESEA) visando simular respostas a uma emergência aérea completa. Embora esta prática seja essencial para avaliar ações integradas necessárias para minimizar os impactos de eventuais acidentes aéreos, tais simulações liberam para o solo substâncias derivadas de petróleo (e.g., combustíveis) e espumas formadoras de filme aquoso (AFFF, sigla em inglês para *aqueous film-forming foam* — também conhecida como espuma extintora), contaminantes que podem permanecer no ambiente por longos períodos de tempo.

Substâncias derivadas do petróleo contribuem expressivamente para a elevação da poluição ambiental (SHABIR et al., 2008). Dentre os componentes principais do petróleo, o querosene representa o maior problema de poluição (SOLANO-SERENA et al., 2000; SHABIR et al., 2008), sendo o derivado mais utilizado como combustível de aeronaves. Embora a maior parcela da poluição seja proveniente da queima do combustível durante o voo, que libera toneladas de CO₂ ao longo do ano (ATAG, 2018), incêndios provocados por simulações de emergência aérea liberam combustível diretamente no solo, podendo contaminar aquíferos e nascentes. Estudos têm reportado que hidrocarbonetos presentes no querosene não são inibitórios da atividade microbiana (SONG et al., 1990; AELION e BRADLEY, 1991). Contudo, o seu potencial de biodegradabilidade parece estar diretamente relacionado à disponibilidade de nutrientes no solo (SHABIR et al., 2008).

Espumas de combate a incêndios foram desenvolvidas para garantir a aderência a materiais em chamas, uma vez que sua baixa densidade permite melhor espalhamento em materiais em combustão, isolando-os do contato com o oxigênio atmosférico. Estas espumas possuem em sua composição surfactantes fluorados (PFCs) (MOODY e FIELD, 2000), que podem ser: (i) perfluorados, quando todos os carbonos estão ligados ao flúor na ausência de hidrogênio na cadeia; ou (ii) polifluorados, em que ocorrem ligações de carbono e flúor, com hidrogênio e até mesmo com outros compostos (BOBERT et al., 1997). Estas características favorecem o uso de AFFF em simulações de emergência aérea, garantindo a eficácia no combate a incêndios. Entretanto, a liberação de PFCs presentes na AFFF representa elevado risco de contaminação ambiental. Tais compostos são conhecidos pela sua persistência e potencial bioacumulativo, sendo detectados, por exemplo, em amostras de água (SCHULTZ et al., 2004; MURAKAMI et al., 2008) e solo (HIGGINS et al., 2005).

A degradação de PFCs pode originar outros compostos químicos — como ácidos carboxílicos perfluorados (PFCAs) e per- e poli fluoralquiladas (PFAS) —, que ao se degradarem podem gerar outros compostos, como perfluoroctano sulfonatos (PFOS) e perfluoroctanoatos (PFOA) (MONTAGNOLLI, 2015; OLIVARES et al., 2022). Estes subprodutos da decomposição de PFCs também apresentam risco de contaminação, sendo os poluentes orgânicos mais proeminentes no meio ambiente e na biota (GIESY e KANNAN, 2001; YAMASHITA et al., 2004; HIGGINS et al., 2005; DAVIS et al., 2007; HOUDE et al., 2008; AHRENS, 2011; AWAD et al., 2011; COUSINS et al., 2016).

Apesar do crescente interesse pelo conhecimento dos efeitos ambientais causados por simulações de emergência aérea, métodos analíticos aprofundados são necessários para estabelecer as reais ameaças promovidas pelo QAV e pela AFFF ao ambiente. Além disso, não há dados publicados a respeito de surfactantes de hidrocarbonetos em AFFF e áreas de treinamento afetadas pela espuma extintora (GARCÍA, 2019). Portanto, analisar a biodegradação e ecotoxicidade de contaminantes provenientes de simulações de emergência aérea é essencial para estabelecer a eficiência da biorremediação do solo e avaliar riscos ambientais em longo prazo.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Analisar a biodegradação e a ecotoxicidade do QAV e da AFFF em solo submetido a condições de contaminação similares às aquelas ocasionadas por simulações de emergência aérea.

2.2. Específicos

- Analisar a biodegradação dos contaminantes por microrganismos nativos em solo;
- Prognosticar a cinética de biodegradação dos contaminantes por meio de modelagem matemática;
- Analisar a ecotoxicidade dos solos após a biodegradação dos contaminantes.

3 METODOLOGIA

3.1. Áreas de estudo e amostragem de solo

Amostras de solo para a realização do estudo foram coletadas próximas ao Departamento de Biologia Geral e Aplicada (antigo Departamento de Bioquímica e

Microbiologia), da Universidade Estadual Paulista (UNESP), do Instituto de Biociências de Rio Claro (IBRC), São Paulo ($22^{\circ} 23' 45.18''$ S, $47^{\circ} 32' 49.18''$ W) (Figura 1), e nas imediações do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP), em Campinas, São Paulo ($23^{\circ} 0' 25''$ S, $47^{\circ} 08' 04''$ W) (Figura 2). Ambas as coletas foram realizadas a 10,0 cm de profundidade da superfície do solo.

Figura 1 – Imagem de satélite da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Rio Claro (IBRC), com indicação da área de amostragem (marcação em vermelho).



Fonte: Google Earth Pro (2019). Anotações elaboradas pelo autor.

Figura 2 – Imagem de satélite do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP), em Campinas, com indicação da área amostragem (marcação em azul).



Fonte: Google Earth Pro (2019). Anotações elaboradas pelo autor.

3.2. Preparo do inóculo

A simulação de contaminação nas amostras de solo visando selecionar microrganismos mais aptos para degradar os contaminantes estudados foi realizada conforme a metodologia de Montagnolli (2015) e adaptação da Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

Inicialmente, o solo da UNESP (Figura 3A) foi submetido ao peneiramento para selecionar apenas grãos constituintes de solo com diâmetro inferior a 2 mm — classificação granulométrica dada pela Norma Técnica ABNT NBR 6502/1995. Em seguida, o inóculo foi preparado em 3,0 kg de solo adicionando 50,0 ml de QAV e 50,0 ml de AFFF 6% (Sintex) e mantido durante 20 dias em recipiente poroso (poros com aproximadamente 1,0 mm de diâmetro, espaçados em 1,0 cm cada). O inóculo foi então enterrado a 10,0 cm da superfície do solo, no Jardim Experimental do IBRC (Figura 3A), para permitir a troca de microrganismos entre o solo amostral e local.

O solo de VCP (Figura 3B) foi submetido ao mesmo procedimento. Entretanto, devido à quantidade restrita de solo fornecida pelo Aeroporto, o inóculo foi preparado em 1,5 kg de solo, obedecendo a proporcionalidade de contaminantes (25,0 ml de QAV e 25,0 ml de AFFF 6% da marca Sintex) em relação ao inóculo do solo da UNESP.

Figura 3 – Amostras de solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP) (A) e do Aeroporto de Viracopos (VCP) (B) enterradas no Jardim Experimental, do Instituto de Biociências de Rio Claro (IBRC).



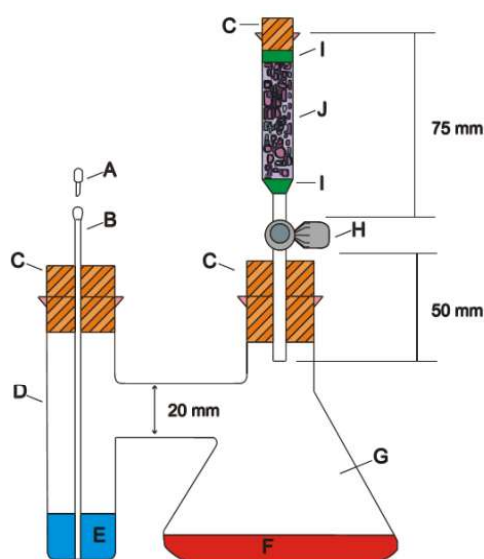
Fonte: Autor (2021).

3.3. Biodegradação de QAV e AFFF 6% pela microbiota nativa

O método respirométrico de Bartha e Pramer (1965) foi empregado para determinar a quantidade de dióxido de carbono (CO_2) produzida no interior do respirômetro (Figura 4), como evidência indireta de biodegradação dos contaminantes pela microbiota nativa. A biodegradação de QAV e AFFF 6% (Sintex) foi avaliada em diferentes concentrações, tanto para o solo inoculado da UNESP quanto para o de VCP (Tabela 1), seguindo adaptação da Norma Técnica L6.350 da CETESB (1990) e das diretrizes OECD (2002).

Ensaio com solo da UNESP foram preparados em triplicatas, enquanto que ensaios com solo de VCP foram preparados em duplicatas devido à quantidade restrita de solo disponível (Figura 5A-B). Para ambos os casos, o monitoramento foi realizado ao longo de 91 dias. Ensaio de cocontaminação também foram realizados (Tabela 1). Todos os frascos de Bartha e Pramer permaneceram armazenados em estufa incubadora BOD Solab SL224, a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 4 – Esquema representativo de um respirômetro de Bartha e Pramer (CETESB, 1990), contendo tampa da cânula (A), cânula de diâmetro de 1,0 a 2,0 mm (B), rolha de borracha (C), braço lateral de diâmetro de 40,0 mm e altura de 100,0 mm (D), solução de KOH 0,2 N (E), meio sólido com a substância analisada (F), frasco Erlenmeyer de 250,0 ml (G), válvula (H), suporte de lã de vidro ou algodão (I), filtro de cal sodada com diâmetro de 15,0 mm e altura de 40,0 mm (J).



Fonte: Montagnolli et al., (2009).

Tabela 1 – Ensaio de respirometria realizados em triplicata para o solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e em duplicata para o solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP). AFFF = espuma formadora de filme aquoso. QAV = querosene de aviação

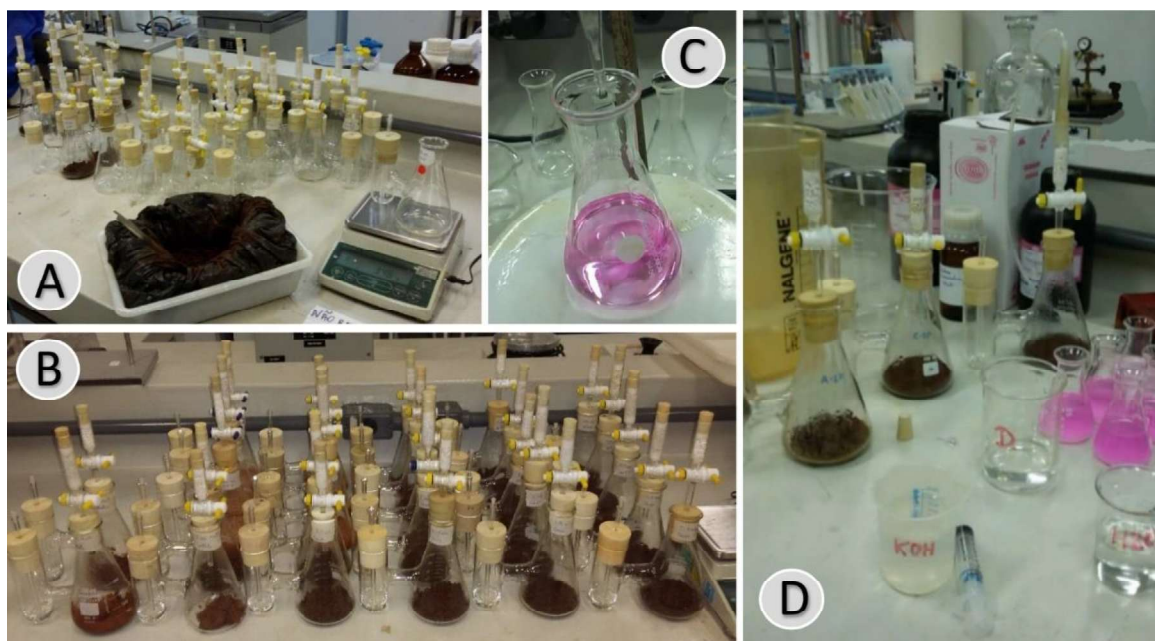
ENSAIOS	SOLO	AFFF 6%	QAV
Controle (C)	50,0 g	---	---
AFFF 6% (A1)	50,0 g	0,5 ml	---
AFFF 6% (A2)	50,0 g	1,0 ml	---
AFFF 6% (A3)	50,0 g	5,0 ml	---
AFFF 6% (A4)	50,0 g	50,0 ml	---
AFFF 6% (A5)	50,0 g	100,0 ml	---
QAV (Q1)	50,0 g	---	0,5 ml
QAV (Q2)	50,0 g	---	1,0 ml
QAV (Q3)	50,0 g	---	2,5 ml
Cocontaminação (B1)	50,0 g	1,0 ml	1,0 ml
Cocontaminação (B2)	50,0 g	5,0 ml	2,5 ml

O monitoramento de CO₂ gerado durante o processo de respiração microbiana foi baseado na neutralização em solução de hidróxido de potássio (KOH) (*Synth P.A.*) 0,2 N inserida no braço lateral do respirômetro. O CO₂ foi quantificado semanalmente por titulação do KOH residual a partir da adição da solução de ácido clorídrico (HCl) (*Vetec P.A.*) 0,1 N (Figura 5C) e representado em função do tempo de incubação (BALBA et al., 1998). Após a titulação, atmosfera interna dos frascos foi purificada com auxílio de bomba de ar, seguida da adição de 10,0 ml de solução de KOH 0,2 N para a próxima medição (Figura 5D).

Ao longo do processo de respiração microbiana, taxas de produção de CO₂ em solos contaminados (tratamentos) foram subtraídas de taxas de produção de CO₂ em solos livres de contaminação (controle) para analisar o consumo de QAV e AFFF 6% pela microbiota. Os resultados foram interpretados após os 91 dias de monitoramento da taxa de CO₂ liberada. Para fins comparativos, foi calculada a média de produção de $\mu\text{mol de CO}_2 \cdot \text{semana}^{-1}$ para ensaios de QAV (Q1, Q2 e Q3), AFFF (A1, A2, A3, A4 e A5) e cocontaminação (B1 e B2) para ambos os solos (UNESP e VCP).

Figura 5 – Montagem dos frascos respirométricos de acordo com os ensaios propostos na Tabela 1 (A); respirômetros em diferentes concentrações preparados para o experimento (B); processo de titulação do KOH 0,2 N residual a partir da adição da solução de »

« ácido clorídrico (HCl) 0,1 N (C); coleta do KOH residual de cada respirômetro com auxílio de uma seringa e purificação dos frascos a partir de bomba de ar (D).



Fonte: Autor (2021).

O cálculo para obter a quantidade de CO₂ produzida foi obtido a partir do volume gasto de HCl para neutralizar o KOH residual durante a titulação, expresso pela equação 1.

$$PCO_2 = (D - E) \times 50 \times \theta_{HCl} \times 0,044 \quad (1)$$

Onde:

PCO₂ é a produção de gás carbônico;

D é o volume de HCl 0,1 N gasto em ml na titulação do branco (HCl puro);

E é o volume de HCl 0,1 N gasto em ml na titulação do ensaio;

50 é o fator para transformar equivalente em μmol de CO₂;

θ_{HCl} é o fator do HCl 0,1 N;

0,044 é o fator para transformar μmol em mg de CO₂.

3.4. Modelagem matemática

Dados respirométricos foram ajustados ao modelo matemático de produção de CO₂ adotado por Montagnolli et al. (2009), baseado na equação logística de Schmidt et al. (1985). Tal modelo foi empregado para permitir inferências sobre a persistência em longo prazo dos contaminantes no ambiente. Frente a tendência de desaceleração da produção de CO₂ após 28

dias do experimento respirométrico, modelo logístico não linear foi adotado dada sua maior precisão.

A equação utilizada para ajustar os dados respirométricos a modelos de produção de CO₂ e obter a previsão máxima de CO₂ é expressa a seguir (2).

$$B = \frac{B_{max}}{\left(1 + \left[\frac{(B_{max}-B_0)}{B_0}\right] \times e^{-rt}\right)} \quad (2)$$

Onde:

B é o gás carbônico produzido;

B_{max} é o valor máximo de biodegradação previsto;

B₀ é a produção inicial de CO₂;

r é a taxa máxima de produção específica para determinada substância;

t é o tempo.

O ajuste dos dados concedeu os parâmetros de valor máximo de biodegradação previsto (B_{max}) e de tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto (T B_{max}). O B_{max} é determinado quando a curva de produção acumulada de CO₂ gerada pelo modelo se estabiliza ao longo do tempo, ou seja, não apresenta aumento significativo (produção acumulada de CO₂ < 0,99 x B_{max}). O tempo de término de biodegradação foi considerado como o tempo de produção de CO₂ igual a 0,95 x B_{max} (MONTAGNOLLI et al., 2009). Dessa forma, a análise dos indicadores B_{max} e T B_{max} permitiu a previsão do valor máximo possível de produção de CO₂ e do tempo final de biodegradação de cada ensaio realizado.

A modelagem dos dados e ajuste na equação foram realizados por meio da plataforma WOLFRAM MATHEMATICA 6. A geração de gráficos foi realizada pelo *software* MICROCAL ORIGIN 6.0.

3.5. Ecotoxicidade por disco-difusão de Kirby-Bauer

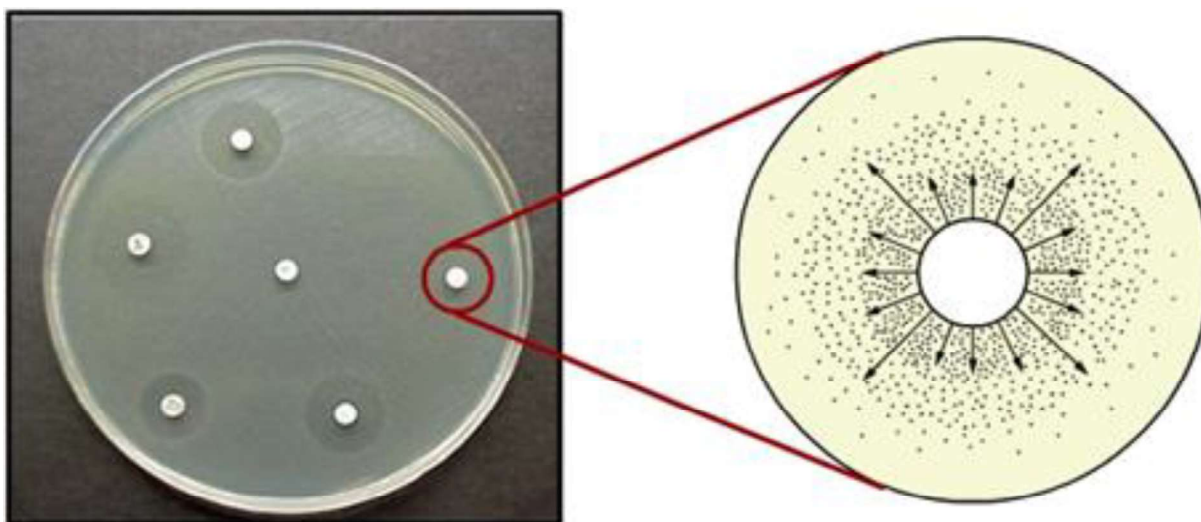
A ecotoxicidade inicial dos contaminantes à microbiota dos solos estudados foi avaliada por meio da adaptação do método de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966) (Figura 6). Este método é amplamente utilizado para determinar a susceptibilidade de bactérias a antibióticos (e.g., TARALE et al. 2015; KOVALE et al., 2021). Contudo, no presente estudo, o antibiótico foi substituído pelos contaminantes estudados. Todo o material utilizado nesta

metodologia foi autoclavado em autoclave vertical (Prismatec Analógico) a 121 °C e 1 atm durante 15 minutos.

Discos de papel filtro (6 mm de diâmetro obtidos a partir da perfuração de papel filtro Qualy de 90 mm de diâmetro com o auxílio de perfurador de papel) foram embebidos em QAV, AFFF 6%, AFFF 3%, AFFF 1% e desinfetante Esmeralda (controle positivo) da marca Syntax Indústria e Comércio, em triplicatas. Concentrações de 3% e 1% de AFFF foram obtidas a partir da diluição de AFFF 6%. Além disso, em todos os ensaios foi incluído um disco não embebido em contaminantes (controle negativo). Ensaios foram realizados para (i) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) — bactéria Gram-positiva comumente encontrada no solo (cf. LANNA-FILHO et al., 2010) — e para o (ii) microrganismo mais recorrente no plaqueamento prévio do solo de VCP (caracterização morfológica), obtido por meio das técnicas de diluição seriada (diluição 10^{-5} de solo de VCP em solução NaCl 0,9%) e de semeadura (estrias múltiplas para isolamento).

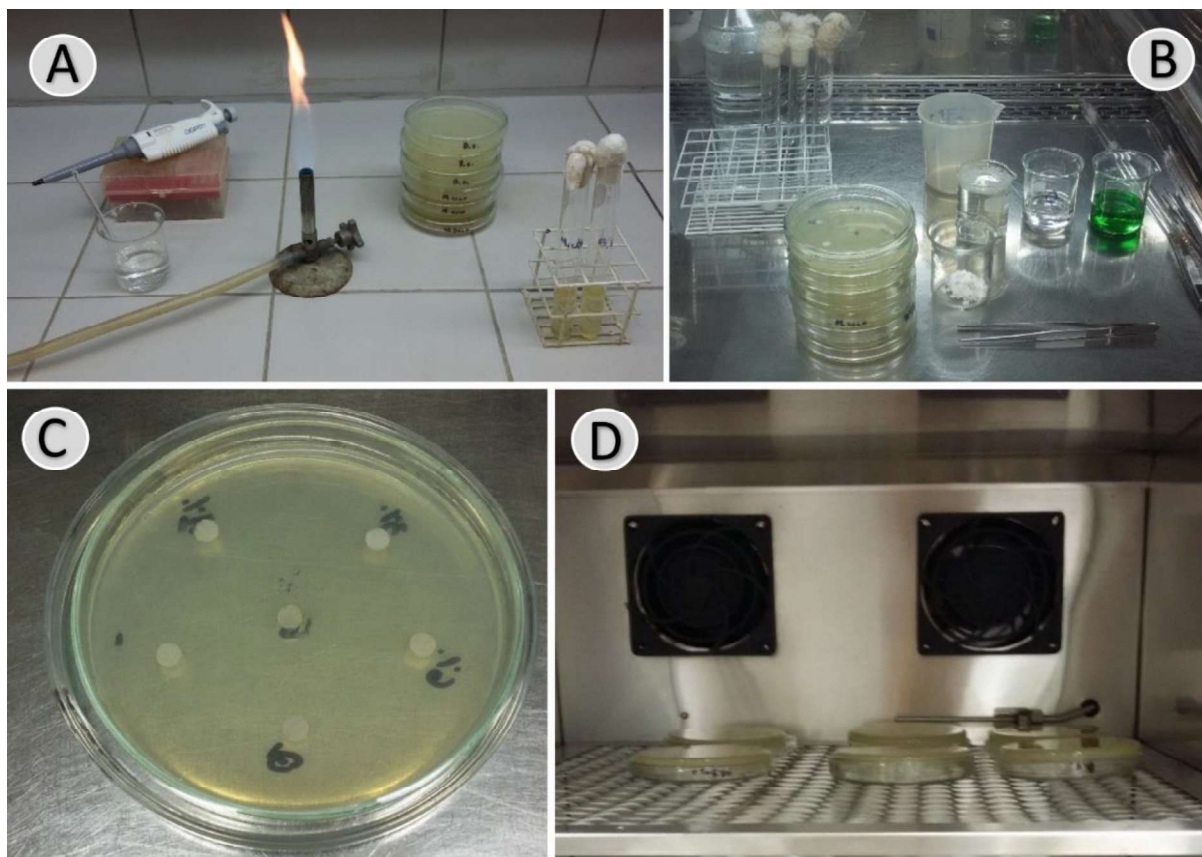
Os microrganismos foram inoculados em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (Difco) por espalhamento em placa (*spread-plate*) com auxílio de alça de Drigalski (Figura 7A). Os discos de papel filtro foram então dispostos na superfície do meio de cultura de modo equidistante, totalizando seis discos por placa (Figura 6, 7B-D). As placas foram invertidas e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas em incubadora Solab SL224 (Figura 7D).

Figura 6 – Princípio do teste de suscetibilidade pela metodologia do disco-difusão de Kirby-Bauer.



Fonte: ANVISA (2019). Adaptado pelo autor.

Figura 7 – Inoculação de microrganismos (*Bacillus subtilis* e microrganismo mais recorrente no plaqueamento do solo de VCP) em placas de Petri contendo Ágar Nutriente por espalhamento em placa (*spread-plate*) (A); adição dos discos embebidos em contaminantes nas placas de Petri (B); placa de Petri contendo os seis discos de modo equidistante (C); placas invertidas em incubadora (D).



Fonte: Autor (2021).

Após o período de incubação, as placas foram examinadas pela mensuração dos halos de inibição, em milímetros, quando formados. Para fins de padronização, o halo de inibição considerado foi a área sem crescimento detectável a olho nu. A interpretação dos resultados seguiu o princípio que sugere que o tamanho do halo de inibição indica maior ou menor susceptibilidade microbiana (cf. ARORA e KAUR, 1999), em que valores menores de 7,0 mm de diâmetro são considerados não-ativos e aqueles iguais ou maiores que 12,0 mm são considerados de maior efeito inibitório.

3.6. Ecotoxicidade por germinação de sementes

A germinação consiste no fenômeno biológico de retomada do crescimento do embrião, com subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Neste sentido, é o método ideal para

avaliar efeitos causados por substâncias potencialmente tóxicas, que agem interferindo no desenvolvimento do embrião (AYERS e WESTCOT, 1999).

A extração dos contaminantes dos solos após o processo de biodegradação foi iniciada a partir da adição de água deionizada (H₂O) até completar 100,0 ml de substância total em cada frasco respirométrico (Tabela 2). Ensaios de mesma concentração foram unificados em frascos Erlenmeyer, respeitando a proporção de 1:3 para os ensaios contendo solo da UNESP e de 1:2 contendo solo de VCP, e agitados em mesa agitadora Catel a 180 rpm, durante 24 horas (Figura 8A). Posteriormente, 20,0 ml do sobrenadante de cada ensaio foi transferido para tubos tipo falcon, que foram centrifugados em centrífuga de bancada (MLW K24) durante 20 minutos a 4.000 rpm para decantação do sedimento e recuperação do sobrenadante contendo os contaminantes (Figura 8B-C). Por fim, 3,0 ml do sobrenadante contendo os contaminantes extraídos foram armazenados temporariamente em recipientes.

Tabela 2 – Ensaios elaborados para extração dos contaminantes das amostras de solo

ENSAIOS	AFFF 6%	QAV	H ₂ O ADICIONADA
Controle (C)	---	---	100,0 ml
AFFF 6% (A1)	0,5 ml	---	99,5 ml
AFFF 6% (A2)	1,0 ml	---	99,0 ml
AFFF 6% (A3)	5,0 ml	---	95,0 ml
AFFF 6% (A4)	50,0 ml	---	50,0 ml
AFFF 6% (A5)	100,0 ml	---	---
QAV (Q1)	---	0,5 ml	99,5 ml
QAV (Q2)	---	1,0 ml	99,0 ml
QAV (Q3)	---	2,5 ml	97,5 ml
Cocontaminação (B1)	1,0 ml	1,0 ml	98,0 ml
Cocontaminação (B2)	5,0 ml	2,5 ml	92,5 ml

Os contaminantes extraídos de cada ensaio foram então adicionados em placas de Petri (100 mm de diâmetro) contendo um disco de papel filtro (Qualy, 90 mm de diâmetro) (Figura 8D). Ensaios de controle positivo (3,0 ml de sulfato de zinco 0,05 N) e negativo (3,0 ml de H₂O) também foram preparados. Para cada placa de Petri, 20 sementes de alface (*lactuca sativa*) Mimosa *Green Salad Bowl* da marca Feltrin Sementes Ltda. (Lote 0002601530063070), com identificação do fabricante de 91% de potencial de germinação, de mesmo lote e livre de defensivos químicos agrícolas, foram adicionadas (Figura 9A). As sementes foram obtidas comercialmente em loja de produtos agropecuários em Rio Claro, São Paulo. Em seguida, as placas de Petri foram embaladas com filme plástico para evitar a perda de umidade e

armazenadas em estufa incubadora BOD Solab SL224, a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 120 horas na ausência de luz. Após 120 horas, as plântulas foram congeladas para interromper o crescimento de modo uniforme e facilitar as mensurações (MORALES, 2004). O número de sementes germinadas em cada amostra foi contabilizado e o comprimento das raízes mensurado (Figura 9B-C) para obtenção do índice de germinação, dado pelas equações 3, 4 e 5 (ARAUJO e MONTEIRO, 2005) e baseado em métodos previamente descritos na literatura (DUTKA, 1989; TIQUIA et al., 1996; SOBRERO e RONCO, 2008; MONTAGNOLLI et al., 2015).

$$GR = \left(\frac{SGa}{SGc} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde:

GR é a germinação relativa;

SGa é o número de sementes germinadas na amostra;

SGc é o número de sementes germinadas no controle.

$$ERR = \left(\frac{EMa}{EMc} \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde:

ERR é a elongação radicular relativa;

EMa é o alongamento médio na amostra;

EMc é o alongamento médio no controle.

$$IG = \left(\frac{GR \times ERR}{100} \right) \quad (5)$$

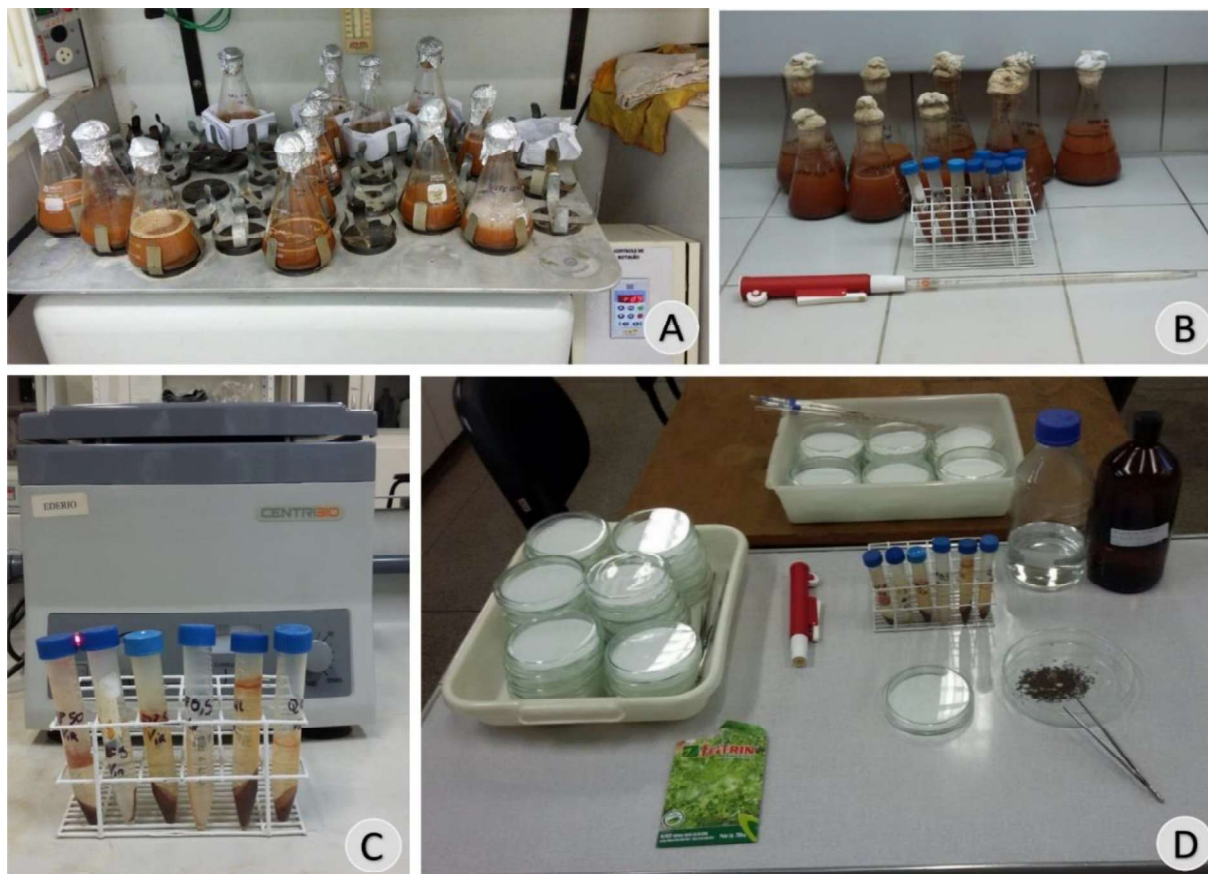
Onde:

IG é o índice de germinação;

GR é germinação relativa;

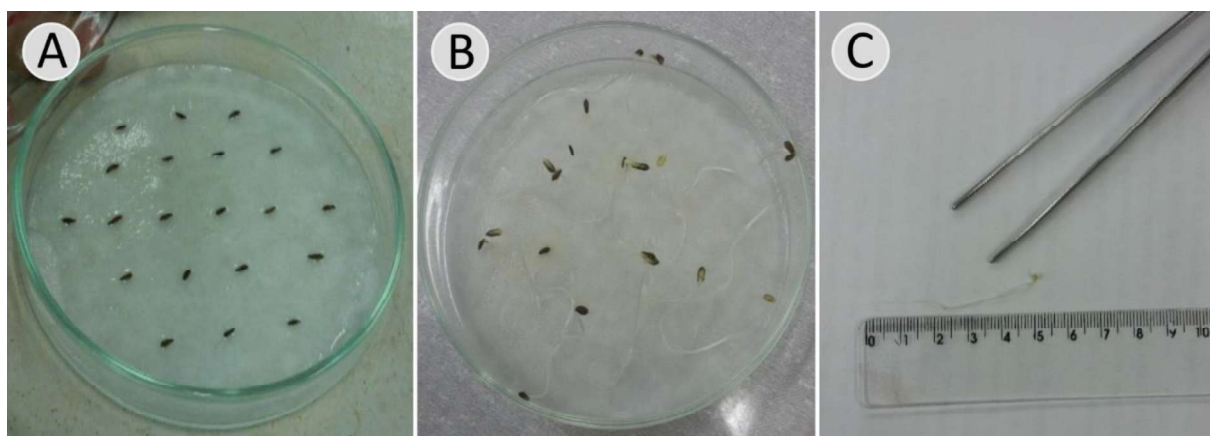
ERR é elongação radicular relativa.

Figura 8 – Início da etapa de extração dos contaminantes dos solos em mesa agitadora (A); transferência da amostragem para tubo tipo falcon (B); amostragem após centrifugação (C); montagem dos ensaios ecotoxicológicos (D).



Fonte: Autor (2021).

Figura 9 – Adição das 20 sementes na placa de Petri contendo papel de filtro (A); contagem da germinação das sementes após 120 horas em estufa incubadora (B); mensuração do comprimento das raízes com o auxílio de régua (C).



Fonte: Autor (2021).

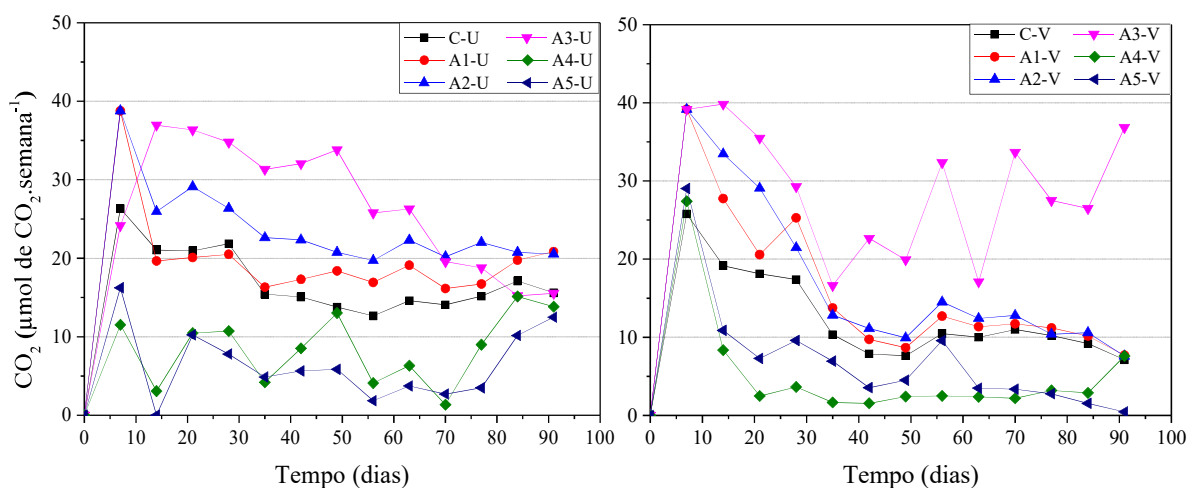
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Biodegradação de contaminantes pela microbiota nativa

A produção semanal de CO₂ a partir do metabolismo microbiano nos respirômetros foi representada em função do tempo de biodegradação nas Figuras 10-12. Os dados brutos são apresentados no APÊNDICE I, Tabelas 1-6.

Os resultados mostraram diferentes curvas de produção semanal de CO₂ entre os ensaios realizados (Figuras 10-12). Os ensaios contendo 5,0 ml de AFFF 6% (A3), tanto no solo da UNESP quanto de VCP, apresentaram maior taxa de biodegradação em comparação ao controle (C) e aos demais ensaios contendo apenas a AFFF (Figura 10; APÊNDICE I, Tabelas 1-2). Por outro lado, os ensaios com 50,0 ml de AFFF 6% (A4) e 100,0 ml de AFFF 6% (A5) apresentaram menor taxa de biodegradação em relação ao controle (C) (Figura 10; APÊNDICE I, Tabelas 1-2).

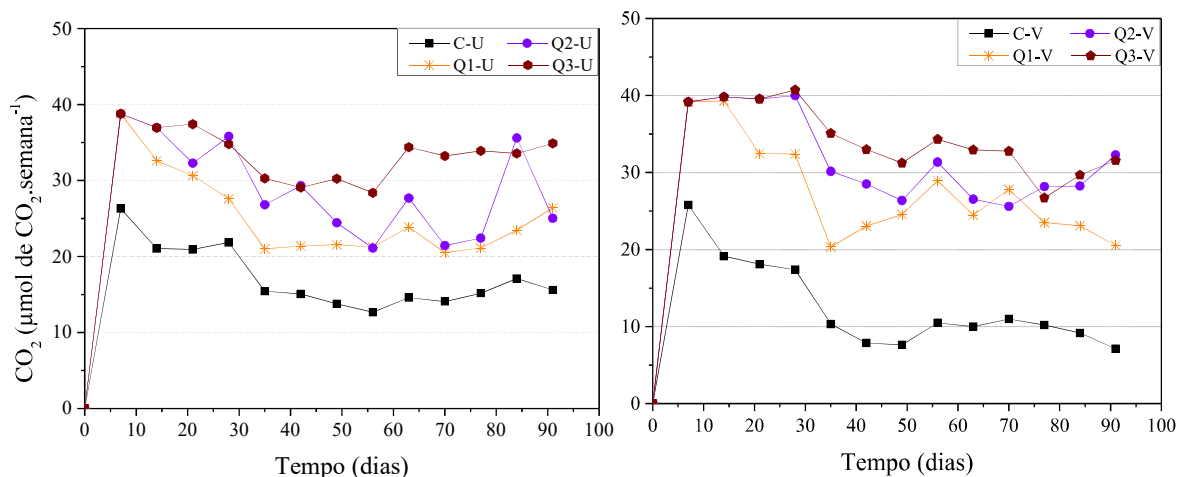
Figura 10 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), A1 (0,5 ml de AFFF 6%), A2 (1,0 ml de AFFF 6%), A3 (5,0 ml de AFFF 6%), A4 (50,0 ml de AFFF 6%) e A5 (100,0 ml de AFFF 6%). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).



Fonte: Autor (2021).

Os ensaios contendo 0,5 ml de QAV (Q1), 1,0 ml de QAV (Q2) e 2,5 ml de QAV (Q3) para ambos os solos (UNESP e VCP) apresentaram maior taxa de biodegradação em relação ao controle (C), sendo as maiores taxas de biodegradação referentes aos ensaios com maior concentração de QAV (Figura 11; APÊNDICE I, Tabelas 3-4).

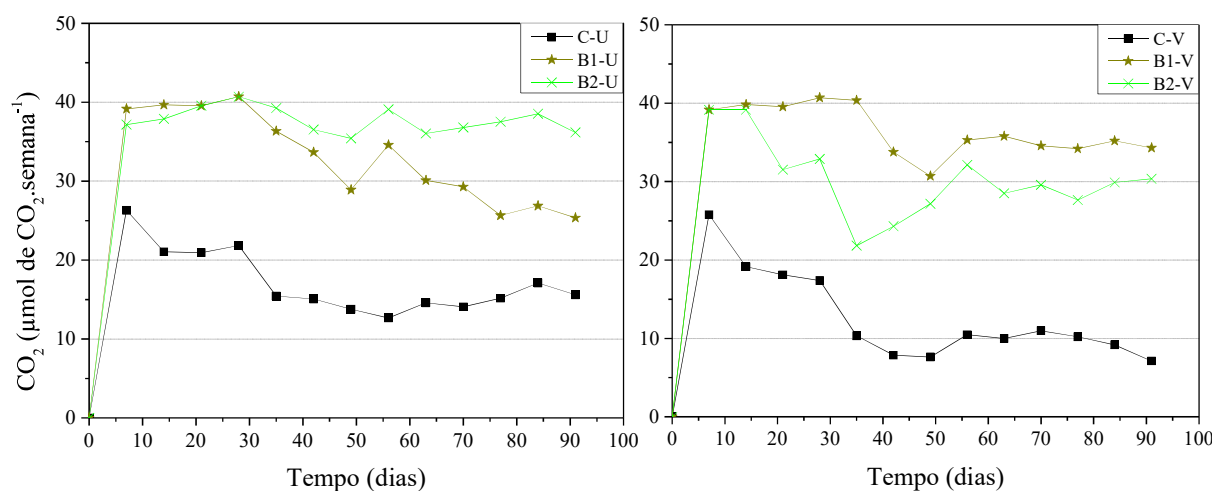
Figura 11 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), Q1 (0,5 ml de QAV), Q2 (1,0 ml de QAV) e Q3 (2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).



Fonte: Autor (2021).

Já os resultados dos ensaios de cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV (B1) e cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV (B2) apresentaram maior taxa de biodegradação em relação ao controle (C), tanto para o solo da UNESP quanto para o solo de VCP (Figura 12; APÊNDICE I, Tabelas 5-6).

Figura 12 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C (controle), B1 (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2 (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).



Fonte: Autor (2021).

A variação das taxas de degradação pode ser explicada pelo tipo de substrato disponível em cada um dos ensaios. Apesar da tendência de redução da produção de CO_2 nos ensaios a partir do 28º dia, todos os ensaios apresentaram maior produção de CO_2 .semana⁻¹ em relação ao controle (C), com exceção dos ensaios A4 (50,0 ml de AFFF 6%) e A5 (100,0 ml de AFFF 6%). Neste sentido, a baixa produção semanal de CO_2 nos ensaios controle (média de 17,20 μmol de CO_2 .semana⁻¹ para solo UNESP e 12,63 μmol de CO_2 .semana⁻¹ para VCP) é provavelmente devido à disponibilidade de matéria orgânica presente no solo, que promove apenas a respiração basal. Resultados similares foram reportados em estudo de biodegradação de compostos flúor-carbonados contendo hidrocarbonetos de petróleo e AFFF (MONTAGNOLLI, 2015), o que reforça a interpretação sugerida no presente estudo.

Considerando o método adotado para o cálculo da média de produção de μmol de CO_2 .semana⁻¹, os resultados mostraram diferentes médias para os ensaios com QAV, AFFF e cocontaminação (Tabela 3). Para os ensaios contendo apenas AFFF 6% (A1, A2, A3, A4 e A5), a média de produção observada foi de 17,02 μmol de CO_2 .semana⁻¹ (UNESP) e 14,96 μmol de CO_2 .semana⁻¹ (VCP) (Tabela 3). Já para os ensaios contendo apenas QAV (Q1, Q2 e Q3), a média de produção observada foi de 29,32 μmol de CO_2 .semana⁻¹ (UNESP) e 31,33 μmol de CO_2 .semana⁻¹ (VCP) (Tabela 3). Por fim, os ensaios de cocontaminação (B1 e B2) apresentaram 35,4 μmol de CO_2 .semana⁻¹ (UNESP) e 33,37 μmol de CO_2 .semana⁻¹ (VCP) (Tabela 3).

Tabela 3 – Média de produção semanal de CO_2 para os ensaios respirométricos de mesmo contaminante

ENSAIOS	MÉDIA ($\mu\text{mol CO}_2$.semana ⁻¹)	
	UNESP	VCP
Controle (C)	17,20	12,63
QAV	29,32	31,33
AFFF 6%	17,02	14,96
QAV + AFFF 6%	35,40	33,37

A baixa média de produção de μmol de CO_2 .semana⁻¹ para os ensaios contendo apenas AFFF 6% pode estar relacionada à composição química do contaminante. Ligações carbono-flúor presentes na AFFF 6% são consideradas ligações químicas muito fortes (ZHANG e LERNER, 2012), por vezes persistentes mesmo após processos de oxidação (BOURGEOIS et al., 2015). Estudo realizado em condições aeróbicas e anaeróbicas sugere a persistência de subprodutos da biodegradação do AFFF no ambiente (REMDE e DEBUS, 1996), que, eventualmente, são detectados mesmo após sete anos da contaminação (MOODY e FIELD,

1999). Além disso, alguns subprodutos podem ser ainda mais tóxicos do que o contaminante original (MONTAGNOLLI, 2011). Este conjunto de evidências corrobora a hipótese amplamente defendida de que os microrganismos não são capazes de degradar totalmente o contaminante dependendo de sua composição química. Esta hipótese é reforçada pelos resultados do presente estudo, uma vez que a produção de CO₂ pode ser considerada evidência indireta da baixa biodegradação de AFFF 6%.

A alta média de produção de $\mu\text{mol de CO}_2\cdot\text{semana}^{-1}$ para os ensaios de cocontaminação pode representar interação positiva entre a AFFF 6% e o QAV. Esta interpretação é respaldada pelo efeito surfactante da AFFF 6% sob as moléculas hidrofóbicas do QAV, que diminui a tensão superficial devido à emulsificação e, conseqüentemente, auxilia na biodegradação pelos microrganismos (AMUND e ADEBIYI, 1991; JAIN et al., 1992; WHANG et al., 2008). Estudo similar também reportou alta taxa de biodegradação em ensaios de cocontaminação contendo gasolina e AFFF (MONTAGNOLLI, 2015), o que demonstra similaridade na resposta hidrofóbica de derivados de petróleo na presença de surfactantes. Apesar da maior biodegradação nos ensaios de concontaminação, não é recomendável o uso de surfactantes fluorados em processos de remediação de solos contaminados por derivados de petróleo (MONTAGNOLLI, 2015). Para tanto, o uso de biosurfactantes tem sido recomendado devido à baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (NITSCHKE e PASTORE, 2004; MONTAGNOLLI et al., 2014; LOPES, 2014), o que também é recomendado no presente estudo.

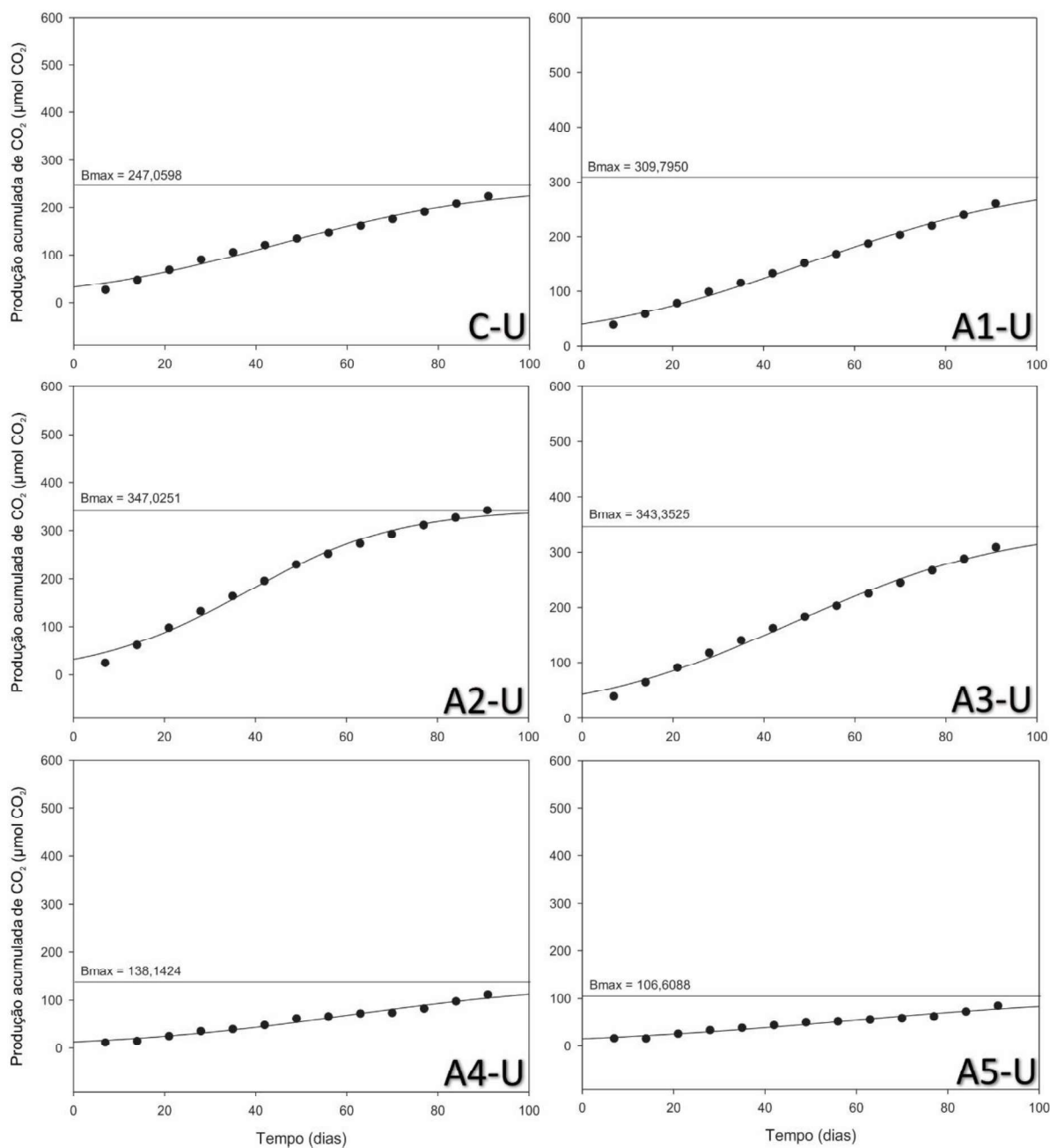
4.2. Prognóstico cinético da biodegradação de contaminantes pela microbiota nativa

O prognóstico cinético por meio da modelagem matemática é apresentado na Figura 13. Os dados brutos são apresentados no APÊNDICE I, Tabela 7.

Considerando o tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto (T_{Bmax}), foi observado que os ensaios A4-U (50,0 ml de AFFF 6%), A5-U (100,0 ml de AFFF 6%) e A4-V (50,0 ml de AFFF 6%) estavam dentre os mais demorados (dias): 184,05, 209,07 e 428,17, respectivamente (Figura 13; APÊNDICE I, Tabela 7). Já para os ensaios B2-U (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV), B1-V (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2-V (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV) foram observadas uma das maiores produções acumuladas de CO₂ ($\mu\text{mol de CO}_2$): 554,59, 528,78 e 468,18, respectivamente (Figura 13; APÊNDICE I, Tabela 7).

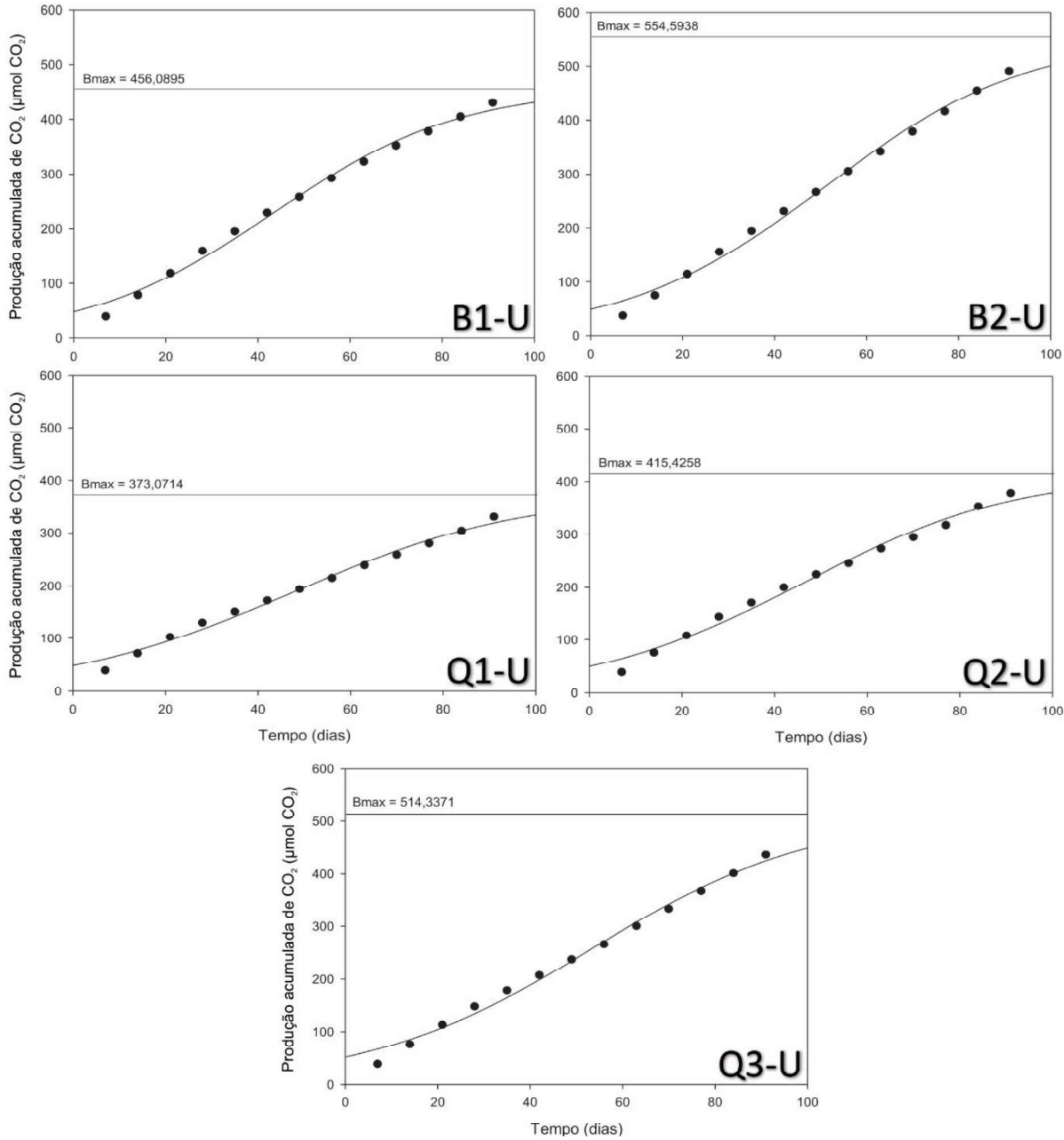
Figura 13 – Produção acumulada de CO₂ em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em C-U (solo controle), A1-U (0,5 ml de AFFF 6%), A2-U (1,0 ml de AFFF 6%), A3-U (5,0 ml de AFFF 6%), A4-U (50,0 ml de AFFF 6%), A5-U (100,0 ml de AFFF 6%), Q1-U (0,5 ml de QAV), Q2-U (1,0 ml de QAV), Q3-U (2,5 ml de QAV), B1-U (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV), B2-U (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV), C-V (solo controle), A1-V (0,5 ml de AFFF 6%), A2-V (1,0 ml de AFFF 6%), A3-V (5,0 ml de AFFF 6%), A4-V (50,0 ml de AFFF 6%), A5-V (100,0 ml de AFFF 6%), Q1-V (0,5 ml de QAV), Q2-V (1,0 ml de QAV), Q3-V (2,5 ml de QAV), B1-V (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2-V (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP). »

<<

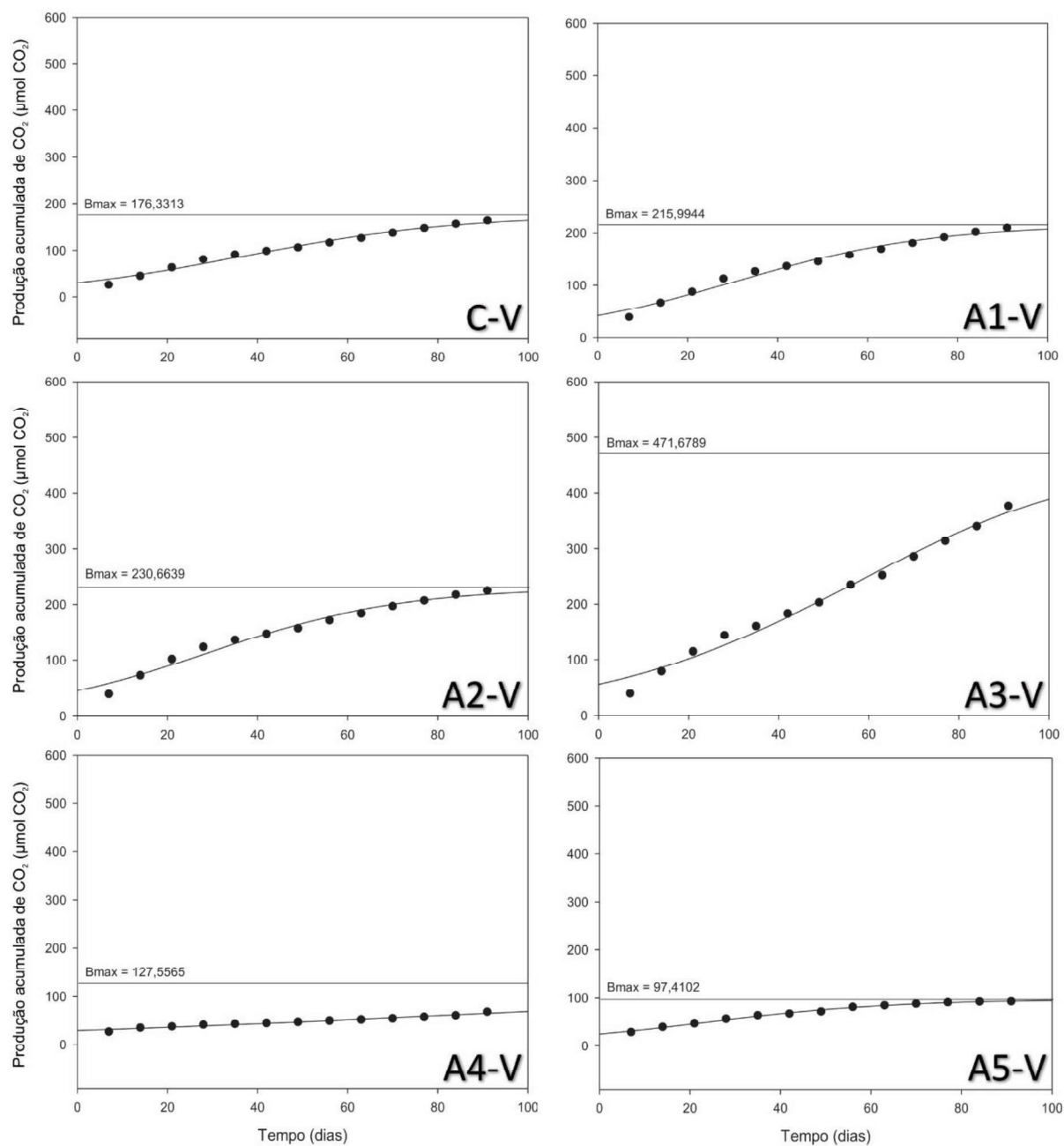


Fonte: Autor (2021).

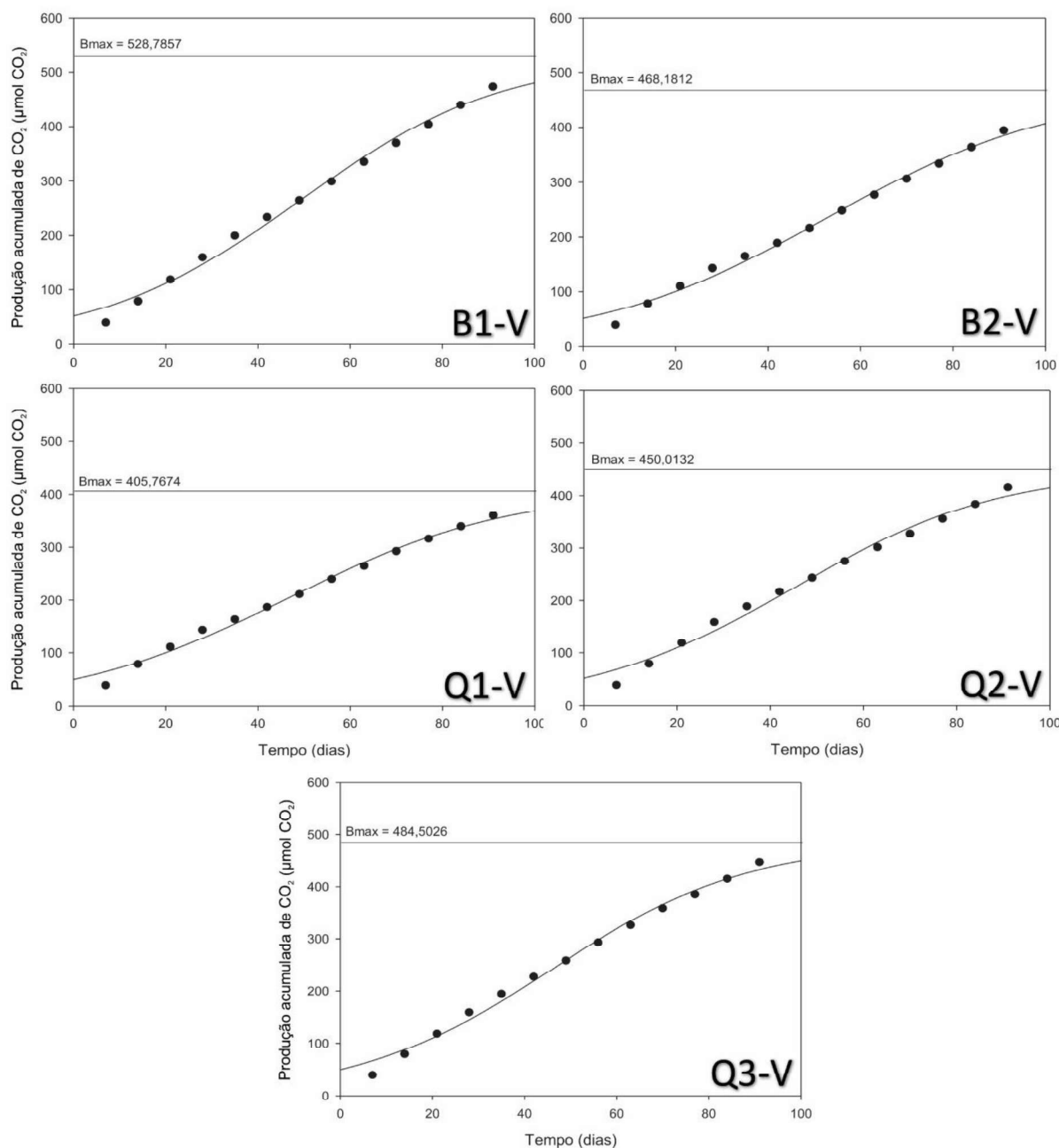
« **Figura 13** – Continuação



« Figura 13 – Continuação



« Figura 13 – Continuação



Os resultados da modelagem matemática demonstraram que ensaios contendo altas concentrações de AFFF 6% possuem maior previsão de tempo de biodegradação. Estes resultados estão em total conformidade com àqueles obtidos por meio dos ensaios com respirômetros de Bartha e Pramer, que apresentaram baixa produção de µmol de CO₂.semana⁻¹ e, portanto, reforçam a evidência indireta da baixa biodegradação de AFFF 6% aqui observada. Além disso, a modelagem matemática corrobora a interação positiva da AFFF 6% com QAV, uma vez que os ensaios de cocontaminação apresentaram uma das maiores taxas previstas de produção de µmol de CO₂ acumulado. No presente estudo, o prognóstico cinético demonstrou

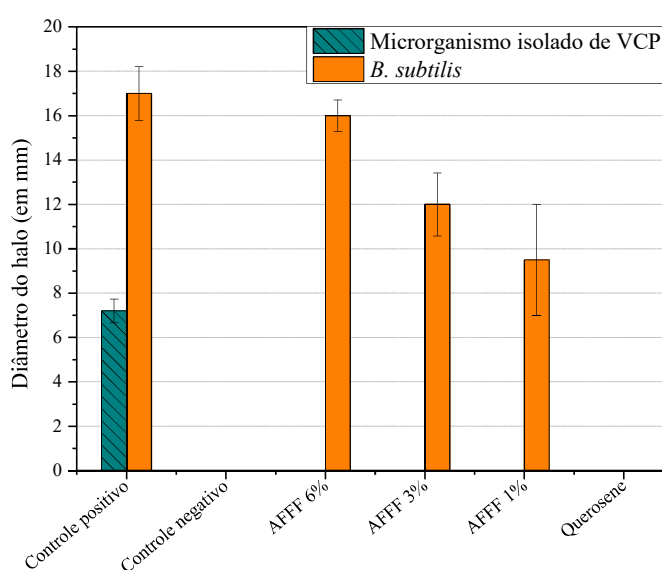
índice de correlação (R^2) satisfatório ($> 0,9796$) para todos os ensaios analisados, o que sugere a confiabilidade dos dados levantados.

4.3. Ecotoxicidade por disco-difusão de Kirby-Bauer

A susceptibilidade do *B. subtilis* e do microrganismo isolado mais recorrente do solo de VCP em relação aos contaminantes não biodegradados (i.e., ecotoxicidade inicial) é representada na Figura 14 e exemplificada na Figura 15A-B. Os dados brutos são apresentados no APÊNDICE I, Tabela 8.

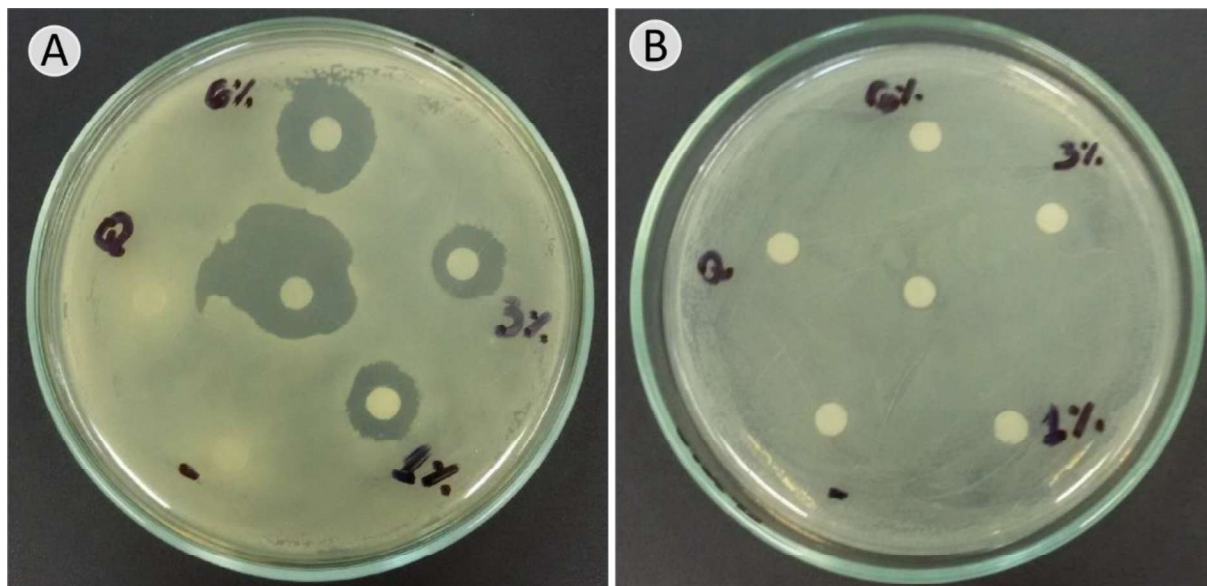
Maior susceptibilidade do *B. subtilis* ao AFFF 6% (16,0 mm) e AFFF 3% (12,0 mm) foi observada ao comparar o diâmetro dos halos formados (Figuras 14; APÊNDICE I, Tabela 8). Neste sentido, quanto maior a concentração de AFFF, maior é a susceptibilidade do *B. subtilis* ao contaminante (Figura 14; APÊNDICE I, Tabela 8). Por outro lado, nenhum dos microrganismos estudados apresentaram susceptibilidade ao QAV (Figura 14; APÊNDICE I, Tabela 8). Os resultados do experimento ainda mostraram que o microrganismo nativo do solo de VCP não teve seu crescimento inibido em nenhum ensaio contendo os contaminantes estudados, bem como não apresentou susceptibilidade considerável até mesmo para o controle positivo (7,2 mm) (Figura 14; APÊNDICE I, Tabela 8).

Figura 14 – Diâmetro do halo (disco-difusão de Kirby-Bauer) para os contaminantes em *Bacillus subtilis* e microrganismo nativo isolado do solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP).



Fonte: Autor (2021).

Figura 15 – Halos formados para *Bacillus subtilis* (A) e microrganismo nativo do solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP) (B). As imagens (A) e (B) exemplificam apenas uma das triplicatas utilizadas para o cálculo da susceptibilidade.



Fonte: Autor (2021).

Altas concentrações de AFFF sugerem que este contaminante é tóxico ao *B. subtilis*. Neste sentido, a AFFF promove efeito inibitório para o estabelecimento e a multiplicação desta bactéria Gram-positiva (i.e., susceptibilidade). Em contraste, o QAV parece não apresentar toxicidade aos microrganismos estudados, uma vez que não foi identificado nenhum efeito inibitório. Conforme salientado, o método de disco-difusão de Kirby-Bauer é frequentemente utilizado para a avaliação da susceptibilidade de bactérias a antibióticos (e.g., TARALE et al. 2015; KOVALE et al., 2021). Contudo, este método proveu resultados relevantes ao presente estudo e, portanto, mostra-se promissor para futuras análises ecotoxicológicas.

A resistência do microrganismo do solo de VCP sugere sua adaptabilidade em relação aos contaminantes. Esta resistência pode ser explicada a partir da contaminação recorrente do local de origem da amostra de solo, onde os microrganismos passam pelo processo de seleção ao longo de diversos anos em contato com os contaminantes estudados. Neste sentido, estes microrganismos podem estar utilizando os contaminantes como substrato para sua multiplicação, ao passo que microrganismos não resistentes não se estabelecem no ambiente local. Uma vez que objetivo do presente estudo não contempla a identificação deste microrganismo, o desenvolvimento de trabalhos que visem a aplicação de técnicas independentes de cultivo (KIRK et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 2011) e metagenômica (MONTAGNOLLI, 2015) são algumas das possibilidades recomendadas para conclusões

aprofundadas. Contudo, a resistência deste microrganismo parece promissora para processos de biorremediação de solos contaminados com AFFF e QAV.

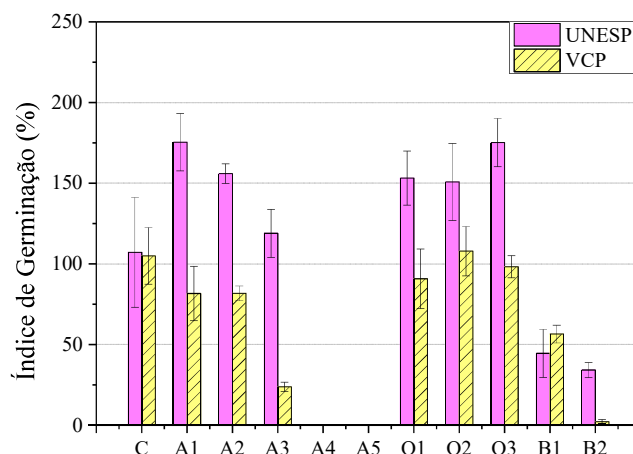
4.4. Ecotoxicidade por germinação de sementes

O índice de germinação de sementes de alface após a biodegradação dos contaminantes (i.e., ecotoxicidade após 91 dias) é representado na Figura 16. Os dados brutos são apresentados no APÊNDICE I, Tabela 9.

Tendência na redução do índice de germinação de sementes foi observada com o aumento da concentração de AFFF 6%, em que ensaios contendo 50,0 ml de AFFF 6% (A4) e 100,0 ml de AFFF 6% (A5) não apresentaram índice de germinação (Figura 16; APÊNDICE I, Tabela 9). Os ensaios contendo apenas QAV como substrato (Q1, Q2 e Q3) não apresentaram comportamento padronizado (Figura 16; APÊNDICE I, Tabela 9). Já os ensaios de cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV (B1) e cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV (B2) estão dentre os menores índices de germinação para ambos os solos (Figura 16; APÊNDICE I, Tabela 9). O índice de germinação das sementes em solo da UNESP foi maior do que o de VCP, com exceção do ensaio de cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV (B1) (Figura 16; APÊNDICE I, Tabela 9). Em alguns ensaios, o índice de germinação excedeu 100%: (i) UNESP: C, A1, A2, A3, Q1, Q2 e Q3; (ii) VCP: C e Q2 (Figura 16; APÊNDICE I, Tabela 9).

Figura 16 – Índice de germinação de sementes para o solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP). C (solo controle), A1 (0,5 ml de AFFF 6%), A2 (1,0 ml de AFFF 6%), A3 (5,0 ml de AFFF 6%), A4 (50,0 ml de AFFF 6%), A5 (100,0 ml de AFFF 6%), Q1 (0,5 ml de QAV), Q2 (1,0 ml de QAV), Q3 (2,5 ml de QAV), B1 (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV), B2 (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). »

«



Fonte: Autor (2021).

A tendência na redução do índice de germinação de sementes em solos com AFFF pode estar relacionada à composição química do contaminante. Neste sentido, maiores concentrações de AFFF podem contribuir para maior acidez e liberação de componentes orgânicos pelo contaminante no meio, influenciando diretamente no índice de germinação. Resultados similares foram observados em estudo sobre biorremediação de áreas contaminadas após incêndios de petróleo e petroquímicos (MONTAGNOLLI, 2015), o que pode explicar o baixo índice de germinação em ensaios de cocontaminação.

Considerando os ensaios respirométricos de cocontaminação B1 e B2 para ambos os solos, que obtiveram uma das maiores taxas de μmol de CO_2 acumulado, é clara a correlação da maior produção de CO_2 e menor índice de germinação. Este fato pode estar associado à degradação dos contaminantes, que possivelmente geraram subprodutos potencialmente tóxicos às sementes, influenciando negativamente na germinação e no crescimento (CLARO, 2017; CRUZ, 2017). Por outro lado, o menor índice de germinação de sementes em ensaios contendo solo de VCP quando comparados ao solo da UNESP sugere que os microrganismos nativos provavelmente utilizaram os subprodutos da degradação do contaminante como substrato para sua multiplicação. Ou seja, a habilidade do microrganismo em utilizar em seu favor subprodutos da degradação contribui para sua multiplicação, o que gera ainda mais subprodutos tóxicos, que, consequentemente, diminuem a germinação de sementes devido à elevada toxicidade do meio.

A ocorrência de ensaios com índice de germinação acima de 100% em solos contaminados merece destaque. Em tese, ensaios com índice de germinação acima de 100% sugerem que não há toxicidade no meio. Uma vez que o solo foi contaminado, oscilações na

temperatura podem ter influenciado no maior índice de germinação nestes ensaios. A temperatura ideal de germinação de sementes de diversos cultivares de alface é de 20-25°C (NASCIMENTO et al., 2012). Contudo, cultivares de alface são altamente sensíveis a variações de temperatura para o desempenho de suas funções vitais, como a germinação (MENEZES et al., 2000). Considerando que os ensaios com solos contaminados apresentaram alta produção de CO₂ e que as placas de Petri foram embaladas com filme plástico e mantidas a 20°C, a elevada atividade de microrganismos no interior da placa possivelmente aumentou a temperatura do meio e causou efeito positivo na germinação, mesmo na presença de contaminantes. Neste sentido, o aumento no número de sementes germinadas implica em maior índice de germinação, visto que seu cálculo considera o número de sementes germinadas comparado ao controle e inclui dados de germinação relativa e alongação radicular relativa. Estudos específicos sobre a influência da temperatura na germinação de sementes de alface nas condições adotadas no presente estudo são necessários para conclusões precisas.

5 CONCLUSÕES

O estudo da biodegradação e ecotoxicidade do QAV e da AFFF mostrou-se relevante para a compreensão do efeito ambiental destes contaminantes após simulações de emergência aérea.

Os dados levantados sugerem que simulações de emergência aérea acumulam subprodutos da biodegradação de QAV e AFFF no solo, que são potencialmente tóxicos em longo prazo. Além disso, a modelagem matemática sobre a cinética de degradação demonstrou clara correlação entre a maior concentração de AFFF e o maior tempo de degradação do contaminante. Contudo, é evidente que a composição química do contaminante influencia seu potencial de degradação pelo microrganismo. O aproveitamento do potencial surfactante de biocompostos como medida de remediação é, portanto, a alternativa ambientalmente mais conveniente para auxiliar na biodegradação destes contaminantes.

O método de disco-difusão de Kirby-Bauer evidencia o impacto ambiental da AFFF sob *B. subtilis*, mostrando-se promissor para futuras análises ecotoxicológicas. A aplicação deste método ainda permitiu evidenciar a resistência do microrganismo nativo do solo de VCP e, consequentemente, seu potencial para processos de biorremediação em solos contaminados com QAV e AFFF.

O índice de germinação é afetado por altas concentrações de AFFF e em situações de cocontaminação com QAV, o que pode ser potencializado em contato com subprodutos da

biodegradação dos contaminantes. Por outro lado, apesar do índice de germinação sugerir baixa toxicidade para muitos destes ensaios, estudos específicos são necessários para avaliar a influência da temperatura na germinação de sementes de alface, fator que pode mascarar os resultados do índice de germinação.

Finalmente, o presente estudo salienta a necessidade da elaboração de planos de manejo e de remediação do solo após simulações de emergência aérea frente ao efeito ambiental negativo destes contaminantes. Neste sentido, o incentivo ao emprego da biorremediação do solo e do desenvolvimento de biossurfactantes financeiramente acessíveis, aliado à fiscalização rigorosa das simulações de emergência aérea, são essenciais para garantir o menor impacto ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6502: Rochas e solos. Rio de Janeiro, p. 18. 1995.

AELION, C. M.; BRADLEY, P. M. Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, p. 57-63, 1991.

AHRENS, L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 13, n. 1, p. 20-31, 2011.

AMUND, O. O.; ADEBIYI, A. G. Effect of viscosity on the biodegradability of automotive lubricating oils. *Tribology International*, v. 24, n. 4, p. 235-237, 1991.

ANAC - Agência Nacional de Aviação Civil. Aeródromos - Operação, Manutenção e Resposta à Emergência. Regulamento Brasileiro de Aviação Civil nº 153, Emenda nº 02, 2018.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm> Acesso em: maio de 2019.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Scientia Agricola*, v.62, p. 286-290, 2005.

ARORA, D.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 12, n. 3, p. 257-262, 1999.

ATAG - Air Transport Action Group. Disponível em: <<https://www.atag.org/>> Acesso em: 12 de maio de 2018.

AWAD, E.; ZHANG, X.; BHAVSAR, S. P.; PETRO, S.; CROZIER, P. W.; REINER, E. J.; FLETCHER, R.; TITTELMIER, S. A.; BRAEKEVELT, E. Long-term environmental fate of perfluorinated compounds after accidental release at Toronto airport. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 19, p. 8081-8089, 2011.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. A qualidade da água na agricultura. Campina Grande: UFPB, 1999.

BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Biorremediation of Oil – Contaminated Soil: Microbiologicals Methods for Feasibility, Assessment and Field, Evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 3, p. 155-164, 1998.

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.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BOBERT, M.; PERSSON, H.; PERSSON, B. Foam Concentrates: Viscosity and Flow Characteristics. *Fire Technology*, v. 33, n. 4, p. 336-355, 1997.

BOURGEOIS, A.; BERGENDAHL, J.; RANGWALA, A. Biodegradability of fluorinated fire-fighting foams in water. *Chemosphere*, v. 131, p. 104-109, 2015.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. Norma técnica L6.350, 1990.

CLARO, E. M. T. Biodegradação de gasolina e óleo diesel utilizando biossurfactantes e *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro/SP, 2017.

COUSINS, I. T.; VESTERGREN, R.; WANG, Z.; SCHERINGER, M.; MCLACHLAN, M. S. The precautionary principle and chemicals management: the example of perfluoroalkyl acids in groundwater. *Environment International*, v. 94, p. 331-340, 2016.

CRUZ, J. M. Produção de biossurfactante a partir de glicerol para aplicação durante a biodegradação de misturas biodiesel/diesel em solo. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro/SP, 2017.

DAVIS K. L.; AUCOIN, M. D.; LARSEN, B. S.; KAISER, M. A.; HARTTEN, A. S. Transport of ammonium perfluorooctanoate in environmental media near a fluoropolymer manufacturing facility. *Chemosphere*, v. 67, n. 10, p. 2011-2019, 2007.

DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay - Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. Toronto: National Water Research Institute, 1989.

GARCÍA, R. A.; CHIAIA-HERNANDEZ, A. C.; LARA-MARTIN P. A.; LOOS, M.; HOLLENDER, J.; OETJEN, K.; HIGGINS C. P.; FIELD, J. A. Suspect Screening of Hydrocarbon Surfactants in AFFFs and AFFF-Contaminated Groundwater by High-Resolution Mass Spectrometry. *Environmental Science and Technology*, v. 53, p. 8068-8077, 2019.

GIESY, J. P.; KANNAN, K. Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental Science and Technology*, v. 35, n. 7, p. 1339-1342, 2001.

GONZÁLEZ, N.; SIMARRO, R.; MOLINA, M. C.; BAUTISTA, L. F.; DELGADO, L.; VILLA, J. A. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 20, p. 9438-9446, 2011.

GOOGLE EARTH PRO. 2019. Google Maps. Acesso em: maio de 2019.

HIGGINS, C. P.; FIELD, J. A.; CRIDDLE, C. S.; LUTHY, R. G. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology*, v. 39, n. 11, p. 3946-3956, 2005.

HOUDE, M.; CZUB, G.; SMALL, J. M.; BACKUS, S.; WANG, X.; ALAEE, M.; MUIR, D. C. G. Fractionation and bioaccumulation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) isomers in a Lake Ontario food web. *Environmental Science and Technology*, v. 42, n. 4, p. 9397-9403, 2008.

JAIN, D. K.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 87-93, 1992.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 58, n. 1, p. 169-188, 2004.

KOVALE, L.; NIMONKAR, Y. S.; GREEN, S. J.; SHOUCHE, Y. S.; PRAKASH, O. Antibiotic susceptibility of human gut-derived facultative anaerobic bacteria is different under aerobic versus anaerobic test conditions. *Microbes and Infection*, v. 23, 104847, 2021.

LANNA-FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

LOPES, P. R. M. Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro/SP, 2014.

MENEZES, N. L.; SANTOS, O. S.; NUNES, E. P.; SCHMIDT, D. Qualidade fisiológica de sementes de alface submetidas a diferentes temperaturas na presença e ausência de luz. *Ciência Rural*, v.30, n.6, p. 941-945, 2000.

MONTAGNOLLI, R. N. Incêndios de petróleo e petroquímicos: Biorremediação de áreas afetadas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro/SP, 2015.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 187, n. 1, p. 4116-4122, 2014.

MONTAGNOLLI, R. N. Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro/SP, 2011.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 63, n. 3, p. 297-305, 2009.

MOODY, C. A.; FIELD, J. A. Perfluorinated surfactants and the environmental implications of their use in fire-fighting foams. *Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 18, p. 3864-3870, 2000.

MOODY, C. A.; FIELD, J. A. Determination of perfluorocarboxylates in groundwater impacted by fire-fighting activity. *Environmental Science and Technology*, v. 33, n. 16, p. 2800-2806, 1999.

MORALES, C. G. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, 2004.

MURAKAMI, M.; IMAMURA, E.; SHINOHARA, H.; KIRI, K., MURAMATSU, Y.; HARADA, A.; TAKADA, H. Occurrence and sources of perfluorinated surfactants in rivers in Japan. *Environmental Science and Technology*, v. 42, n. 17, p. 6566-6572, 2008.

NASCIMENTO, W. M.; CRODA, M. D.; LOPES, A. C. A. Produção de sementes, qualidade fisiológica e identificação de genótipos de alface termotolerantes. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 34, n. 3, p. 510-517, 2012.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 81-85, 2004.

OECD - Organization for the Economic Cooperation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. Test no 307: Aerobic and Anaerobic transformation in soil, 2002.

OLIVARES, C. I.; SHAN, Y.; COOK, E. K.; CHOI, Y. J.; MONTAGNOLLI, R.; BYRNE, A.; HIGGINS, C. P.; SEDLAK, DAVID L.; ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic BTEX biodegradation increases yield of perfluoroalkyl carboxylic acids from biotransformation of a polyfluoroalkyl surfactant, 6:2 FtTAoS. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 1, p. 1, 2022.

REMDE, A.; DEBUS, R. Biodegradability of fluorinated surfactants under aerobic and anaerobic conditions. *Chemosphere*, v. 32, n. 8, p. 1563-1574, 1996.

SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 323-331, 1985.

SCHULTZ, M.; BAROFSKY, D.; FIELD, J. Fluorinated alkyl surfactants. *Environmental Engineering Science*, v. 20, n. 5, p. 487-501, 2004.

SHABIR, G.; AFZAL, M.; ANWAR, F.; TAHSEEN, R.; KHALID, Z. M. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 61, p. 161-166, 2008.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) In: MORALES, G. C. (Ed.). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas em agua y suelo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, México, 2008.

SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; LEBEAULT, J. M.; VANDEECASSTEELE, J. P. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by culture head space monitoring. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p. 19-22, 2000.

SONG, H. G.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 652-656, 1990.

TARALE, P.; GAWANDE, S.; JAMBHULKAR, V. Antibiotic susceptibility profile of bacilli isolated from the skin of healthy humans. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 4, p. 1111-1118, 2015.

TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, v. 93, n. 3, p. 249-256, 1996.

WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation-Effects of pH and ammonium addition. *Journal of Hazardous Materials*, v. 164, n. 2, p. 1045-1050, 2008.

YAMASHITA, N.; KANNAN, K.; TANIYASU, S.; HORII, Y.; OKAZAWA, T.; PETRICK, G.; GAMO, T. Analysis of perfluorinated acids at parts-perquadrillion levels in seawater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, v. 38, n. 21, p. 5522-5528, 2004.

ZHANG, S.; LERNER, D. N. Review of Physical and Chemical Properties of Perfluorooctanyl Sulphonate (PFOS) with Respect to its Potential Contamination on the Environment. *Advanced Materials Research*, v. 518-523, p. 2183-2191, 2012.

APÊNDICE I

Tabelas com dados brutos

Tabela 1 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C-U (controle), A1-U (0,5 ml de AFFF 6%), A2-U (1,0 ml de AFFF 6%), A3-U (5,0 ml de AFFF 6%), A4-U (50,0 ml de AFFF 6%) e A5-U (100,0 ml de AFFF 6%). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP)

TEMPO (em dias)	PRODUÇÃO CO ₂ (μmol de CO ₂ .semana ⁻¹)					
	C-U	A1-U	A2-U	A3-U	A4-U	A5-U
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	26,32	38,79	38,79	24,16	11,51	16,24
14	21,05	19,65	25,95	36,96	3,09	0,00
21	20,93	20,09	29,11	36,36	10,46	10,23
28	21,85	20,49	26,36	34,79	10,72	7,80
35	15,43	16,32	22,64	31,31	4,20	4,87
42	15,06	17,31	22,34	32,05	8,53	5,65
49	13,78	18,40	20,75	33,80	13,03	5,85
56	12,66	16,92	19,72	25,78	4,10	1,86
63	14,59	19,10	22,29	26,29	6,32	3,74
70	14,07	16,14	20,20	19,57	1,35	2,69
77	15,16	16,73	22,01	18,77	9,00	3,50
84	17,11	19,76	20,75	15,22	15,14	10,16
91	15,60	20,86	20,53	15,55	13,83	12,50

Tabela 2 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C-V (controle), A1-V (0,5 ml de AFFF 6%), A2-V (1,0 ml de AFFF 6%), A3-V (5,0 ml de AFFF 6%), A4-V (50,0 ml de AFFF 6%) e A5-V (100,0 ml de AFFF 6%). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP)

TEMPO (em dias)	PRODUÇÃO CO ₂ (μmol de CO ₂ .semana ⁻¹)					
	C-V	A1-V	A2-V	A3-V	A4-V	A5-V
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7	25,78	39,16	39,16	39,16	27,39	29,04
14	19,15	27,74	33,46	39,82	8,36	10,87
21	18,11	20,57	29,07	35,48	2,49	7,29
28	17,38	25,28	21,47	29,26	3,63	9,59
35	10,34	13,75	12,84	16,61	1,65	6,93
42	7,87	9,74	11,11	22,66	1,54	3,54
49	7,62	8,66	9,92	19,91	2,42	4,51
56	10,47	12,69	14,52	32,34	2,50	9,57
63	10,00	11,35	12,42	17,07	2,38	3,49
70	10,98	11,70	12,79	33,66	2,19	3,36
77	10,21	11,19	10,40	27,50	3,19	2,77
84	9,19	10,15	10,58	26,48	2,88	1,54
91	7,12	7,70	7,60	36,85	7,59	0,45

Tabela 3 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C-U (controle), Q1-U (0,5 ml de QAV), Q2-U (1,0 ml de QAV) e Q3-U (2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP)

TEMPO (em dias)	PRODUÇÃO CO ₂ (μmol de CO ₂ .semana ⁻¹)			
	C-U	Q1-U	Q2-U	Q3-U
0	0,00	0,00	0,00	0,00
7	26,32	38,79	38,79	38,79
14	21,05	32,60	36,96	36,96
21	20,93	30,65	32,30	37,42
28	21,85	27,62	35,80	34,79
35	15,43	21,01	26,82	30,29
42	15,06	21,38	29,32	29,08
49	13,78	21,55	24,43	30,24
56	12,66	21,24	21,10	28,38
63	14,59	23,86	27,68	34,39
70	14,07	20,52	21,44	33,22
77	15,16	21,11	22,42	33,91
84	17,11	23,46	35,60	33,56
91	15,60	26,41	25,04	34,89

Tabela 4 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C-V (controle), Q1-V (0,5 ml de QAV), Q2-V (1,0 ml de QAV) e Q3-V (2,5 ml de QAV). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP)

TEMPO (em dias)	PRODUÇÃO CO ₂ (μmol de CO ₂ .semana ⁻¹)			
	C-V	Q1-V	Q2-V	Q3-V
0	0,00	0,00	0,00	0,00
7	25,78	39,16	39,16	39,16
14	19,15	39,29	39,82	39,82
21	18,11	32,46	39,56	39,56
28	17,38	32,40	39,99	40,70
35	10,34	20,35	30,14	35,09
42	7,87	23,06	28,51	33,00
49	7,62	24,55	26,37	31,24
56	10,47	28,93	31,35	34,32
63	10,00	24,48	26,54	32,93
70	10,98	27,81	25,61	32,78
77	10,21	23,51	28,18	26,71
84	9,19	23,10	28,25	29,68
91	7,12	20,55	32,29	31,55

Tabela 5 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C-U (controle), B1-U (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2-U (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP)

TEMPO (em dias)	PRODUÇÃO CO ₂ (μmol de CO ₂ .semana ⁻¹)		
	C-U	B1-U	B2-U
0	0,00	0,00	0,00
7	26,32	39,16	37,17
14	21,05	39,67	37,90
21	20,93	39,56	39,56
28	21,85	40,70	40,70
35	15,43	36,34	39,26
42	15,06	33,67	36,53
49	13,78	28,89	35,42
56	12,66	34,58	39,09
63	14,59	30,10	36,04
70	14,07	29,27	36,80
77	15,16	25,65	37,53
84	17,11	26,88	38,54
91	15,60	25,35	36,17

Tabela 6 – Produção de CO₂ semanal pelo tempo de incubação em ensaios C-V (controle), B1-V (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV) e B2-V (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP)

TEMPO (em dias)	PRODUÇÃO CO₂ (μmol de CO₂.semana⁻¹)		
	C-V	B1-V	B2-V
0	0,00	0,00	0,00
7	25,78	39,16	39,16
14	19,15	39,82	39,16
21	18,11	39,56	31,53
28	17,38	40,70	32,89
35	10,34	40,37	21,84
42	7,87	33,77	24,31
49	7,62	30,71	27,17
56	10,47	35,31	32,12
63	10,00	35,79	28,50
70	10,98	34,56	29,59
77	10,21	34,21	27,64
84	9,19	35,20	29,90
91	7,12	34,30	30,36

Tabela 7 – Dados de valor máximo de biodegradação previsto (Bmax), tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto (T Bmax) e índice de correlação (R^2) do modelo matemático aplicado sobre a respirometria e produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos. U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP)

ENSAIOS	Bmax ($\mu\text{mol CO}_2$)	T Bmax (dias)	R^2
C-U (solo controle)	247,0598	154,8670	0,9931
A1-U (0,5 ml de AFFF 6%)	309,7950	173,3870	0,9971
A2-U (1,0 ml de AFFF 6%)	347,0251	156,1730	0,9963
A3-U (5,0 ml de AFFF 6%)	343,3525	114,1860	0,9960
A4-U (50,0 ml de AFFF 6%)	138,1424	184,0550	0,9867
A5-U (100,0 ml de AFFF 6%)	106,6088	209,0720	0,9796
Q1-U (0,5 ml de QAV)	373,0714	160,6870	0,9943
Q2-U (1,0 ml de QAV)	415,4258	152,1590	0,9934
Q3-U (2,5 ml de QAV)	514,3371	164,7430	0,9956
B1-U (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV)	456,0895	136,0450	0,9959
B2-U (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV)	554,5938	151,8970	0,9964
C-V (solo controle)	176,3313	145,9380	0,9906
A1-V (0,5 ml de AFFF 6%)	215,9944	131,4850	0,9903
A2-V (1,0 ml de AFFF 6%)	230,6639	127,6540	0,9882
A3-V (5,0 ml de AFFF 6%)	471,6789	185,9090	0,9927
A4-V (50,0 ml de AFFF 6%)	127,5565	428,1740	0,9822
A5-V (100,0 ml de AFFF 6%)	97,4102	121,1950	0,9970
Q1-V (0,5 ml de QAV)	405,7674	154,7220	0,9952
Q2-V (1,0 ml de QAV)	450,0132	147,3570	0,9937
Q3-V (2,5 ml de QAV)	484,5026	143,5710	0,9959
B1-V (cocontaminação de 1,0 ml de AFFF 6% e de 1,0 ml de QAV)	528,7857	150,8620	0,9956
B2-V (cocontaminação de 5,0 ml de AFFF 6% e de 2,5 ml de QAV)	468,1812	167,7280	0,9958

Tabela 8 – Valores dos halos formados (em mm) para cada substância testada em *Bacillus subtilis* e microrganismo nativo do solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP)

SUBSTÂNCIA	FORMAÇÃO DE HALO (em mm)	
	MICROORGANISMO	<i>B. subtilis</i>
Controle positivo	7,2	17
Controle negativo	0	0
AFFF 6%	0	16
AFFF 3%	0	12
AFFF 1%	0	9,5
QAV	0	0

Tabela 9 – Valores do índice de germinação (%) para cada ensaio após o período de biorremediação. U = solo da Universidade Estadual Paulista (UNESP). V = solo do Aeroporto Internacional de Viracopos (VCP)

ENSAIOS	ÍNDICE DE GERMINAÇÃO (%)	
	UNESP	VCP
C	107,20	104,93
A1	175,34	81,64
A2	155,93	81,75
A3	118,94	23,77
A4	0,00	0,00
A5	0,00	0,00
Q1	153,19	90,81
Q2	150,78	107,90
Q3	175,13	98,20
B1	44,56	56,53
B2	34,23	2,18

