

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

**ESTUDO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DA GASOLINA EM SOLO
ATRAVÉS DO USO DE MICRORGANISMOS**

Eduardo Malheiro Novaes

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Rio Claro (SP)

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Geociências e Ciências Exatas

Câmpus de Rio Claro

EDUARDO MALHEIRO NOVAES

ESTUDO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DA GASOLINA
EM SOLO ATRAVÉS DO USO DE MICRORGANISMOS

*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

2024

N935e

Novaes, Eduardo Malheiro

Estudo do potencial de biodegradação da gasolina em solo através do uso de microrganismos / Eduardo Malheiro Novaes. -- Rio Claro, 2024

66 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro

Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Biorremediação. 2. Hidrocarboneto. 3. Solo. 4. Microrganismos. 5. Respirometria. I. Título.

EDUARDO MALHEIRO NOVAES

ESTUDO DO POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DA GASOLINA
EM SOLO ATRAVÉS DO USO DE MICRORGANISMOS

*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. Ederio Dino Bidoia

Prof. Dr. Marcelo Loureiro Garcia

Prof. Dr. Pedro Henrique Mainardi

Rio Claro, 27 de novembro de 2024.

Assinatura do aluno

Assinatura do orientador

**Dedico à minha mãe e ao meu pai,
que me proporcionaram todo o suporte e condições
para que eu pudesse concluir este curso de graduação.**

Agradecimentos

A conclusão deste trabalho representa não apenas o fim de uma etapa acadêmica, mas também o resultado de uma jornada marcada por aprendizado, desafios e conquistas. Agradeço a Deus por tudo que é proporcionado em minha vida.

Não seria possível estar aqui sem o apoio da minha família. Por isso, quero demonstrar a minha mais profunda gratidão à minha mãe, Aparecida Malheiro Novaes, e ao meu pai, Osmar Rodrigues Novaes, pelo seu suporte, pela sua confiança e por fazerem o seu melhor, todos os dias, para me proporcionar oportunidades de conquistar os meus objetivos.

Agradeço aos docentes da Engenharia Ambiental e aos servidores dos demais departamentos do IGCE e do IB, que também colaboraram com a realização deste curso de graduação. Agradeço ao Professor Ederio Dino Bidoia por abrir as portas do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Meio Ambiente e me possibilitar a realização dos experimentos. Agradeço também aos companheiros de laboratório (Elétron, Pedro e Vini Ruy) por todo o apoio (primordial) para a realização dos experimentos e análises.

Por fim, agradeço aos colegas de Engenharia Ambiental e UNESP que fizeram parte dessa jornada desde o dia da matrícula. Aos amigos da Rep. Refúgio e da Rep.Til, que me acolheram e estiveram ao meu lado nos momentos de dificuldade, aprendizado e celebração.

“O custo do cuidado é sempre menor que o custo do reparo”.

(Autor desconhecido).

RESUMO

São comuns as ocorrências de contaminação do solo decorrentes do armazenamento subterrâneo de gasolina em postos de combustíveis. Estes episódios acarretam riscos à saúde dos seres vivos, prejuízos ao ambiente (solos e águas subterrâneas) e danos materiais. Os microrganismos podem mediar transformações em contaminantes orgânicos. O objetivo desta pesquisa foi analisar o potencial de aplicação da bactéria *Bacillus subtilis* em conjunto com o surfactante *Tween*® 80 para acelerar o processo de degradação da gasolina (contaminante) misturada ao solo. Os experimentos receberam acompanhamento semanal para monitorar a variação da respirabilidade das bactérias do solo, que foi armazenado em um sistema fechado, denominado “respirômetro de Bartha”. Foram realizados testes de fitotoxicidade em sementes, utilizando placas de Petri contendo diferentes teores de contaminante, surfactante, bactéria e água, para comparação com os controles positivos e negativos, ao início e ao final do experimento. Após análise considerando dados de condutividade, pH e crescimento das raízes das sementes de rúcula (*Eruca sativa*) para avaliação da possibilidade de alteração da toxicidade do solo contaminado com gasolina, após o experimento foi possível destacar que os tratamentos que combinaram a bactéria *Bacillus subtilis* e o surfactante *Tween*® 80 demonstraram potencial eficácia para degradação do hidrocarboneto (gasolina) e recuperação do solo.

Palavras-chaves: Hidrocarboneto; Solo; Biorremediação; Microrganismos; Respirometria.

ABSTRACT

Soil contamination from underground gasoline storage at fuel stations is a common occurrence. These incidents pose risks to the health of living organisms, harm the environment (soil and groundwater), and cause material damage. Microorganisms can mediate transformations in organic contaminants. This research aimed to analyze the potential application of the bacterium *Bacillus subtilis* combined with the surfactant *Tween*® 80 to accelerate the degradation process of gasoline (contaminant) mixed with soil. The experiments were monitored weekly to track changes in the soil bacteria's respirability, using a closed system known as the "Bartha respirometer." Phytotoxicity tests on seeds were conducted using Petri dishes with varying levels of contaminant, surfactant, bacterium, and water to compare with positive and negative controls at the beginning and end of the experiment. After analyzing conductivity, pH, and root growth data from *Eruca sativa* (arugula) and seeds to assess potential changes in soil toxicity due to gasoline contamination, it was observed that treatments combining *Bacillus subtilis* and *Tween*® 80 showed potential effectiveness in hydrocarbon (gasoline) degradation and soil recovery.

Keywords: Contamination; Hydrocarbon; Soil; Bioremediation; Respirometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação esquemática de caso de vazamento em reservatório de gasolina, que é um líquido não aquoso de densidade menor que a água (LNAPL).....	17
Figura 02 - Representação da reação química esperada para o sistema fechado.....	22
Figura 03 – Homogeneização da granulometria do solo.....	24
Figura 04 – Meio de cultivo permaneceu estéril após ter sido autoclavado e mantido 24 horas sob a temperatura de 35°C.....	25
Figura 05 – Bactérias que tiveram o melhor crescimento após 24 horas.....	26
Figura 06 - Criação da cultura de manutenção e verificação da pureza.....	26
Figura 07 – Processo de decantação dos 5 gramas de solo retirados de cada respirômetro (triplicata), após ter sido misturado a 10 mL de água destilada deionizada, das quais 4 mL foram pipetados nas placas de Petri para realização dos testes de ecotoxicidade em sementes.....	27
Figura 08 - Distribuição das sementes, planejada para os testes de germinação.....	28
Figura 09 - Representação, em corte, de um respirômetro padrão.....	29
Figura 10 – Montagem experimentos (em triplicata) utilizando os respirômetros, a solução de KOH e o solo preparado conforme Quadro 1.....	31
Figura 11 – Os respirômetros ficaram armazenados em uma incubadora BOD, a 28°C, durante as treze semanas de realização dos experimentos.....	31
Figura 12 – Gráfico da condutividade acumulada (mS/cm) ao decorrer dos dias.....	36
Figura 13 – Gráfico <i>Box Plot</i> dos dados de condutividade.....	39
Figura 14 – Gráfico <i>Box Plot</i> do pH.....	46
Figura 15 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes do controle negativo de <i>Eruca sativa</i>	47
Figura 16 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes do controle positivo (ZnO) de <i>Eruca sativa</i>	48

Figura 17 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 1 (testes iniciais e finais).....	49
Figura 18 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 2 (testes iniciais e finais).....	50
Figura 19 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 3 (testes iniciais e finais).....	51
Figura 20 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 4 (testes iniciais e finais).....	52
Figura 21 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 5 (testes iniciais e finais).....	53
Figura 22 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 6 (testes iniciais e finais).....	54
Figura 23 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento (testes iniciais e finais).....	55
Figura 24 – Aparentemente alguns organismos de medida semelhante a esporos, de coloração amarelada, surgiram no Tratamento 7 ao decorrer das semanas.....	56
Figura 25 – Gráfico <i>Box Plot</i> do crescimento radicular das sementes de <i>Eruca sativa</i> do Tratamento 8 (testes iniciais e finais).....	57
Figura 26 – Gráfico do crescimento radicular médio das sementes de <i>Eruca sativa</i> ao início do experimento.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 - Concentrações que foram aplicadas nos testes realizados.....	30
Quadro 02 – Variação semanal da condutividade (mS/cm) da solução de KOH.....	34
Quadro 03 – Valores acumulados dos dados semanais de condutividade (mS/cm).....	35
Quadro 04 - Estatísticas Descritivas de Condutividade.....	38
Quadro 05 - Resultados da Análise de Variância (ANOVA) global para comparação dos respirômetros.....	40
Quadro 06 – Comparativo dos pares, através do Teste de Tukey, para análise dos dados de condutividade.....	41
Quadro 07 – Agrupamento realizado através do teste de Tukey.....	42
Quadro 08 – Variação do pH da solução de KOH.....	43
Quadro 09 – Dados de “Média”, “Desvio Padrão” e “Erro Padrão” obtidos do pH da solução de KOH.....	43
Quadro 10 – Aplicação de ANOVA nos dados do pH da solução de KOH dos respirômetros.....	44
Quadro 11 - Comparação entre médias dos dados de pH, referente ao teste de Tukey.....	45
Quadro 12 – Agrupamento realizado com os dados de pH através do teste de Tukey.....	46
Quadro 13 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 01.....	49
Quadro 14 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 02.....	51
Quadro 15 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 03.....	52
Quadro 16 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 04.....	53

Quadro 17 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 05.....	54
--	----

Quadro 18 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 06.....	55
--	----

Quadro 19 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 07.....	56
--	----

Quadro 20 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 08.....	57
--	----

Quadro 21 – Médias de crescimento e taxa de germinação das sementes no teste inicial.....	58
---	----

Quadro 22 – Médias de crescimento e taxa de germinação das sementes no teste final.....	59
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
IB	Instituto de Biociências
IG	Índice de Germinação
IGCE	Instituto de Geociências e Ciências Exatas
NB	<i>Nutrient Broth</i>
NBR	Norma Brasileira
s.d	Sem data
SMA	<i>Standard Method Ágar</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Os vazamentos de contaminantes.....	16
1.2 A gasolina.....	17
1.3 A biorremediação	18
1.4 A bioaumentação e a bioestimulação	18
1.5 A bactéria <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.6 Análises de toxicidade em sementes	19
1.7 A respirometria.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos gerais	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Método respirométrico e análise da condutividade elétrica	22
3.2 Contaminante.....	23
4 METODOLOGIA.....	24
4.1 Coleta de solo	24
4.2 Criação de cultura de manutenção e verificação da pureza da bactéria	24
4.3 Testes de ecotoxicidade em sementes	27
4.4 Método respirométrico	28
4.5 Os experimentos respirométricos	29
4.6 Índice de Germinação das sementes.....	32
4.7 Tratamento estatístico dos dados.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Análise estatística dos dados da condutividade elétrica da solução de hidróxido de potássio (KOH)	34
5.2 Análise estatística dos dados de pH obtidos da solução de KOH	43
5.3 Análise estatística dos dados de crescimento das raízes em testes de toxicidade em sementes	47
5.4 Médias de crescimento das sementes e taxas de germinação.....	58
6 CONCLUSÕES.....	62
Referências bibliográficas	63

1 INTRODUÇÃO

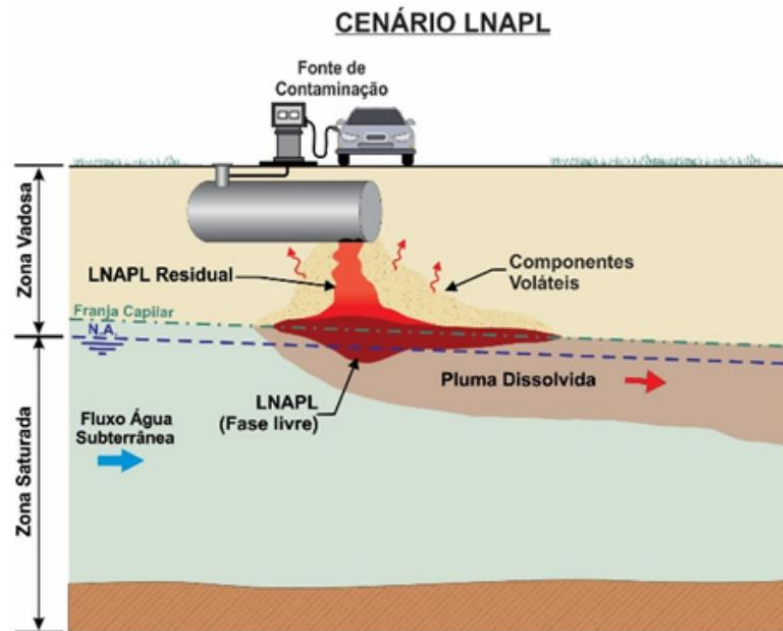
1.1 Os vazamentos de contaminantes

De acordo com a Academia de Ciências do Estado de São Paulo (1987), o termo “contaminante” é definido como “substância ou composto que afeta negativamente o ecossistema, capaz de provocar alterações na estrutura e funcionamento das comunidades” (CETESB, [s.d]). Através dos grupos contaminantes do Relatório de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo produzido pela CETESB (2023), é possível constatar que a maioria dos casos de contaminação registrados envolvem os combustíveis automotivos.

Os postos de combustíveis são estabelecimentos comerciais que fornecem produtos essenciais para facilitar a mobilidade humana, o transporte de bens de consumo e a prestação de serviços durante o dia a dia. Ao fim do ano de 2020, haviam 41.808 postos revendedores de derivados de petróleo em operação no Brasil (ANP, 2021). Ao fim de 2023, a quantidade cresceu para 44.224 postos revendedores de derivados de petróleo operavam no País (ANP, 2023). Em vilarejos isolados e em centros urbanos populosos, onde ocorre consumo massivo de combustíveis fósseis, a contaminação do solo por esses produtos pode se agravar. O armazenamento subterrâneo de produtos químicos como a gasolina em postos de combustíveis pode culminar em contaminação dos solos e de águas subterrâneas (CETESB, 2003).

Os vazamentos acidentais ocorridos através de tanques de armazenamento de gasolina, ou em tubulações utilizadas para o transporte deste combustível, ou em veículos que a utilizam e/ou as transportam, permitem que o contaminante percole frequentemente através do solo, ao longo dos anos, até atingir o lençol freático. À medida que a gasolina é liberada no ambiente, seja por vazamentos em postos de combustíveis ou derramamentos acidentais, é representada uma ameaça direta à qualidade do solo e das águas subterrâneas (CETESB, 2003).

Figura 01 – Representação esquemática de caso de vazamento em reservatório de gasolina, que é um líquido não aquoso de densidade menor que a água (LNAPL).



Fonte: Adaptado de CETESB (2017).

1.2 A gasolina

A gasolina é obtida a partir do processo de refino do petróleo. Trata-se de um combustível cuja composição possui mistura de hidrocarbonetos, ou seja, compostos orgânicos formados por átomos de hidrogênio e carbono (PETROBRAS, [s.d]). Dentre os principais derivados de petróleo vendidos pelas distribuidoras durante a última década, a Gasolina C manteve-se em segundo lugar em número de vendas, atrás apenas do óleo diesel. Durante o ano de 2020, o Estado de São Paulo foi o maior consumidor de gasolina C, atingindo a marca de 7,9 milhões de m³, que representam 20% do total consumido no Brasil para aquele ano (ANP, 2021).

A gasolina C premium é obtida através da mistura do etanol anidro combustível à gasolina A premium – que por sua vez é produzida a partir de processos utilizados nas refinarias, nas centrais de matérias-primas petroquímicas e nos formuladores – conforme proporções definidas pela legislação (ANP, 2021; PETROBRAS, 2015)).

De acordo com a Lei nº 8.723/1993, em seu artigo 9º, fica fixado em 22% (vinte e dois por cento) o percentual obrigatório de adição de álcool etílico anidro combustível à gasolina em todo o território nacional. Apesar disto, o parágrafo 1º do referido artigo assegura que o Poder Executivo

poderá elevar o referido percentual até o limite de 27,5% (vinte e sete inteiros e cinco décimos por cento), desde que constatada sua viabilidade técnica, ou reduzi-lo a 18% (dezoito por cento).

Por vezes, a adição do etanol anidro ocorre de maneira irregular à gasolina, sendo alterada a sua proporção conforme ocorrem variações da disponibilidade do produto no mercado nacional. Deste modo, a contaminação pode ser acentuada por interferir no transporte de hidrocarbonetos, pois grandes concentrações de etanol podem atuar como cossolvente, de modo a potencializar a capacidade de solubilidade de compostos da gasolina formados por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEx) na água, o que potencializa a mobilidade deste contaminante (Paredes et al., 2022).

1.3 A biorremediação

No solo, os microrganismos podem mediar transformações em contaminantes orgânicos. A biodegradação é um processo natural de abatimento de massa de contaminantes, e é considerada uma possível “medida de remediação por tratamento” pela CETESB. Ao iniciar o processo da biodegradação, os hidrocarbonetos são utilizados pelos microrganismos como fonte de energia (funcionam como doadores de elétrons), enquanto os nutrientes (oxigênio molecular, nitratos, sulfatos ou íons férricos) são utilizados como receptores de elétrons para a atividade microbiana. Ao final do processo de biodegradação os hidrocarbonetos são transformados em metabólitos, tais como ácidos orgânicos e/ou CO₂, variando conforme seu respectivo aceptor de elétrons (Cruz, G. F., 2012). Quando há disponibilidade de quantidades suficientemente elevadas de oxigênio, ocorre propensão à biodegradação aeróbica. Nas reações anaeróbicas de biodegradação, também pode-se verificar que o CO₂ é um dos resultados obtidos (CETESB, 2017).

O comprometimento de águas subterrâneas tende a ser mais prolongado, pois tais ambientes não contêm microrganismos aeróbios em quantidade suficiente para promover a efetiva biodegradação dos poluentes. A água funciona como um solvente, que possui grande capacidade de dissolução de substâncias químicas. A sua potabilidade pode ser comprometida com o surgimento de substâncias orgânicas persistentes, que podem ocasionar em alteração da concentração das substâncias presentes na água, impossibilitando sua utilização (CETESB, 2003).

1.4 A bioaugmentação e a bioestimulação

A bioaugmentação pode ser realizada como uma forma de acelerar a biorremediação, tornando mais rápida a biodegradação de um determinado composto poluente, ajudando também a diminuir o

período de adaptação que geralmente antecede o processo de degradação natural. Trata-se de um aumento da microbiota utilizando-se da inoculação de microrganismos alóctones, ou seja, de espécie não nativa de determinada região, introduzidos em um ecossistema, com a possibilidade de persistir ou até reproduzir-se por um tempo, participando ou não de interações e de transformações ecológicas (Andrade, J. A. et al., 2010).

Determinados produtos, com o objetivo de melhorar as condições de biodegradação do contaminante, ou seja, de potencializar a bioestimulação, apresentam em sua formulação compostos surfactantes, micronutrientes e enzimas que facilitam e estimulam a ação microbiana sobre os poluentes (Andrade, J. A. et al., 2010).

1.5 A bactéria *Bacillus subtilis*

Devido às suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas e à capacidade de formar biofilmes, a bactéria *Bacillus subtilis* é amplamente estudada como um fungicida natural e agente promotor de crescimento em plantas. Ele também possui aplicações em biorremediação, ajudando na descontaminação de superfícies afetadas por poluentes (Stein, 2005).

1.6 Análises de toxicidade em sementes

As análises de ecotoxicidade em sementes visam analisar a redução do índice de germinação (IG), pois trata-se da resposta biológica negativa esperada para determinar o efeito fitotóxico. As sementes de rúcula (*Eruca sativa*) possuem rápida germinação, além de outros fatores como o seu baixo custo, a simplicidade na realização do tratamento (não necessitando de grandes equipamentos), e a sensibilidade para indicação da presença de substâncias tóxicas e/ou inibidores biológicos, dentre outros fatores que as tornam algumas das sementes mais utilizadas como bioindicadores de toxicidade (Peduto; Kohatsu, 2019).

1.7 A respirometria

Quando o contaminante encontra-se junto ao solo, alguns microrganismos podem possuir a capacidade de consumir determinados compostos químicos, incluindo componentes presentes no contaminante.

A metodologia proposta originalmente por Richard Bartha e David Pramer em 1965 estabelece um sistema fechado, onde é possível avaliar a degradação de compostos químicos no solo através da quantidade de carbono produzido pela respiração de microrganismos.

A análise é possível através do monitoramento de parâmetros como a condutividade e o pH do hidróxido de potássio (KOH), que podem ser alterados conforme ocorre produção do dióxido de carbono (CO_2), que é emitido pela respiração dos microrganismos presentes em solo, enquanto utilizam determinado composto como fonte de energia. Assim, além da possibilidade de identificar compostos tóxicos ou não tóxicos, a diferença da emissão de CO_2 entre solos tratados e não tratados pode funcionar como um indicador do processo de decomposição de compostos no solo, sendo uma maneira de avaliar o potencial da aplicabilidade de microrganismos específicos para a degradação de determinados contaminantes.

Desta forma, através da inclusão de microrganismos (bioaumentação) e implementação de surfactante (bioestimulação) ao solo (em sistema fechado), o presente trabalho de conclusão de curso possui, como objetivo, a avaliação do potencial de biorremediação de solo contaminado por gasolina. Também será avaliada a ecotoxicidade da gasolina e os possíveis impactos deste contaminante em espécies vegetais (teste de germinação de sementes).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da toxicidade da gasolina sobre a biota do solo coletado na UNESP. Aplicar microrganismos, doses de água e de surfactante para avaliar o potencial de biodegradação deste contaminante, que será mensurado através da utilização do método respirométrico de Bartha e Pramer (1965), de acordo com a ABNT NBR 14283:1999, com a norma técnica da CETESB L6.350 de 1990.

Empregar o método de Bartha e Pramer (1965) para a realização de análises respirométricas semanais. Analisar controles onde serão aplicados diferentes teores de água, surfactante e as bactérias da espécie *Bacillus subtilis*, em solo contaminado com diferentes teores de gasolina C premium.

Caso a bactéria possuísse boa adaptação ao contaminante, era esperada elevada taxa respirométrica durante o consumo do contaminante, além da obtenção de crescimento radicular e índice de germinação satisfatórios. Caso a bactéria não mostrasse boa adaptação ao combustível, eram esperadas baixas taxas respirométricas, e crescimento radicular insatisfatório das sementes analisadas.

2.2 Objetivos específicos

- A. Determinar, por respirometria, a biodegradabilidade da gasolina C premium em solo, utilizando-se da atividade microbiana como forma de remediação;
- B. Analisar a bioestimulação através do uso do tensoativo *Tween®* 80 diluído em 20%;
- C. Analisar o desempenho da bioaumentação na degradabilidade da gasolina C premium com presença de cultura de microrganismos *Bacillus subtilis*;
- D. Através do uso de sementes de rúcula (*Eruca sativa*), analisar a toxicidade do solo antes e após a biodegradação dos contaminantes;
- E. Analisar as variações da condutividade e do pH ao longo do experimento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Método respirométrico e análise da condutividade elétrica

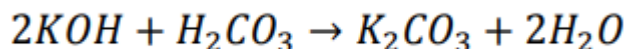
O artigo científico sobre o respirômetro foi publicado por Bartha e Pramer (1965) através da revista *Soil Science*. Com o método, é possível medir a persistência e os efeitos biológicos de contaminantes no solo.

Tais percepções podem ocorrer ao mensurar-se as variações da condutividade do hidróxido de potássio (KOH), que é uma solução iônica em que a condução de eletricidade se dá às custas do movimento dos íons presentes na solução. Para a determinação da condutância da solução, foi utilizado um condutivímetro, capaz de medir a resistência entre dois eletrodos de platina (NUPIS, 2016).

Para que ocorram reações de dupla troca, os reagentes devem sempre estar em sua forma dissociada (sais e bases) ou ionizada (ácidos). Assim, ocorre a troca de íons, ou seja, o cátion (C⁺) de um reagente se liga ao ânion (A⁻) do outro reagente. Espera-se que as reações possam formar algum produto que seja insolúvel (que tende a precipitar), ou formar gás (que tende a evaporar), ou ainda, um ácido fraco (Santos, 2020).

O CO₂ pode causar efeito ácido em soluções alcalinas como o KOH⁻, pois o gás dissolve-se na água da solução e forma ácido carbônico (H₂CO₃), que é um ácido fraco. O ácido carbônico pode reagir com os íons hidróxido (OH⁻) da solução de KOH⁻ para formar água e íons de carbonato de potássio (K₂CO₃) conforme é ilustrado através da Figura 02 (abaixo):

Figura 02 - Representação da reação química esperada para o sistema fechado.



Fonte: Adaptado de Montagnolli, R. N., 2015.

Essa reação diminui a concentração de íons de hidróxido na solução, tornando-a menos alcalina, ou seja, mais ácida. Isso ocorre porque os íons de hidróxido são consumidos pela reação. Como resultado, a condutividade elétrica da solução diminui, porque os íons hidróxido são responsáveis pela alcalinidade da solução. Desta forma, compreende-se que a condutividade é afetada pela produção de dióxido de carbono realizada pelos microrganismos aeróbios que degradam os compostos orgânicos presentes no solo.

3.2 Contaminante

Quando disposto ao ambiente, a gasolina C comporta-se de maneira persistente, não sendo rapidamente degradada. Possui potencial de bioacumulação em organismos aquáticos, e é nociva aos seres humanos. Pode provocar, dentre outras coisas, leucemia e tumores malignos da cavidade oral, faringe, laringe, esôfago e fígado. Possui, em sua composição, substâncias tóxicas como o etanol e o benzeno, por exemplo, possivelmente causadoras de mutagenicidade em células de mamíferos e aberrações cromossômicas em humanos (PETROBRAS, 2014).

Para maior segurança durante a realização dos experimentos e análises, foram utilizadas as recomendações contidas na Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico - FISPQ N° BR0083 de 2014, que refere-se especificamente às características do contaminante que será utilizado.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de solo

O solo foi coletado no campus da UNESP de Rio Claro, a 15 centímetros de profundidade, conforme ABNT NBR 14283/1999, tendo sido posteriormente encaminhado ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) para análise. Após coleta e breve secagem, com a finalidade de homogeneizar o solo a ser utilizado no experimento, a sua granulometria foi ajustada para 1,68 milímetros.

Figura 03 – Homogeneização da granulometria do solo.



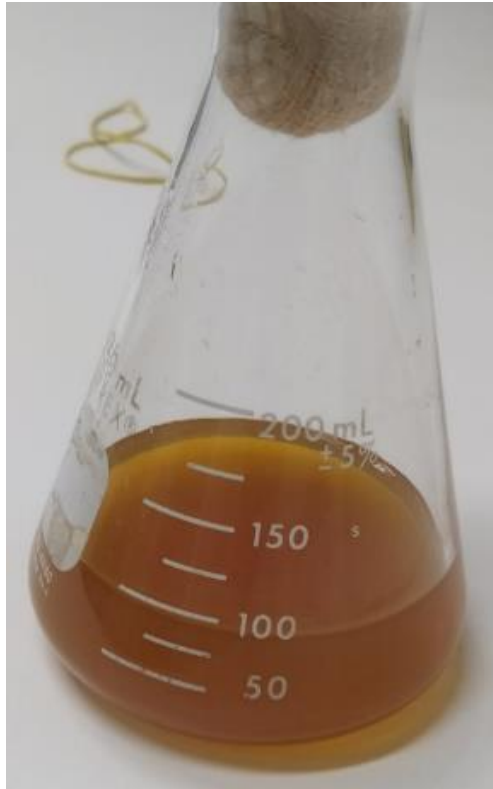
Fonte: Autor (Janeiro/2024).

4.2 Criação de cultura de manutenção e verificação da pureza da bactéria

Antes do início dos experimentos, foram multiplicadas as colônias da bactéria *Bacillus subtilis* ATCC6633, para que essas fossem estocadas com a finalidade de uso como culturas de manutenção, caso assim fosse necessário. O procedimento de repique foi realizado periodicamente, escolhendo multiplicar preferencialmente a “bactéria de melhor aparência”.

Para tanto, foi necessário produzir o meio de cultura através do uso de *Standard Method Ágar* (SMA), que forneceu alimento às bactérias que cresceram para ser utilizadas nos experimentos.

Figura 04 – Meio de cultivo permaneceu estéril após ter sido autoclavado e mantido 24 horas sob a temperatura de 35°C.



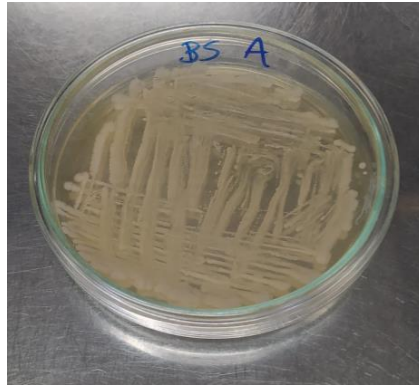
Fonte: Autor (Fevereiro/2024).

Foi misturado 102 mL de água destilada com 2,4 g de SMA em um Erlenmeyer. Após aquecer a mistura para homogeneizá-la, foi distribuído 2 mL em cada um dos seis tubos de ensaio, que em seguida foram autoclavados, posicionando-os inclinados para o meio solidificar de forma ideal para inoculação da bactéria.

Os meios de cultivo armazenados em tubos de ensaio, bem como o meio de cultivo armazenado no Erlenmeyer, permaneceram estéreis passadas 24 horas armazenados sob a temperatura de 35° C após sua autoclavagem.

Sem contaminação aparente, e com o apoio do fluxo laminar devidamente esterilizado com iluminação ultravioleta (UV), foi possível iniciar o procedimento de inoculação da bactéria *Bacillus subtilis*. Todas as placas de Petri foram autoclavadas antes de receber as bactérias. Após 24 horas de crescimento, a placa de Petri que apresentou as bactérias com melhor crescimento foi utilizada posteriormente para raspagem das bactérias nos tubos inclinados.

Figura 05 – Bactérias que tiveram o melhor crescimento após 24 horas.



Fonte: Autor (Fevereiro/2024).

Também foi preparado o *Nutrient Broth* (NB) e a água peptonada, usando 0,264 g de NB em 33 mL de água destilada e 0,02 g de peptona em 2 mL de água, esterilizando ambos. Após escolha da placa de Petri com melhor crescimento bacteriano, foram transferidas bactérias para tubos inclinados, incubados por mais 24 horas a 35 °C.

Figura 06 - Criação da cultura de manutenção e verificação da pureza.



Fonte: Autor (Fevereiro de 2024).

Após verificada a pureza através do crescimento das culturas sem contaminação, os microrganismos *Bacillus subtilis* foram armazenados para utilização em testes subsequentes.

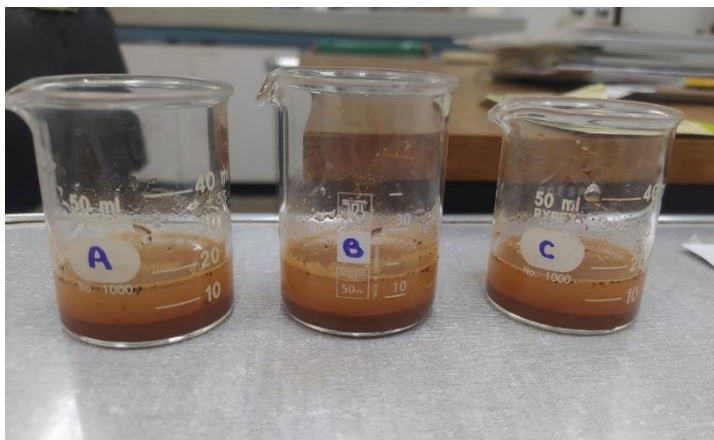
4.3 Testes de ecotoxicidade em sementes

Os testes com as sementes de rúcula foram realizados ao início e ao final do experimento com o objetivo de verificação da possibilidade de determinar se houve alteração do índice de germinação (IG) das sementes para cada solo, e para comparar os resultados do comportamento das sementes antes e após a aplicação do agente biodegradador e suas correspondentes frações de surfactante e água ultrapura de osmose reversa.

A montagem das placas de Petri com as sementes após o experimento foi realizada de modo padronizado, bem como as placas de Petri da montagem realizada antes dos tratamentos. Todas as placas de Petri foram autoclavadas e posteriormente identificadas, referentes a cada respirômetro (e suas respectivas triplicatas).

Nos procedimentos de montagem das sementes, antes e após o tratamento, as placas de Petri (previamente autoclavadas) contendo filtros em seu interior receberam o líquido decantado de cada amostra de solo contendo seus respectivos contaminante, surfactante, bactéria e água destilada deionizada, que haviam sido previamente misturados a cada amostra de solo, conforme Quadro 1. Com o auxílio de um béquer, as amostras de 5 gramas de solo (de cada respirômetro, antes e após o tratamento) foram misturadas a 10 mL de água destilada deionizada, dos quais 4 mL foram pipetados em cada placa de Petri para, então, receber as sementes.

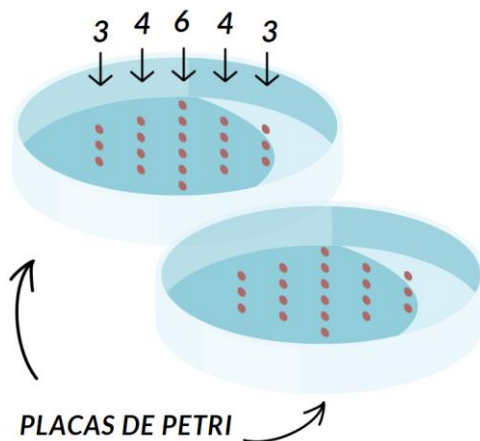
Figura 07 – Processo de decantação dos 5 gramas de solo retirados de cada respirômetro (triplicata), após ter sido misturado a 10 mL de água destilada deionizada, das quais 4 mL foram pipetados nas placas de Petri para realização dos testes de ecotoxicidade em sementes.



Fonte: Autor (Março de 2024).

As sementes foram removidas após 120 horas (5 dias) de incubação em B.O.D, ajustada a 21°C, período em que as placas de Petri contendo as sementes não tiveram acesso à luz. As sementes foram dispostas em cinco (05) fileiras paralelas, contendo 3, 4, 6, 4 e 3 sementes, respectivamente., conforme Figura 08 (abaixo):

Figura 08 - Distribuição das sementes, planejada para os testes de germinação.



Fonte: Elaborado pelo autor (Dezembro de 2023).

Com o intuito de verificar a validade do teste, foi realizado o controle positivo com 4 mL de óxido de zinco (ZnO) 0,05 mol/L, que é um metal tóxico e capaz de causar alterações na síntese de carboidratos, proteínas e comprometer a membrana celular (Fezarra et al., 2022).

Para o controle negativo, foram aplicados 4 mL da água destilada deionizada na placa de Petri com as sementes.

4.4 Método respirométrico

A avaliação da atividade microbiana foi realizada através do método respirométrico inicialmente proposto por Bartha e Pramer (1965), também conhecido como “respirômetro de Bartha”, descrita posteriormente pela CETESB através da norma 6.350 do ano de 1990, que foi revogada para unificação das instruções junto à ABNT NBR 14.283/1999.

Tomando como base o tratamento respirométrico, através da solução de 0,20 M de hidróxido de potássio (KOH), é possível correlacionar os valores mensurados da condutividade a uma estimativa de emissão do CO₂ pela atividade microbiana no sistema (Faria, M. A., 2018).

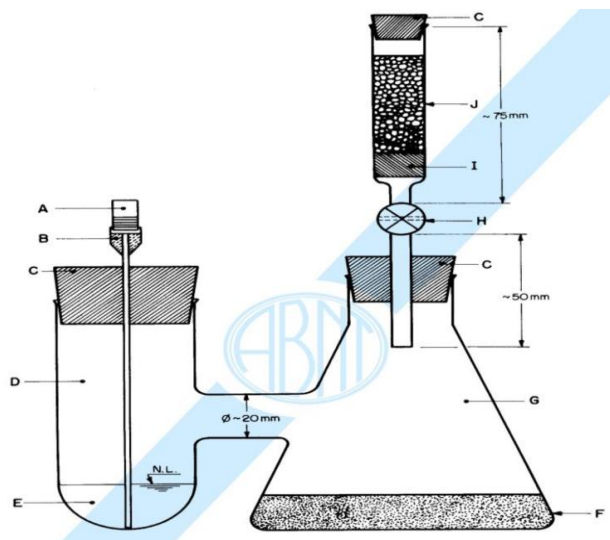
4.5 Os experimentos respirométricos

Para determinação do potencial da tratabilidade do contaminante em solo, foi avaliada a biodegradação através da respirabilidade da atividade microbiana em que através de medidas de condutividade é possível medir a saturação de CO_2 na solução de 0,20 M de hidróxido de potássio (KOH), que é proporcional à quantidade de CO_2 produzida pelos microrganismos do solo (LOPES, P. R. M., BIDOIA, E. D., 2009).

Para tanto, foi necessário proporcionar condições padronizadas de manejo para o sistema de tratamento, como condições ideais de umidade, o balanceamento dos nutrientes em solo, algumas práticas que promovam a mistura do resíduo ao solo de modo a permitir condições aeróbias necessárias à degradação, dentre outros (ABNT NBR 14283/1999).

O respirômetro utilizado, representado abaixo através da Figura 09, é um sistema fechado, composto por uma tampa (A) da cânula, que permite o isolamento da cânula e a reaeração do sistema (a ser realizada semanalmente); uma cânula (B) com diâmetro entre 1 e 2 mm, que conecta o sistema ao ambiente externo; rolhas de borracha (C) que vedam o sistema e possibilitam o acesso aos seus componentes internos; um braço lateral (D) de 40 mm de diâmetro e altura de 100 mm, que armazena a solução de KOH (E), responsável por absorver o CO_2 produzido pelo solo; um frasco de Erlenmeyer (G) acoplado ao sistema, que contém o solo (F) em estudo; uma válvula (H) que regula o fluxo de ar no sistema; um suporte com lã de vidro ou algodão e um filtro de ascarita (J) de 15 mm de diâmetro e altura de 40 mm, que impedem a entrada de CO_2 externo ao sistema.

Figura 09 - Representação, em corte, de um respirômetro padrão.



Fonte: Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 14283/1999.

O solo que foi coletado para os experimentos, após obtenção de consistência friável sem que houvesse a secagem completa.

Para o preparo da solução de 0,2 M de hidróxido de potássio (KOH), foram dissolvidos 11,2 g de KOH em 1000 mL de água deionizada ultrapura de osmose reversa e isenta de CO₂.

O projeto de pesquisa analisou oito (08) amostras, que foram realizadas em triplicata, para avaliação dos efeitos em diferentes condições ambientais, buscando analisar as interações entre contaminante, bactérias, água, surfactante e solo. Para a mistura, foram separados 5 gramas de solo (das 50 gramas totais para cada respirômetro), bem como as porções de gasolina, água, surfactante Tween® 80 (20%) e bactéria *Bacillus subtilis*.

Dentre as amostras, foi realizado um controle utilizando apenas água (Teste 1) e um tratamento utilizando apenas bactérias *Bacillus subtilis* (Teste 2) com o objetivo de estabelecer bases de comparação. Outra amostra, por sua vez, contém a presença de contaminante em combinação com água, sem a presença de bactérias e de surfactante (Teste 3).

Foram incluídas amostras contendo a bactéria *Bacillus subtilis* em conjunto com o contaminante, variando a presença e os teores de água e surfactante (Teste 4, Teste 5 e Teste 6). Além disso, a sétima e a oitava amostras repetem o padrão da quinta e da sexta amostra, mas com diferentes quantidades de água e bactérias, com o objetivo de explorar variações nos resultados em função das concentrações.

Quadro 01 - Concentrações que foram aplicadas nos testes realizados.

Teste	Solo	Gasolina	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	1,0 mL	1 mL	0,5 mL
6	50 g	4 mL	-	1 mL	0,5 mL
7	50 g	3 mL	2 mL	1 mL	1,0 mL
8	50 g	4 mL	-	1 mL	1,5 mL

Fonte: Autor (Março de 2024).

Figura 10 – Montagem experimentos (em triplicata) utilizando os respirômetros, a solução de KOH e o solo preparado conforme Quadro 1.



Fonte: Autor (Março de 2024).

Figura 11 – Os respirômetros ficaram armazenados em uma incubadora BOD, a 28°C, durante as treze semanas de realização dos experimentos.



Fonte: Autor (Março de 2024).

4.6 Índice de Germinação das sementes

O método para análise do desenvolvimento das raízes consistiu, inicialmente, em congelar as sementes após 120 horas de incubação. Deste modo, foi possível interromper o crescimento das raízes de modo uniforme e padronizado, o que também facilitou a medição devido à diminuição da rigidez dos tecidos vegetais, evitando possíveis quebras durante o procedimento.

Para cada semente, foram medidas a raiz e hipocótilo. Assim, foram determinados: a germinação das sementes, o alongamento da raiz e do hipocótilo ($\geq 0,1$ mm) e o índice de germinação (IG), que trata-se de um fator de germinação de sementes e alongamento da raiz relativo ao ensaio controle negativo (CN). A partir da contagem de sementes germinadas, foi calculada a porcentagem de germinação relativa ao CN (%G) (Lopes, P. R. M., 2014).

$$\%G = \left(\frac{SGa}{SGc} \right) * 100 \quad \text{em que,}$$

SGa = número total de sementes germinadas na amostra analisada;

SGc = número total de sementes germinadas no CN.

Os resultados foram expressados pelo tamanho médio da raiz e do hipocótilo, para cada ensaio, pelo desenvolvimento relativo da raiz em relação ao CN (%R) e pelo índice de germinação (GI).

$$\%R = \left(\frac{MRa}{MRc} \right) * 100 \quad \text{em que,}$$

MRa = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas na amostra analisada;

MRc = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no CN.

As medidas da raiz e do hipocótilo permitiram a observação da influência da exposição à substância testada no crescimento do tecido vegetal, após 120 h, pela medição do comprimento: O índice de germinação (GI), que combina as medidas de germinação de sementes relativa ao CN (%G) e alongamento da raiz relativo ao CN (%R), foi utilizado para avaliar a toxicidade das amostras de solo em rúcula (Lopes, P. R. M., 2014).

$$IG = \frac{(\%G) * (\%R)}{100}$$

4.7 Tratamento estatístico dos dados

Para análise dos dados referentes à condutividade e pH, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey para comparação entre as médias dos tratamentos, com nível de confiança de 95%. Para isto, foi utilizado o programa estatístico *OriginPro*, versão 2024b.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise estatística dos dados da condutividade elétrica da solução de hidróxido de potássio (KOH)

O método respirométrico com a análise da condutividade possui funcionamento simples e versátil, baixo custo de aplicação e ocupa pouco espaço, podendo ser aplicado a diferentes tipos de solo e de contaminantes.

Semanalmente, durante treze (13) semanas, com o auxílio de um condutivímetro, os ensaios respirométricos de biodegradação foram submetidos à análise da condutividade elétrica da solução de hidróxido de potássio (KOH) armazenada no interior dos respirômetros de Bartha.

Com as análises semanais das triplicatas dos ensaios respirométricos, foi possível obter a variação os dados. O quadro 02 (abaixo) apresenta as médias das triplicatas dos ensaios respirométricos.

Quadro 02 – Variação semanal da condutividade (mS/cm) da solução de KOH.

TEMPO	Respirômetro 1	Respirômetro 2	Respirômetro 3	Respirômetro 4	Respirômetro 5	Respirômetro 6	Respirômetro 7	Respirômetro 8
SEMANA 1	20,15	18,27	19,46	19,81	19,93	19,46	19,71	18,91
SEMANA 2	19,54	17,67	20,26	20,11	18,19	15,26	18,77	19,33
SEMANA 3	31,38	22,01	23,33	23	22,16	23,17	20,88	22,87
SEMANA 4	15,72	20,99	22,29	21,12	18,3	22,34	17,48	12,76
SEMANA 5	22,52	20,98	20,85	18,94	16,75	21,02	13,41	17,97
SEMANA 6	31,66	23,03	22,17	22,08	17,96	22,08	15,51	19,08
SEMANA 7	22,87	22,01	22,61	20,92	15,32	19,39	13,43	15,14
SEMANA 8	23,15	22,93	22,82	21,82	18,33	17,57	17,6	16,33
SEMANA 9	23,06	22,29	23,23	22,46	18,39	15,52	18,9	17,45
SEMANA 10	22,88	31,77	23,28	22,69	20,52	19,03	20,42	20,45
SEMANA 11	12,245	11,74	23,79	16,47	15,64	15,57	15,08	15,94
SEMANA 12	13,27	12,98	13,38	13,07	12,57	12,6	12,23	12,88
SEMANA 13	17,26	18,24	18,19	17,74	16,31	16,93	16,59	16,08

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Após a obtenção dos dados da variação da condutividade, foi elaborado o quadro 03 (abaixo), referente aos valores acumulados, obtidos a partir da soma sucessiva dos valores da variação semanal da condutividade do KOH.

Quadro 03 – Valores acumulados dos dados semanais de condutividade (mS/cm).

TEMPO	Respirômetro 1	Respirômetro 2	Respirômetro 3	Respirômetro 4	Respirômetro 5	Respirômetro 6	Respirômetro 7	Respirômetro 8
SEMANA 1	20,15	18,41	19,98	19,98	19,29	19,91	19,29	19,15
SEMANA 2	38,59	36,38	39,74	42,59	36,83	34,73	35,59	39,43
SEMANA 3	69,91	58,45	65,7	65,59	59	57,86	56,58	65,69
SEMANA 4	85,69	79,62	87,95	86,69	78,28	80,1	74	78,44
SEMANA 5	107,19	100,87	108,75	105,55	94,05	100,93	87,39	96,81
SEMANA 6	139,37	126,85	130,78	127,92	111,95	125,62	103,32	115,71
SEMANA 7	162,1	148,82	153,39	147,49	127,45	144,74	116,92	131,42
SEMANA 8	185,19	174,31	176,1	169,19	145,31	163,25	134,16	148,34
SEMANA 9	208,13	209,82	201,89	191,47	163,94	179,64	152,88	165,55
SEMANA 10	233,91	238,75	228,07	217,26	184,7	198,7	173,18	186,29
SEMANA 11	242,23	250,44	250,53	233,81	200,52	214,27	188,12	201,83
SEMANA 12	255,47	263,55	263,7	246,57	213,24	227,26	200,3	214,82
SEMANA 13	273,08	281,16	281,48	264,22	229,63	243,91	216,36	231,2

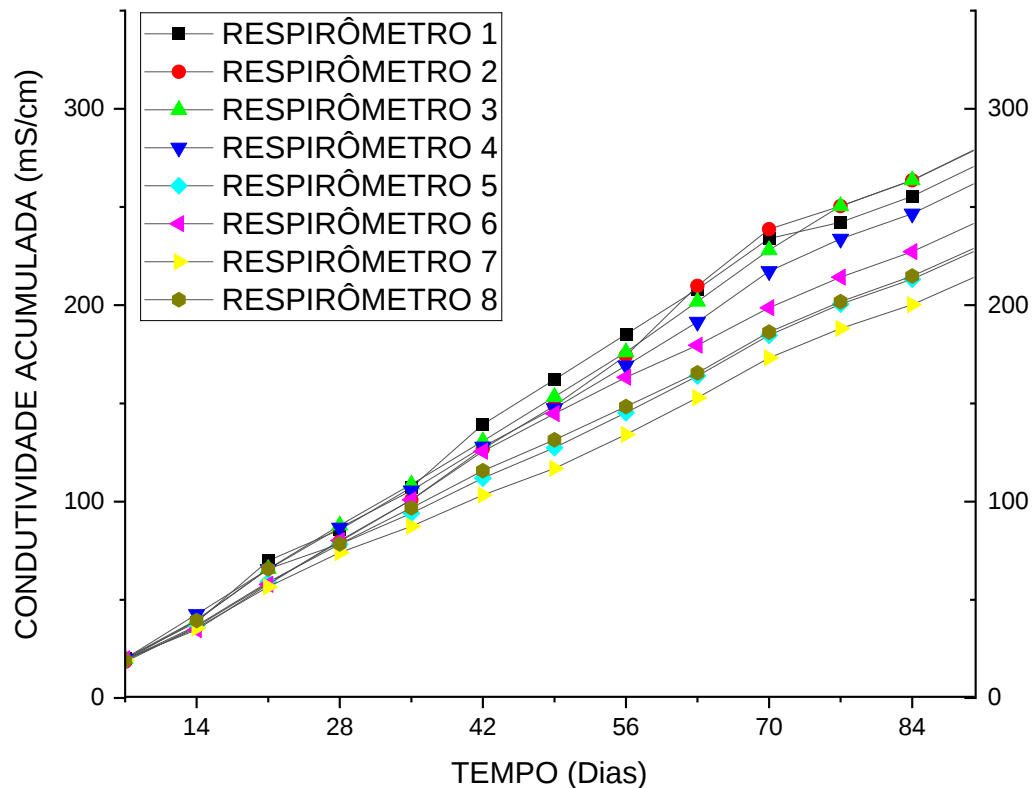
Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

A partir do Quadro 3 tornou-se possível visualizar, ao final das treze semanas, quais foram os respirômetros que apresentaram os maiores e os menores valores acumulados de condutividade (mS/cm).

Quanto menor o teor de CO₂ emitido através da respiração bacteriana, menos significativas tendem a ser as reações químicas com o KOH. Com isso, menos íons de hidróxido são consumidos pela reação, o que mantém elevada a condutividade elétrica. Por isso, espera-se que em casos em que foram observados menores valores de condutividade elétrica acumulada na solução de KOH, pode-se considerar que houve maior emissão de CO₂ através da respiração bacteriana. Isto pode-se explicar devido ao fato de que a reação $2\text{KOH} + \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{K}_2\text{CO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ diminui a concentração de íons de hidróxido na solução, tornando menor a sua condutividade elétrica (Faria, M. A. et al., 2018)

Entre a primeira e a segunda semana de análises, a condutividade acumulada em todos os respirômetros manteve níveis semelhantes. A partir da terceira semana de análises, pôde-se perceber indícios de diferentes tendências para a condutividade do KOH (Figura 12). Este comportamento pode indicar que as duas primeiras semanas decorreram como um “período de adaptação”. A partir deste período, o comportamento dos respirômetros começou a diferenciar-se.

Figura 12 – Gráfico da condutividade acumulada (mS/cm) ao decorrer dos dias.



Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Conforme demonstrado através do gráfico da condutividade acumulada (Figura 12), os ensaios que apresentaram os menores teores acumulados de condutividade elétrica foram os de número 7, 5, 8 e 6.

A amostra que apresentou menor teor de condutividade elétrica acumulada corresponde ao Respiômetro nº 07, cujo solo contaminado com 3 mL de gasolina recebeu adicionalmente 2 mL de água, 1 mL de surfactante e bioaugmentação com 1 mL de *Bacillus subtilis*.

A amostra que apresentou o segundo menor teor de condutividade elétrica acumulada corresponde ao Respiômetro nº 05, cujo solo contaminado com 3 mL de gasolina recebeu adicionalmente 1 mL de água, 1 mL de surfactante e bioaugmentação com 0,5 mL de *Bacillus subtilis*.

A amostra que apresentou o terceiro menor teor de condutividade elétrica acumulada corresponde ao Respiômetro nº 08, cujo solo contaminado com 4 mL de gasolina recebeu adicionalmente 1 mL de surfactante e bioaugmentação com 1 mL de *Bacillus subtilis*, sem adição de água.

A amostra que apresentou o quarto menor teor de condutividade elétrica acumulada corresponde ao Respirômetro nº 06, cujo solo contaminado com 4 mL de gasolina recebeu adicionalmente 1 mL de surfactante e bioaugmentação com 0,5 mL de *Bacillus subtilis*, sem adição de água.

Os respirômetros que apresentaram os menores valores de condutividade acumulada (e, possivelmente, maior taxa de respiração) foram aqueles que receberam a adição de surfactante e *Bacillus subtilis*. Isso sugere que o surfactante possa ter contribuído para aumentar a atividade respiratória dos microrganismos, devido à sua capacidade de quebra da tensão superficial do contaminante, favorecendo que as bactérias consumam as substâncias presentes na gasolina.

Com a possibilidade das bactérias se alimentarem do contaminante, há um crescimento populacional das bactérias, resultando em maior emissão de CO₂ e, conseqüentemente, menores valores de condutividade elétrica do KOH. Por outro lado, os respirômetros que receberam bioaugmentação (como os respirômetros 2 e 4), mas sem a adição de surfactante, não apresentaram o mesmo comportamento observado nos respirômetros que receberam tanto microrganismos quanto surfactante. Esse resultado pode indicar que a presença do surfactante é um fator-chave para a melhora da respirabilidade dos microrganismos.

Conforme demonstrado através do gráfico da condutividade acumulada (Figura 12), os ensaios que apresentaram os maiores teores acumulados de condutividade elétrica foram os de número 3, 2, 1 e 4.

A amostra que apresentou o maior teor acumulado de condutividade elétrica, considerando-se a média das triplicatas analisadas, é a correspondente ao respirômetro nº 03, em que o solo recebeu adição de 3 mL de gasolina e 2,5 mL de água, sem adição de *Bacillus subtilis* e nem de surfactante.

A amostra que apresentou o segundo maior teor acumulado de condutividade elétrica, considerando-se a média das triplicatas analisadas, é a que corresponde ao respirômetro nº 02. O solo recebeu, ao início do experimento, 5,5 mL de *Bacillus subtilis*, sem adição de água, nem de surfactante, nem de contaminante. Apesar do maior teor de bactérias adicionadas (em comparação aos demais respirômetros), este não obteve níveis significantes de respiração, o que pode ser explicado pela possibilidade de que, apesar da adição de grande quantidade de bactérias, a ausência de surfactante, de contaminante e de água fez com que não houvesse condições propícias (alimentação suficiente) para que fosse mantido um bom teor respirométrico ao longo do tempo.

A amostra que apresentou o terceiro maior teor acumulado de condutividade elétrica, considerando-se a média das triplicatas analisadas, é a que corresponde ao respirômetro nº 01, em que o solo recebeu a adição de 5,5 mL de água, sem adição de contaminante, nem de *Bacillus subtilis* e nem de surfactante.

A amostra que apresentou o quarto maior teor acumulado de condutividade elétrica, considerando-se a média das triplicatas analisadas, é a que corresponde ao tratamento nº 04. O solo recebeu, ao início do experimento, 1,0 mL de *Bacillus subtilis*, com adição de 1,5 mL de água, com adição de 3,0 mL de contaminante, e sem a adição de surfactante. Apesar da ausência de surfactante, este foi o respirômetro que apresentou resultado mais próximo aos que tiveram melhor desempenho (menores taxas de condutividade elétrica média e acumulada), o que pode indicar que possivelmente as bactérias conseguiram utilizar a gasolina (contaminante) como fonte de alimentação, mesmo com a ausência de surfactante, porém este consumo não foi tão grande quanto nos respirômetros onde houve a adição de surfactante. A ausência de surfactante aparentemente fez com que a taxa de condutividade não fosse tão significativamente baixa quanto as dos respirômetros onde houve a adição do surfactante, mais uma vez indicando que a sua presença é relevante para a obtenção dos resultados mais significativos.

Após a coleta dos dados, foi também realizada a interpretação com base na análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey com 95% de nível de confiança ($p < 0,05$) com o intuito de realizar a comparação entre as médias dos tratamentos. Para tanto, o software estatístico utilizado foi o *OriginPro 2024b (Learning Edition)*.

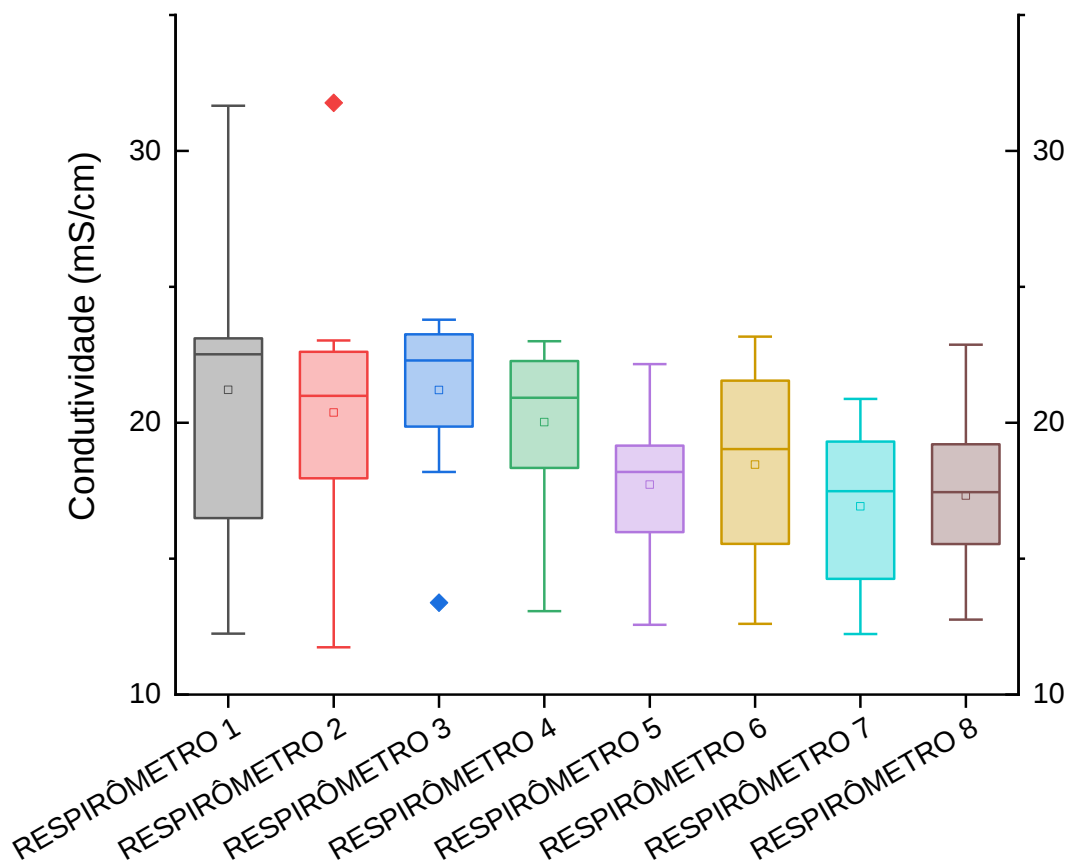
Quadro 04 - Estatísticas Descritivas de Condutividade

Respirômetro	Nº de Análises	Nº de Dados Ausentes	Média (Mean)	Desvio Padrão (Standard Deviation)	Erro Padrão da Média (SE of Mean)
Respirômetro 1	13	0	21,20808	5,91712	1,64111
Respirômetro 2	13	0	20,37769	4,98946	1,38383
Respirômetro 3	13	0	21,20462	2,89655	0,80336
Respirômetro 4	13	0	20,01769	2,86921	0,79578
Respirômetro 5	13	0	17,72077	2,47338	0,68599
Respirômetro 6	13	0	18,45692	3,21189	0,89008
Respirômetro 7	13	0	16,92385	2,82568	0,78377
Respirômetro 8	13	0	17,32231	2,89232	0,80219

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

O respirômetro 1, por exemplo, que não recebeu tratamento, apresentou a maior condutividade média (21,20808 mS/cm) em comparação com os demais, além de um desvio padrão relativamente alto (5,91712), o que sugere que os valores aferidos neste respirômetro variam consideravelmente em torno de sua média. Isso possivelmente ocorreu devido à variação da atividade bacteriana dos microrganismos existentes no solo coletado.

Figura 13 – Gráfico *Box Plot* dos dados de condutividade.



Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Os respirômetros nº 2, 3 e 4, apresentaram comportamento semelhante ao do respirômetro nº 1 em suas médias de condutividade (20,37769 mS/cm; 21,20462 mS/cm; e 20,01769 mS/cm, respectivamente). O desvio padrão dos dados do Respirômetro 2 (4,98946) é próximo ao do respirômetro 1, diferente dos demais respirômetros, como o 3 e o 4 (onde há presença de contaminante), que apresentaram valores de desvio padrão mais moderados (2,89655 e 2,86921, respectivamente). Os respirômetros 1 e 2 não receberam adição de contaminante, nem de surfactante.

O respirômetro 1 recebeu apenas 5,5 mL de água, enquanto o respirômetro 2 recebeu 5,5 mL de bioaugmentação com microrganismos.

O respirômetro 7 apresentou a menor média de condutividade (16,92385 mS/cm), com um desvio padrão moderado (2,82568), indicando uma menor variabilidade em comparação ao respirômetro 1. Os respirômetros 8, que apresentou uma condutividade média de, respectivamente, 17,32231 mS/cm com um desvio padrão de 2,89232, teve o comportamento mais próximo ao dos respirômetros nº 5, 6 e 7 (de condutividade média 17,72077; 18,45692; e 16,92385, e desvio padrão 2,47338; 3,21189; e 3,82568, respectivamente), diferenciando-se do comportamento dos respirômetros nº 1, 2, 3 e 4.

Quadro 05 - Resultados da Análise de Variância (ANOVA) global para comparação dos respirômetros.

	DF	Soma dos Quadrados (Sum of Squares)	Quadrado Médio (Mean Square)	Valor F (F Value)	Valor-P (Prob>F)
Modelo (Model)	7	279,9731	39,99616	2,92709	0,00805
Erro (Error)	96	1311,75807	13,66415		
Total	103	1591,73117			

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

O valor de p é 0,00805, ou seja, menor que o nível de significância de 0,05. Isso indica a possibilidade de que exista diferença significativa entre as médias dos grupos, pois o *p-value* é menor que 0,05.

Quadro 06 – Comparativo dos pares, através do Teste de Tukey, para análise dos dados de condutividade.

Comparação	Diferença Média (Mean Diff)	Erro Padrão (SEM)	Valor q (q Value)	Valor P (Prob)	Alfa (Alpha)	Significância (Sig)	Limite Inferior (LCL)	Limite Superior (UCL)
Respirômetro 2 x 1	-0,83038	1,44989	0,80995	0,99912	0,05	0	-5,32339	3,66262
Respirômetro 3 x 1	-0,00346	1,44989	0,00338	1	0,05	0	-4,49646	4,48954
Respirômetro 2 x 3	0,82692	1,44989	0,80658	0,99914	0,05	0	-3,66608	5,31993
Respirômetro 4 x 1	-1,19038	1,44989	1,16109	0,99152	0,05	0	-5,68339	3,30262
Respirômetro 4 x 2	-0,36	1,44989	0,35114	1	0,05	0	-4,853	4,133
Respirômetro 4 x 3	-1,18692	1,44989	1,15772	0,99167	0,05	0	-5,67993	3,30608
Respirômetro 5 x 1	-3,48731	1,44989	3,4015	0,25084	0,05	0	-7,98031	1,0057
Respirômetro 5 x 2	-2,65692	1,44989	2,59155	0,59984	0,05	0	-7,14993	1,83608
Respirômetro 5 x 3	-3,48385	1,44989	3,39813	0,25198	0,05	0	-7,97685	1,00916
Respirômetro 5 x 4	-2,29692	1,44989	2,24041	0,75849	0,05	0	-6,78993	2,19608
Respirômetro 6 x 1	-2,75115	1,44989	2,68346	0,55603	0,05	0	-7,24416	1,74185
Respirômetro 6 x 2	-1,92077	1,44989	1,87351	0,88721	0,05	0	-6,41377	2,57223
Respirômetro 6 x 3	-2,74769	1,44989	2,68008	0,55764	0,05	0	-7,2407	1,74531
Respirômetro 6 x 4	-1,56077	1,44989	1,52237	0,96021	0,05	0	-6,05377	2,93223
Respirômetro 6 x 5	0,73615	1,44989	0,71804	0,9996	0,05	0	-3,75685	5,22916
Respirômetro 7 x 1	-4,28423	1,44989	4,17882	0,07304	0,05	0	-8,77723	0,20877
Respirômetro 7 x 2	-3,45385	1,44989	3,36886	0,26206	0,05	0	-7,94685	1,03916
Respirômetro 7 x 3	-4,28077	1,44989	4,17544	0,07349	0,05	0	-8,77377	0,21223
Respirômetro 7 x 4	-3,09385	1,44989	3,01772	0,40121	0,05	0	-7,58685	1,39916
Respirômetro 7 x 5	-0,79692	1,44989	0,77731	0,99932	0,05	0	-5,28993	3,69608
Respirômetro 7 x 6	-1,53308	1,44989	1,49536	0,96386	0,05	0	-6,02608	2,95993
Respirômetro 8 x 1	-3,88577	1,44989	3,79016	0,14151	0,05	0	-8,37877	0,60723
Respirômetro 8 x 2	-3,05538	1,44989	2,98021	0,41781	0,05	0	-7,54839	1,43762
Respirômetro 8 x 3	-3,88231	1,44989	3,78678	0,14227	0,05	0	-8,37531	0,6107
Respirômetro 8 x 4	-2,69538	1,44989	2,62906	0,58198	0,05	0	-7,18839	1,79762
Respirômetro 8 x 5	-0,39846	1,44989	0,38866	0,99999	0,05	0	-4,89146	4,09454
Respirômetro 8 x 6	-1,13462	1,44989	1,1067	0,99366	0,05	0	-5,62762	3,35839
Respirômetro 8 x 7	0,39846	1,44989	0,38866	0,99999	0,05	0	-4,09454	4,89146

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Ao analisar a coluna “Valor de P (Prob)” do Quadro 06, é perceptível que a maioria das comparações não apresenta diferenças estatisticamente significativas, pois boa parte dos valores de p são maiores que 0,05. A comparação mais significativa, neste caso, se dá entre respirômetros 7 e 3, bem como entre respirômetros 7 e 1, onde foram respectivamente obtidos os valores de $p = 0,07349$ e $p = 0,07304$, que apesar de não serem menor que o nível de significância de 0,05, são significativamente menores que os valores obtidos pelas comparações entre os demais respirômetros.

A tendência também é demonstrada através do Quadro 07 (abaixo), pois mesmo com o ANOVA indicando a existência de diferença entre grupos, o teste de Tukey não detectou diferenças estatisticamente significativas. Deste modo, o teste de Tukey agrupou todas as médias no mesmo grupo, pois as comparações entre as médias individuais não foram suficientemente significativas para serem consideradas estatisticamente diferentes.

Quadro 07 – Agrupamento realizado através do teste de Tukey.

	Média	Groups
RESPIRÔMETRO 1	21,20808	A
RESPIRÔMETRO 3	21,20462	A
RESPIRÔMETRO 2	20,37769	A
RESPIRÔMETRO 4	20,01769	A
RESPIRÔMETRO 6	18,45692	A
RESPIRÔMETRO 5	17,72077	A
RESPIRÔMETRO 8	17,32231	A
RESPIRÔMETRO 7	16,92385	A

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Apesar do demonstrado através dos quadros anteriores, de que não há diferença estatisticamente significativa dos valores da condutividade, através Figura 13 e do Quando 07 pode-se observar que o valor das médias e medianas dos respirômetros nº 5, 6, 7 e 8 estão abaixo de 20 mS/cm. Por outro lado, nos respirômetros (nº 1, 2, 3 e 4) onde não houve adição de surfactante, todas as médias e medianas apresentaram valores acima de 20 mS/cm, indicando possivelmente um menor teor respirométrico.

Esta tendência indica que o resultado possivelmente está de acordo também com González et al. (2011), por exemplo, que concluíram que os surfactantes causam efeito na dinâmica das comunidades microbianas, uma vez que todos os respirômetros que receberam adição de surfactante apresentaram teores menores de condutividade média, quando comparados aos respirômetros que não receberam a adição de surfactante.

Em geral, portanto, os tratamentos nº 5, 6, 7 e 8 que receberam a bioaugmentação com *Bacillus Subtilis*, juntamente à adição de surfactante (e com a presença de contaminante no solo) foram os que apresentaram menores teores médios e acumulados de condutividade elétrica, o que pode indicar maior teor respirométrico, e a possível melhor adaptação das bactérias ao ambiente, com possibilidade da conversão da gasolina em fonte de alimentação. Aparentemente os respirômetros 7 e 5 que tiveram teor de água adicionado apresentaram interferência levemente significativa, com menores teores acumulados de condutividade.

Conforme explicado anteriormente, uma das possíveis causas para a condutividade observada é a interferência do CO₂ (emitido pelas bactérias) no hidróxido de potássio (KOH) do sistema fechado, bem como a presença de surfactante, que pode interferir na dinâmica populacional apresentada,

possivelmente potencializando a degradação dos hidrocarbonetos. Tal comportamento, diante da presença de surfactante, é compatível com o descrito anteriormente por González et al. (2011) (apud de Lopes, Paulo R. M., 2014, p. 152) e Mnif et al. (2011) (apud de Colla, Tatiana S., 2012, p. 71).

5.2 Análise estatística dos dados de pH obtidos da solução de KOH

Após as coletas dos dados de pH da solução de hidróxido de potássio (KOH) durante 13 semanas, as médias das triplicatas de cada teste foram agrupadas no Quadro 08 (abaixo) da variação do pH ao longo do tempo, previamente à realização da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Quadro 08 – Variação do pH da solução de KOH.

TEMPO	Respirômetro 1	Respirômetro 2	Respirômetro 3	Respirômetro 4	Respirômetro 5	Respirômetro 6	Respirômetro 7	Respirômetro 8
SEMANA 1	12,63	12,56	12,67	12,64	12,62	12,65	12,59	12,66
SEMANA 2	12,5	12,63	12,71	12,71	12,62	12,64	12,57	12,68
SEMANA 3	12,56	12,56	12,61	12,54	12,56	12,54	12,53	12,6
SEMANA 4	12,45	12,67	12,68	12,69	12,58	12,69	12,59	12,75
SEMANA 5	12,76	12,8	12,66	12,66	12,5	12,7	12,35	12,63
SEMANA 6	12,64	12,61	12,58	12,56	12,33	12,54	12,2	12,4
SEMANA 7	12,58	12,62	12,61	12,5	12,36	12,51	12,22	12,34
SEMANA 8	12,71	12,72	12,71	12,69	12,55	12,53	12,42	12,44
SEMANA 9	12,63	12,64	12,66	12,63	12,52	12,34	12,45	12,35
SEMANA 10	12,62	12,62	12,63	12,61	12,55	12,47	12,56	12,55
SEMANA 11	11,7	12,51	12,65	12,66	12,62	12,57	12,57	12,58
SEMANA 12	12,49	12,48	12,5	12,46	12,47	12,46	12,43	12,45
SEMANA 13	12,64	12,65	12,67	12,66	12,63	12,64	12,67	12,7

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Ao utilizar apenas o quadro da variação semanal dos valores médios obtidos, não é possível obter conclusões significativas, sendo aplicável a realização da ANOVA e do teste de Tukey para verificação da possível diferença entre os valores de pH aferidos.

Quadro 09 – Dados de “Média”, “Desvio Padrão” e “Erro Padrão” obtidos do pH da solução de KOH.

Respirômetro	Nº de Análises	Nº de Dados Ausentes	Média (Mean)	Desvio Padrão (Standard Deviation)	Erro Padrão da Média (SE of Mean)
Respirômetro 1	13	0	12,53154	0,26438	0,07333
Respirômetro 2	13	0	12,62077	0,08431	0,02338
Respirômetro 3	13	0	12,64154	0,05713	0,01585
Respirômetro 4	13	0	12,61615	0,07805	0,02165
Respirômetro 5	13	0	12,53154	0,0966	0,02679
Respirômetro 6	13	0	12,56	0,10336	0,02867
Respirômetro 7	13	0	12,47308	0,14568	0,0404
Respirômetro 8	13	0	12,54846	0,13843	0,03839

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

A maior parte dos dados de pH dos respirômetros registraram desvio padrão relativamente baixo, com valores abaixo de 0,1. São eles: os respirômetros de nº 03, de nº 04, de nº 02 e de nº 05. Os respirômetros de nº 06, de nº 08 e de nº 07 apresentaram desvio padrão acima de 0,1 e abaixo de 0,15. O respirômetro de nº 01 foi o que registrou maior desvio padrão (0,26438), que representa quase o dobro do segundo maior desvio padrão registrado.

Os valores registrados para o erro padrão possuem o mesmo comportamento do desvio padrão anteriormente calculados para a condutividade, indicando baixa índice de incerteza com relação aos valores de pH aferidos.

O desvio padrão registrado no respirômetro nº 01, “alto” quando comparado aos demais, pode ser explicado devido ao fato do solo deste respirômetro não ter recebido qualquer tratamento ou contaminante, apenas água, o que o difere dos demais o seu padrão de comportamento, conforme explicado anteriormente.

Quadro 10 – Aplicação de ANOVA nos dados do pH da solução de KOH dos respirômetros.

	DF	Soma dos Quadrados (Sum of Squares)	Quadrado Médio (Mean Square)	Valor F (F Value)	Valor P (Prob>F)
Modelo (Model)	7	0,29343	0,04192	2,28498	0,03386
Erro (Error)	96	1,76115	0,01835		
Total	103	2,05458			

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

A aplicação da análise de variância (ANOVA), indicou Valor P (0,03386) menor que o nível de significância (0,05), indicando a existência de diferença entre os valores médios de pH em ao menos um dos respirômetros, que possivelmente se difere dos demais.

Quadro 11 - Comparação entre médias dos dados de pH, referente ao teste de Tukey.

Comparação	Diferença Média (Mean Diff)	Erro Padrão (SEM)	Valor q (q Value)	Valor P (Prob)	Alfa (Alpha)	Significância (Sig)	Limite Inferior (LCL)	Limite Superior (UCL)
Respirômetro 2 x 1	0,08923	0,05313	2,37533	0,70022	0,05	0	-0,0754	0,25386
Respirômetro 3 x 1	0,11	0,05313	2,9282	0,44124	0,05	0	-0,05463	0,27463
Respirômetro 2 x 3	0,02077	0,05313	0,55288	0,99993	0,05	0	-0,14386	0,1854
Respirômetro 4 x 1	0,08462	0,05313	2,25246	0,75347	0,05	0	-0,08001	0,24925
Respirômetro 4 x 2	-0,00462	0,05313	0,12286	1	0,05	0	-0,16925	0,16001
Respirômetro 4 x 3	-0,02538	0,05313	0,67574	0,99973	0,05	0	-0,19001	0,13925
Respirômetro 5 x 1	0	0,05313	0	1	0,05	0	-0,16463	0,16463
Respirômetro 5 x 2	-0,08923	0,05313	2,37533	0,70022	0,05	0	-0,25386	0,0754
Respirômetro 5 x 3	-0,11	0,05313	2,9282	0,44124	0,05	0	-0,27463	0,05463
Respirômetro 5 x 4	-0,08462	0,05313	2,25246	0,75347	0,05	0	-0,24925	0,08001
Respirômetro 6 x 1	0,02846	0,05313	0,75765	0,99943	0,05	0	-0,13617	0,19309
Respirômetro 6 x 2	-0,06077	0,05313	1,61768	0,9452	0,05	0	-0,2254	0,10386
Respirômetro 6 x 3	-0,08154	0,05313	2,17056	0,78669	0,05	0	-0,24617	0,08309
Respirômetro 6 x 4	-0,05615	0,05313	1,49482	0,96393	0,05	0	-0,22078	0,10848
Respirômetro 6 x 5	0,02846	0,05313	0,75765	0,99943	0,05	0	-0,13617	0,19309
Respirômetro 7 x 1	-0,05846	0,05313	1,55625	0,95525	0,05	0	-0,22309	0,10617
Respirômetro 7 x 2	-0,14769	0,05313	3,93157	0,11235	0,05	0	-0,31232	0,01694
Respirômetro 7 x 3	-0,16846	0,05313	4,48445	0,04102	0,05	1	-0,33309	-0,00383
Respirômetro 7 x 4	-0,14308	0,05313	3,80871	0,13738	0,05	0	-0,30771	0,02155
Respirômetro 7 x 5	-0,05846	0,05313	1,55625	0,95525	0,05	0	-0,22309	0,10617
Respirômetro 7 x 6	-0,08692	0,05313	2,3139	0,7273	0,05	0	-0,25155	0,07771
Respirômetro 8 x 1	0,01692	0,05313	0,45049	0,99998	0,05	0	-0,14771	0,18155
Respirômetro 8 x 2	-0,07231	0,05313	1,92483	0,87232	0,05	0	-0,23694	0,09232
Respirômetro 8 x 3	-0,09308	0,05313	2,47771	0,65344	0,05	0	-0,25771	0,07155
Respirômetro 8 x 4	-0,06769	0,05313	1,80197	0,90614	0,05	0	-0,23232	0,09694
Respirômetro 8 x 5	0,01692	0,05313	0,45049	0,99998	0,05	0	-0,14771	0,18155
Respirômetro 8 x 6	-0,01154	0,05313	0,30715	1	0,05	0	-0,17617	0,15309
Respirômetro 8 x 7	0,07538	0,05313	2,00674	0,84633	0,05	0	-0,08925	0,24001

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Conforme Quadro 11, existe diferença estatisticamente significativa na comparação entre os respirômetros nº 7 e nº 3. Através do teste de Tukey, foi possível agrupá-los em diferentes grupos, conforme exibido através do Quadro 12.

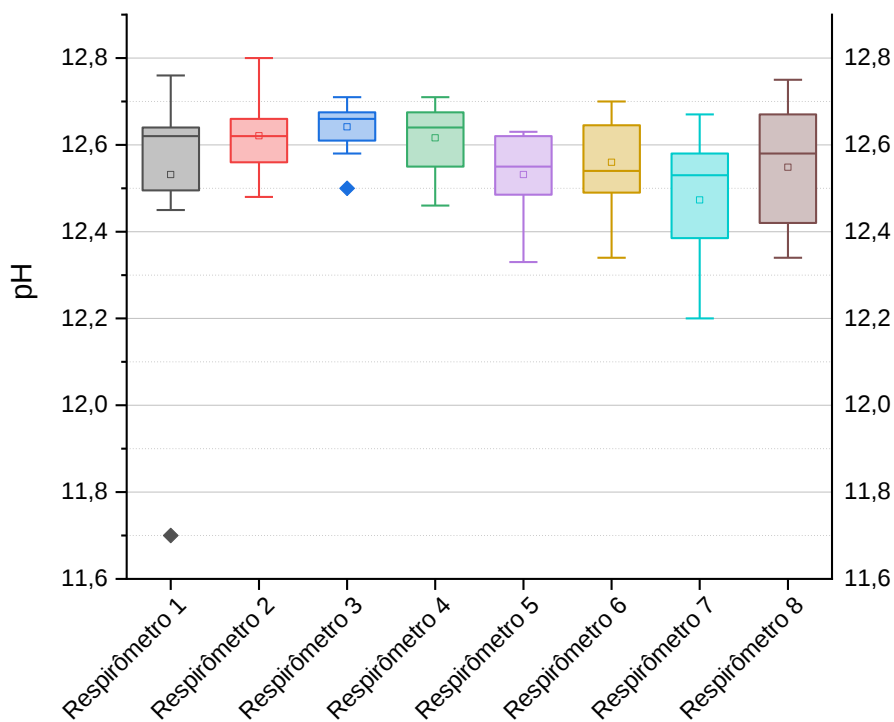
Quadro 12 – Agrupamento realizado com os dados de pH através do teste de Tukey.

	Média	Groups
Respirômetro 3	12,64154	A
Respirômetro 2	12,62077	A B
Respirômetro 4	12,61615	A B
Respirômetro 6	12,56	A B
Respirômetro 8	12,54846	A B
Respirômetro 5	12,53154	A B
Respirômetro 1	12,53154	A B
Respirômetro 7	12,47308	B

Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

Dentre os testes com maior probabilidade de sucesso na conversão de contaminante em energia por parte das bactérias *Bacillus subtilis* (e, consequentemente, a maior respirometria dos microrganismos, possivelmente permitindo também a aceleração do processo de descontaminação do ambiente), considerando dados como condutividade e pH nos testes de ecotoxicidade, destacam-se os tratamentos (nº 5, 6, 7 e 8) que combinam surfactante e bactéria.

Figura 14 – Gráfico *Box Plot* do pH.



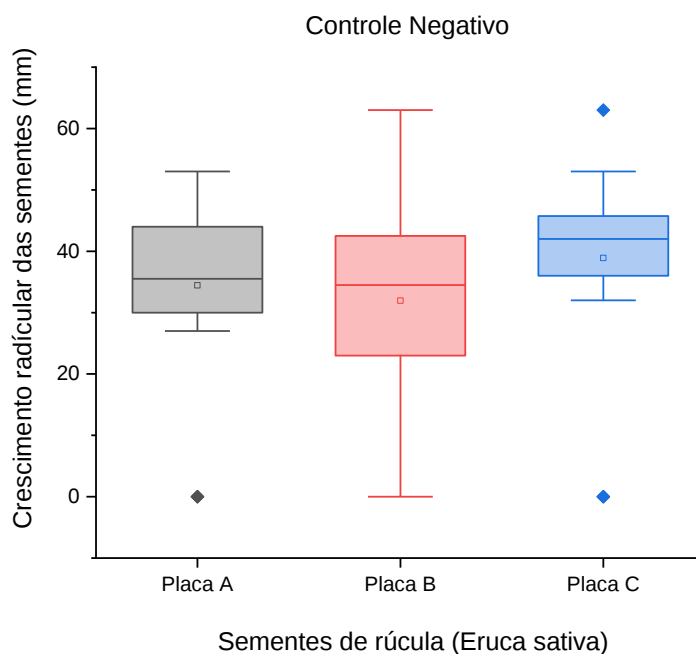
Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

5.3 Análise estatística dos dados de crescimento das raízes em testes de toxicidade em sementes

As espécies vegetais utilizadas para a avaliação ecotoxicológica do contaminante podem ser adquiridas em grandes quantidades, a um baixo custo, e possuem potencial crescimento radicular em curto período de tempo (120 horas), permitindo a comparação dos índices de germinação e crescimento radicular a serem obtidos em diferentes condições ambientais (Peduto; Jesus; Kohatsu, 2019; Guevara et. al, 2019; Lapa, 2014).

Os gráficos *Box Plot* para comparações entre as sementes foram realizados através do software *OriginPro 2024b (Learning Edition)*, com os dados de crescimento das raízes das sementes de rúcula (*Eruca sativa*) submetidas aos testes de toxicidade em diferentes teores de gasolina, água, surfactante e microrganismos, ao início e após os experimentos de biodegradação.

Figura 15 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes do controle negativo de *Eruca sativa*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

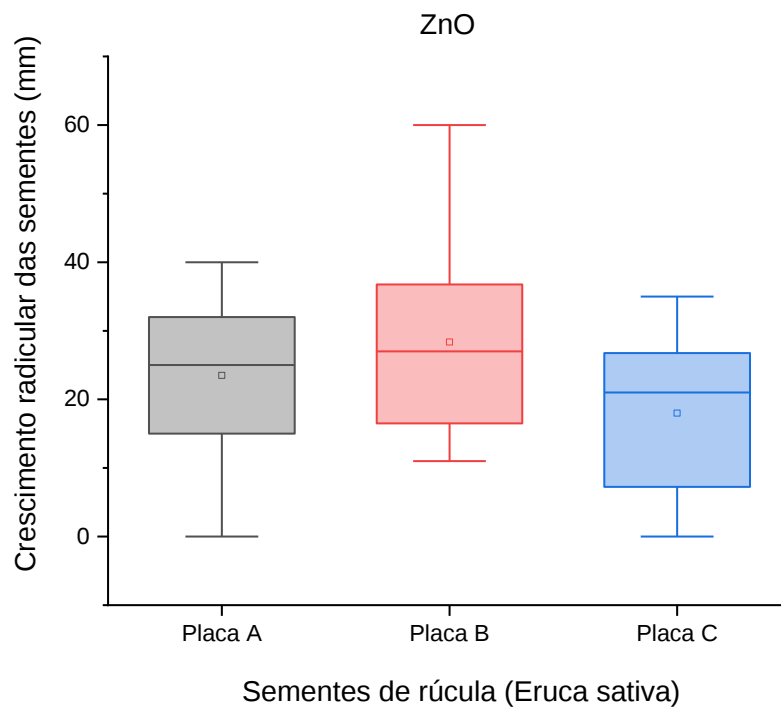
A média geral do crescimento das sementes das amostras do controle negativo (rúcula) foi 39 mm, servindo como referência para fins de comparação posterior às médias das demais placas. Não foi identificada diferença estatisticamente significativa na germinação das sementes de rúcula entre as

placas A, B e C ao nível de significância de 5%, o que já era esperado, considerando que as placas do controle negativo receberam o mesmo “tratamento” apenas com água destilada.

O gráfico *box-plot* (Figura 15) ilustra que não há diferença significativa entre as médias e medianas das placas A, B e C. Dentre as análises, a Placa B foi a que apresentou uma maior dispersão de dados.

O crescimento médio das raízes das sementes de rúcula do controle positivo contendo óxido de zinco (ZnO) foi de 24,51 milímetros, abaixo do controle negativo.

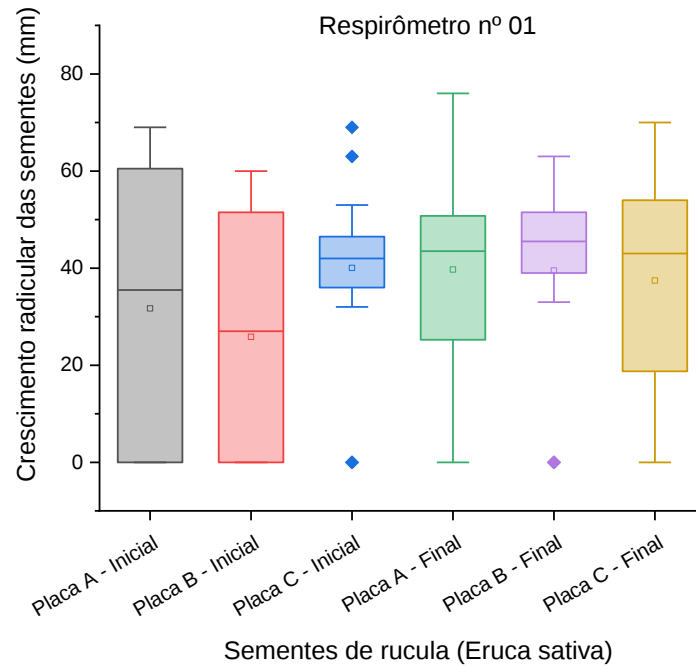
Figura 16 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes do controle positivo (ZnO) de *Eruca sativa*.



Fonte: Elaborado pelo Autor (Setembro de 2024).

As sementes referentes ao respirômetro nº 01 receberam à adição somente de 2,5 mL de água. Foram observados comportamentos semelhantes entre as médias, medianas e amplitudes das triplicatas testadas, tanto ao início, quanto ao fim dos experimentos (Figura 20). Não foi possível agrupá-los em diferentes grupos através do teste de Tukey (Quadro 13).

Figura 17 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 1 (testes iniciais e finais).



Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

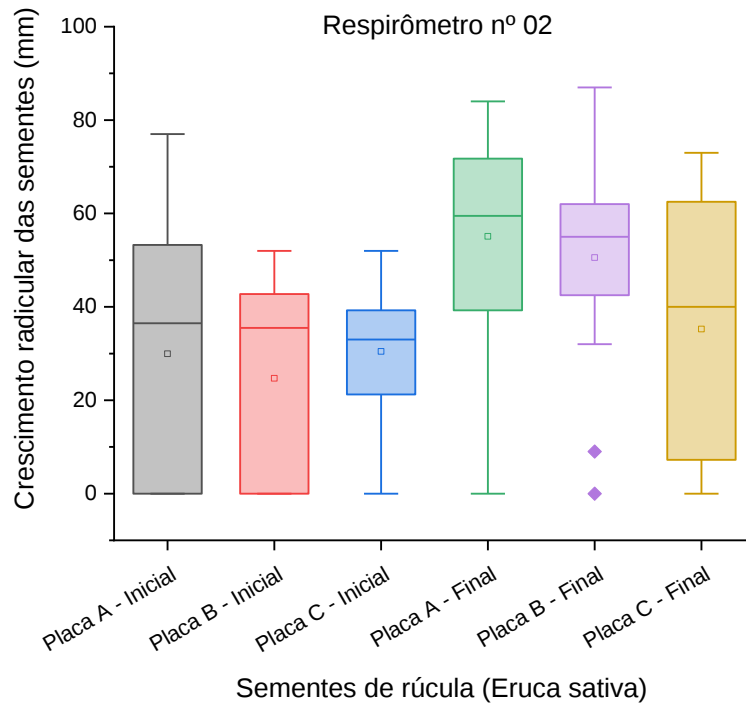
Quadro 13 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 1.

	Média	Grupos
Placa C - Inicial	40,05	A
Placa A - Final	39,7	A
Placa B - Final	39,5	A
Placa C - Final	37,45	A
Placa A - Inicial	31,7	A
Placa B - Inicial	25,85	A

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

As raízes das sementes de rúcula demonstraram maior crescimento após o tratamento realizado com *Bacillus subtilis* no solo, ultrapassando até mesmo os crescimentos demonstrados através do controle negativo e do respirômetro nº 01. Cabe ressaltar, no entanto, que o solo do respirômetro nº 02 não recebeu adição de contaminante, servindo também como um controle.

Figura 18 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 2 (testes iniciais e finais).



Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Através do teste de Tukey (Quadro 14), o agrupamento diferenciou significativamente a “Placa A - Final” (grupo A, com média de 55,1 mm de crescimento das raízes das sementes de rúcula) da “Placa B – Inicial” (grupo C, com média de 24,7 milímetros de crescimento das raízes das sementes de rúcula).

A “Placa B – Final” e a “Placa C – Final” (referentes aos testes realizados após as 13 semanas de tratamento) apresentaram tendência semelhante à da “Placa A – Final”, demonstrando maior crescimento médio, além de também integrar o grupo B (de crescimento intermediário).

A “Placa C – Inicial” e a “Placa A – Inicial” foram classificadas no grupo B, mas também demonstraram tendência de possuir menores médias de crescimento, bem como a “Placa B – Inicial”, portanto também foram agrupadas ao grupo C (Quadro 14). Deste modo, há indício de que a adição da bactéria *Bacillus Subtilis* no solo possa ter contribuído para o maior crescimento das raízes das sementes de rúcula nos testes realizados com o solo após o tratamento.

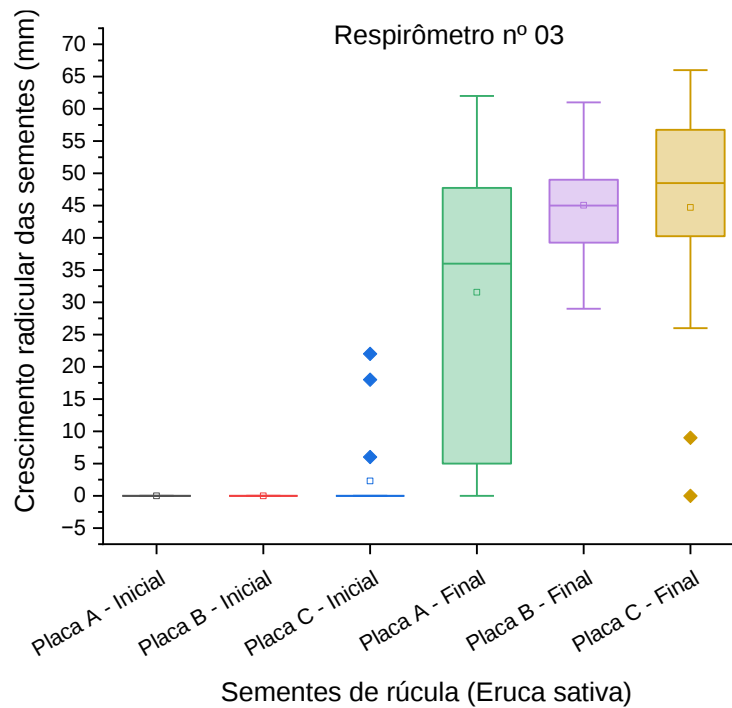
Quadro 14 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 02.

	Média	Grupos		
Placa A - Final	55,1	A		
Placa B - Final	50,55	A	B	
Placa C - Final	35,25	A	B	C
Placa C - Inicial	30,45		B	C
Placa A - Inicial	29,95		B	C
Placa B - Inicial	24,7			C

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Nos testes realizados logo após a adição de contaminante, apenas 5% das sementes de rúcula germinaram, demonstrando a toxicidade da gasolina. Após 13 semanas, no entanto, mesmo sem a bioaugmentação com *Bacillus subtilis*, a taxa de germinação aumentou para 90%, o que demonstra a possibilidade da ocorrência do processo de atenuação natural através dos microrganismos já existentes no solo.

Figura 19 – Gráfico Box Plot do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 3 (testes iniciais e finais).



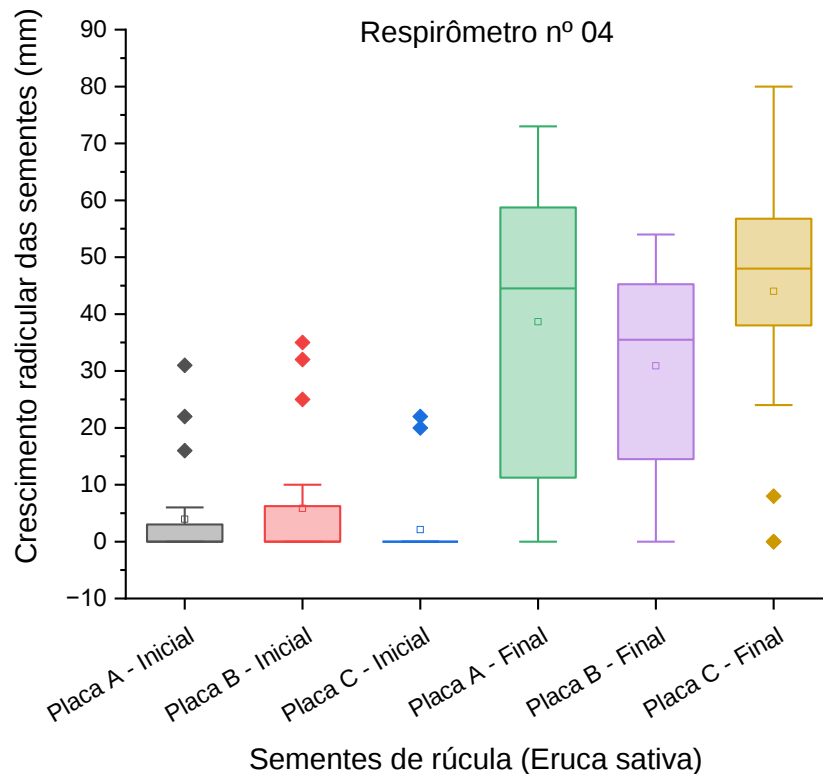
Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Quadro 15 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 03.

	Média	Grupos		
Placa B - Final	45,05	A		
Placa C - Final	44,7	A		
Placa A - Final	31,55		B	
Placa C - Inicial	2,3			C
Placa B - Inicial	0			C
Placa A - Inicial	0			C

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Figura 20 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 4 (testes iniciais e finais).



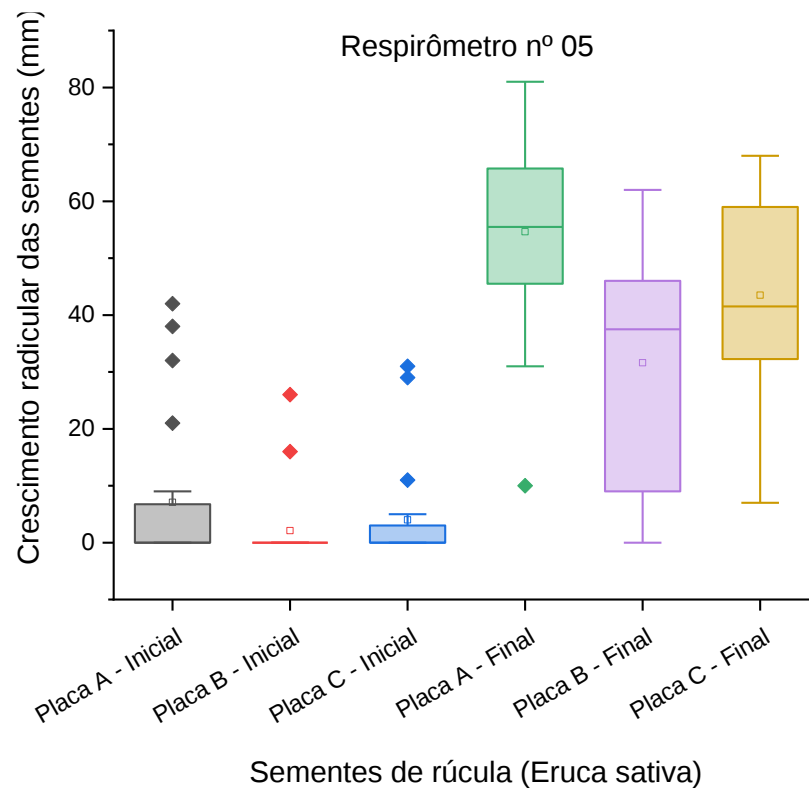
Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Quadro 16 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 04.

	Média	Grupos
Placa C - Final	44	A
Placa A - Final	38,65	A
Placa B - Final	30,9	A
Placa B - Inicial	5,85	B
Placa A - Inicial	3,95	B
Placa C - Inicial	2,1	B

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Figura 21 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 5 (testes iniciais e finais).



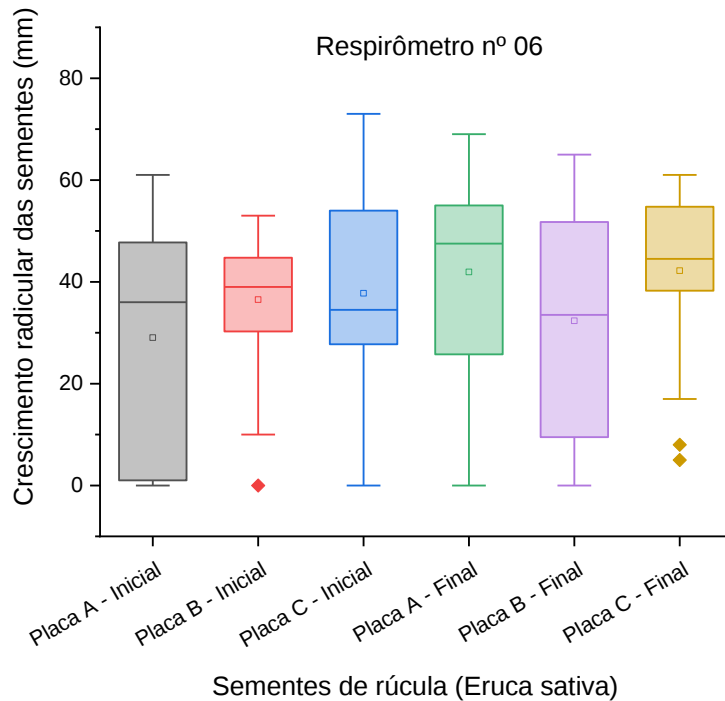
Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Quadro 17 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 05.

	Média	Grupos		
Placa A - Final	54,65	A		
Placa C - Final	43,5	A	B	
Placa B - Final	31,6		B	
Placa A - Inicial	7,1			C
Placa C - Inicial	4			C
Placa B - Inicial	2,1			C

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Figura 22 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 6 (testes iniciais e finais).



Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

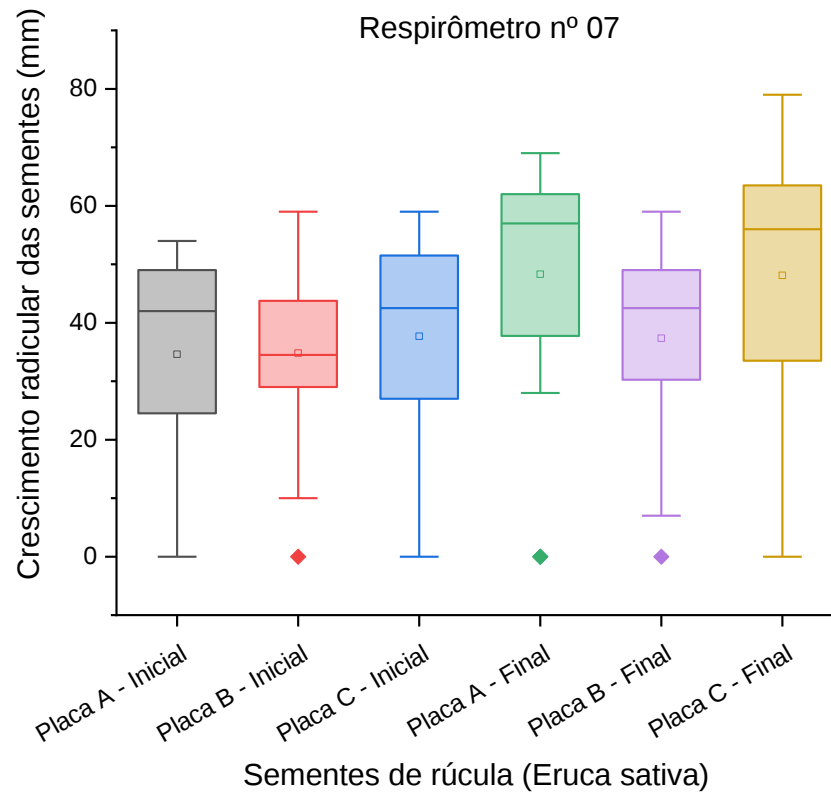
Quadro 18 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 06.

	Média	Grupo
Placa C - Final	42,2	A
Placa A - Final	41,95	A
Placa C - Inicial	37,75	A
Placa B - Inicial	36,5	A
Placa B - Final	32,35	A
Placa A - Inicial	29,05	A

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Quanto às sementes de rúcula do tratamento 7, é possível destacar que houve maior crescimento médio das raízes após as 13 semanas de tratamento.

Figura 23 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 7 (testes iniciais e finais).



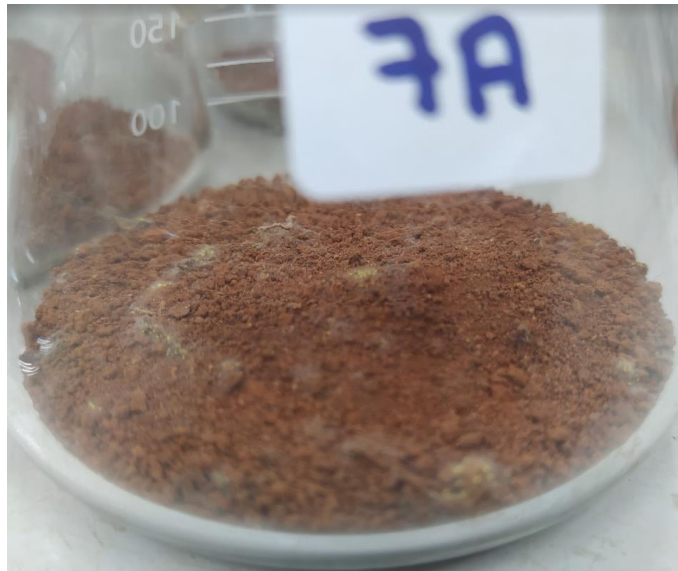
Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Quadro 19 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Tratamento 07.

	Média	Grupo
Placa A - Final	48,3	A
Placa C - Final	48,1	A
Placa C - Inicial	37,7	A
Placa B - Final	37,35	A
Placa B - Inicial	34,8	A
Placa A - Inicial	34,6	A

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

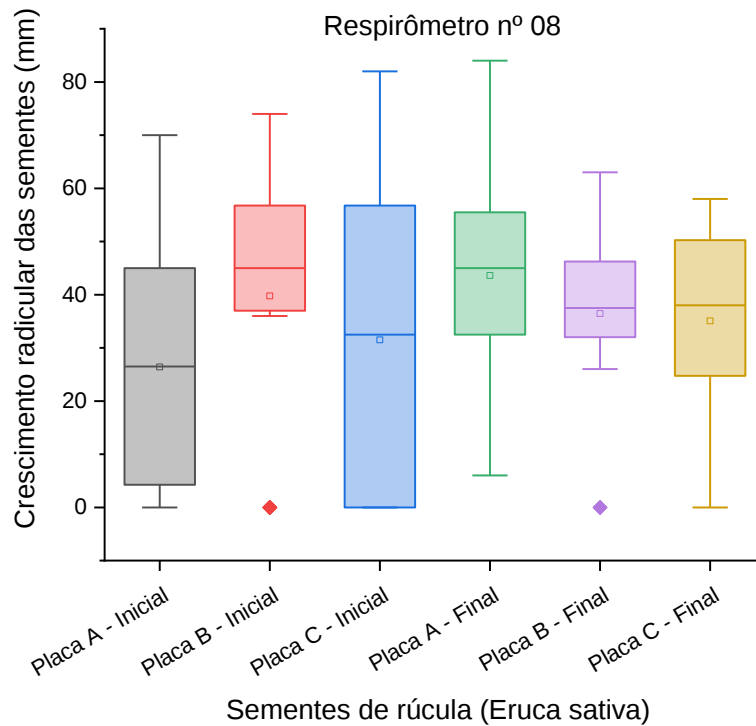
Figura 24 – Aparentemente alguns organismos de medida semelhante a esporos, de coloração amarelada, surgiram no Tratamento 7 ao decorrer das semanas.



Fonte: Autor (Agosto de 2024).

Quanto às sementes de rúcula do tratamento 8, é possível destacar que os testes finais, ou seja, após as treze semanas de tratamento, apresentaram maior crescimento médio das raízes, principalmente quando comparado ao tratamento 3 (onde havia apenas solo contaminado, sem remediação).

Figura 25 – Gráfico *Box Plot* do crescimento radicular das sementes de *Eruca sativa* do Tratamento 8 (testes iniciais e finais).



Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Quadro 20 – Agrupamento realizado com o teste de Tukey, para os dados do crescimento das raízes das sementes de rúcula do Respirômetro 08.

	Mean	Groups
Placa A - Final	43,6	A
Placa B - Inicial	39,75	A
Placa B - Final	36,45	A
Placa C - Final	35,05	A
Placa C - Inicial	31,5	A
Placa A - Inicial	26,4	A

Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

5.4 Médias de crescimento das sementes e taxas de germinação

Nos testes realizados ao início dos experimentos com as sementes de rúcula, antes da realização do tratamento ao longo das semanas, as sementes dos tratamentos nº 1, 2, 7 e 8 apresentam IG satisfatório, próximo ao controle negativo (39 mm). Tal crescimento já era esperado para os ensaios 1 e 2, uma vez que estes também atuam como controle, por não haver a adição de contaminante nestes exemplares.

Nos ensaios nº 7 e 8 das sementes de rúcula, assim como no ensaio nº 6 (também das sementes de rúcula), o crescimento médio das sementes do teste inicial apresentou-se próximo ao controle, mesmo estes ensaios tendo recebido a adição de contaminante. Tal resultado pode ter sido possível devido à presença do surfactante e/ou microrganismos.

O ensaio nº 5 das sementes de rúcula, apesar de ter recebido adição de surfactante, apresentou crescimento médio abaixo do controle negativo, mostrando tendência semelhante à dos respirômetros 3 e 4, que apresentaram os piores resultados de crescimento médio das sementes de rúcula.

Quadro 21 – Médias de crescimento e taxa de germinação das sementes no teste inicial.

INICIAL	Média de crescimento apenas entre as sementes germinadas (mm)	Unidade(s) de sementes germinadas por placa de petri testada	Porcentagem de relação relativa ao Controle Negativo (%G)	Desenvolvimento relativo da raiz em relação ao Controle Negativo (%R)	Índice de Germinação (IG)
Controle Negativo	39,00	18	100	100	100
ZnO	24,51	19	106	62,84	66,33
Tratamento 1	41,03	13	72	105,21	75,98
Tratamento 2	40,52	18,333	102	103,90	105,82
Tratamento 3	15,33	1	6	39,31	2,18
Tratamento 4	15,87	5	28	40,69	11,30
Tratamento 5	22	4	22	56,41	12,54
Tratamento 6	38,08	17,3	96	97,64	93,84
Tratamento 7	40,42	17,67	98	103,64	101,74
Tratamento 8	43,4	15	83	111,28	92,74

Fonte: Elaborado pelo Autor (Novembro de 2024).

Quadro 22 – Médias de crescimento e taxa de germinação das sementes no teste final.

FINAL	Média de crescimento apenas entre as sementes germinadas (mm)	Unidade(s) de sementes germinadas por placa de petri testada	Porcentagem de relação relativa ao Controle Negativo (%G)	Desenvolvimento relativo da raiz em relação ao Controle Negativo (%R)	Índice de Germinação (IG)
Controle Negativo	44,38	18,30	100	100	100
ZnO	12,17	20,00	109	27,41	29,96
Tratamento 1	41,61	18,00	98	93,76	92,22
Tratamento 2	39,96	17,00	93	90,04	83,64
Tratamento 3	8,29	2,3	13	18,68	2,35
Tratamento 4	34,66	12,67	69	78,10	54,07
Tratamento 5	32,60	11,33	62	73,45	45,48
Tratamento 6	33,36	17,33	95	75,17	71,18
Tratamento 7	33,92	17,33	95	76,43	72,38
Tratamento 8	41,35	19,00	104	93,17	96,73

Fonte: Elaborado pelo Autor (Novembro de 2024).

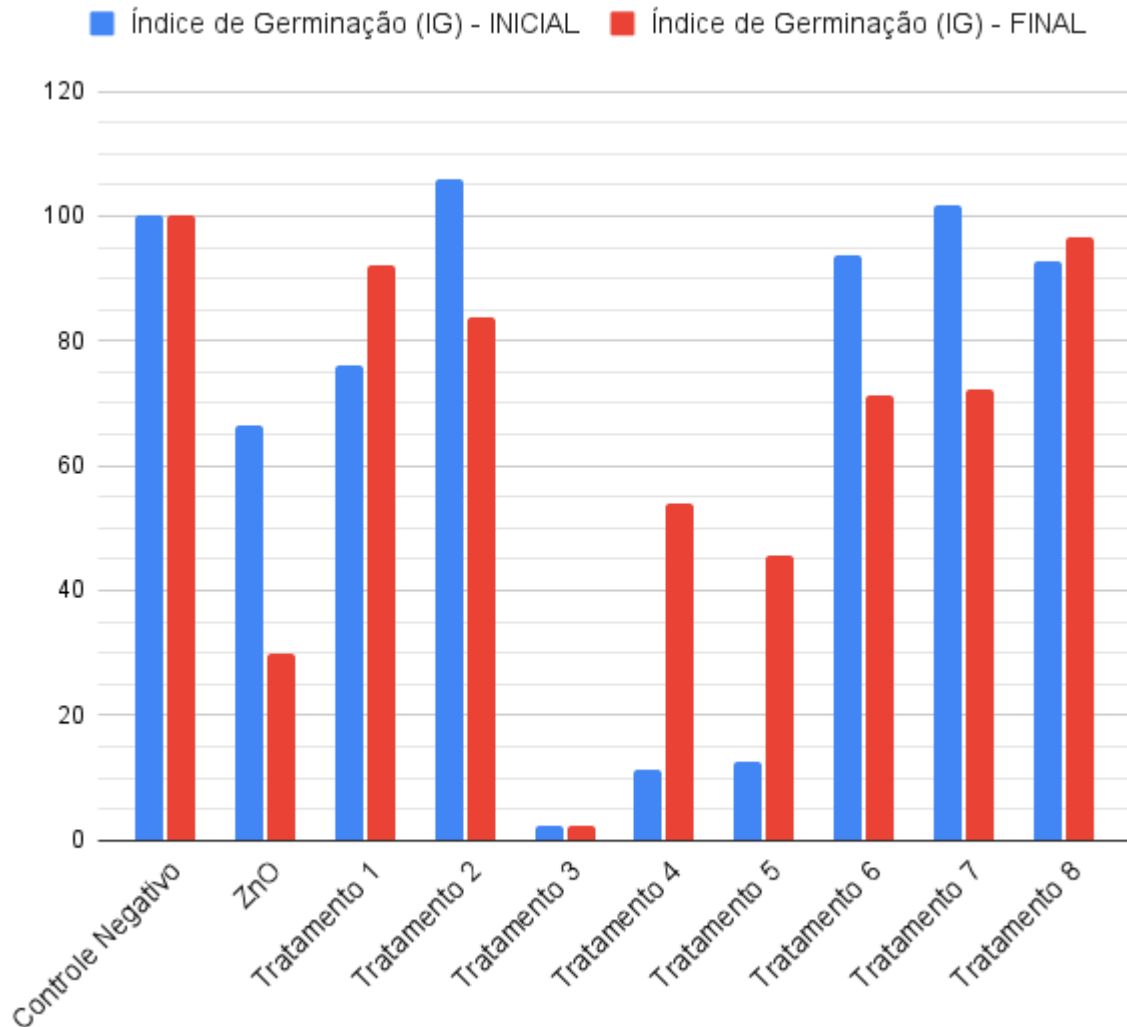
Os tratamentos 3, 4 e 5 apresentam efeitos mais notáveis, com forte impacto inicial no IG e sinais significativos de recuperação (nos tratamentos 4 e 5). Os tratamentos 1 e 8 demonstram impacto mínimo, enquanto os demais indicam maiores efeitos da toxicidade. O óxido de zinco (ZnO) é claramente tóxico, com uma queda acentuada no IG, afetando severamente a germinação e o crescimento.

Quanto às sementes de rúcula, é possível destacar que o índice de germinação de sementes nos tratamentos nº 4, 5 e 8 foram maiores após o período de 13 semanas. De modo geral, todos os tratamentos desempenharam índice de germinação significativamente maior que o solo contaminado e não tratado.

Destaca-se também o tratamento 2 que, ao não receber contaminação e apenas acréscimo de *Bacillus subtilis*, obteve de tratamento. nos testes “finais”, realizados após o tratamento. Os testes nº 5, 6, 7 e 8 passaram todos a ter taxa de germinação acima de 90%.

As sementes do controle realizado com óxido de zinco, apesar da aparente alta taxa de germinação, não apresentaram um desenvolvimento saudável, com baixo crescimento e tonalidade amarelada no hipocótilo e na raiz de cada uma das sementes.

Figura 26 – Comparativo do Índice de Germinação (%IG) das sementes ao início e ao final dos tratamentos.



Fonte: Elaborado pelo Autor (Outubro de 2024).

Ao final das 13 semanas, no tratamento nº 1, o tamanho médio das raízes de rúcula aumentou, sugerindo que a água sozinha não atrapalhou o crescimento das sementes ao longo do tempo.

O tratamento nº 2 obteve o maior crescimento médio no teste final, sendo o teste em que houve a adição de *Bacillus subtilis*, indicando que estes microrganismos podem ter potencializado o ambiente para germinação das sementes de rúcula.

O tratamento nº 3 (somente adição de contaminante, sem biorremediação) teve baixo IG, indicando efeitos tóxicos da gasolina mesmo após as 13 semanas de tratamento, principalmente quando em comparação aos demais tratamentos (que receberam biorremediação).

Os tratamentos 4, 5 e 8 das sementes de rúcula mostraram melhor desempenho após as semanas de tratamento, ambos aproximando-se do IG do controle, indicando que a possível efeito positivo da bioaugmentação com *Bacillus subtilis* (tratamento 4) e bioestimulação com surfactante (tratamento 5), que podem ter suavizado os efeitos negativos da gasolina e favorecido a biodegradação do contaminante, em comparação aos testes realizados no momento inicial dos experimentos.

Os tratamentos nº 6 e 7 apresentaram redução do IG. No entanto, este desempenho ainda superou o solo do Tratamento 3 (que não recebeu remediação), indicando que a remediação possivelmente teve efeitos positivos na germinação das sementes, tanto antes quanto após o período de tratamento.

Os tratamentos que apresentaram crescimento abaixo do controle indicam a possível interferência do contaminante no crescimento das raízes das sementes. Ainda tratando dos testes de toxicidade em sementes de rúcula, foi possível concluir que a gasolina reduziu o crescimento em geral, mas, em combinação com a bactéria *Bacillus subtilis* e surfactante *Tween® 80*, seus efeitos negativos aparentemente foram moderados. A combinação entre de água com *Bacillus subtilis* e surfactante pareceu ser um fator positivo para o crescimento das sementes de rúcula. O resultado foi semelhante, com ou sem a adição de água.

6 CONCLUSÕES

Os tratamentos que utilizaram *Bacillus subtilis* e Tween® 80 apresentaram maior atividade microbiana, com destaque para os respirômetros nº 5, 6, 7 e 8, que mostraram maior emissão de CO₂ e redução da toxicidade. Os teores de condutividade elétrica dos respirômetros nº 5, 6, 7 e 8 foram menores do que os demais respirômetros, onde não houve adição de surfactante (nº 1, 2, 3 e 4), concluindo que possivelmente houve efeito dos surfactantes.

Foi possível estabelecer a correlação direta e linear entre a condutividade da solução de hidróxido de potássio (KOH) pois, conforme a solução de KOH recebe o CO₂ proveniente do metabolismo microbiano, é aumentada a quantidade de sal na solução $2\text{KOH} + \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{K}_2\text{CO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$, diminuindo assim a condutividade da solução de KOH.

Os testes com sementes de rúcula indicaram que a adição de *Bacillus subtilis* e Tween® 80 reduziu os efeitos tóxicos da gasolina e melhorou o crescimento radicular, enquanto a gasolina sozinha inibiu esse crescimento. Durante os testes ecotoxicidade realizados com as sementes de rúcula, a bactéria *Bacillus subtilis* demonstrou potencial para melhorar o crescimento das raízes das sementes, destacando-se inclusive em comparação com o teste de controle (que recebeu adição apenas de água).

Apesar dos níveis de pH apresentarem médias semelhantes em todos os testes, através do teste de ANOVA e Tukey foi possível comprovar que o teste de nº 3 (com adição de gasolina e água) apresentou pH significativamente diferente dos demais, especialmente quando comparado ao respirômetro nº 7. O resultado estava em conformidade com Montagnolli (2015), pois conforme esperado, a maior concentração de CO₂ causada pela respirabilidade dos microrganismos tende a tornar o KOH mais ácido. A diferença entre as médias, no entanto, foi pequena, de apenas algumas casas decimais.

De modo geral, os tratamentos que combinaram *Bacillus subtilis* e Tween® 80 foram eficazes para degradar a gasolina e promover a recuperação do solo, sendo uma alternativa viável para a remediação ambiental.”

Referências bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2021**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2021/anuario-2021.pdf>>. Acesso em: 14 ago. 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2024**. <<https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/anuario-estatistico/arquivos-anuario-estatistico-2024/secao-3/secao3.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. **Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados**. Revista Equilíbrio Químico, (2010), 7-25. <<https://www.scielo.br/j/eq/a/sGLvvgg5B6qBspNBtncd9GKq/>>. Acesso em 24 set. 2023.

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. 2, p. 68-70, 1965.

BRASIL. Lei nº 8.723, de 28 de outubro de 1993. **Dispõe sobre a redução de emissão de poluentes por veículos automotores e dá outras providências**. Diário Oficial da União, nº 208, de 29/10/1993. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8723.htm>. Acesso em: 24 nov. 2023.

COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura B10 por consórcio bacteriano**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Ambiental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (138p.), abril, 2012. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61774/000866621.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 22 set. 2024.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Conceitos e definições**. [s.l.], [s.d.]. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/tipos-de-acidentes/vazamentos-de-oleo/impactos-ambientais/conceitos-e-definicoes/>>. Acesso em: 19 abr. 2023.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Remediação**. <<https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/tipos-de-acidentes/postos-de-combustiveis/atendimento-emergencial-postos-de-combustiveis/remediacao/>>. Acesso em: 14 ago. 2023.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Sistema de Áreas Contaminadas e Reabilitadas**. <<https://mapas.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/portal/apps/MapJournal/index.html?appid=28e7bb2238a443819447a8ec3ae4abe5>>. Acesso em: 24 set. 2023.

CRUZ, G. F. MARSAIOLI, A. J. **Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios**. Química Nova, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 583-587, 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/mmRRqpwG89kVhnQNpwgrrNn/?format=pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2023.

FARIA, M. A. de; BIDOIA, E. D., LOPES, P. R. M. **Efeito da Vinhaça e herbicida contendo tebutiuram sobre bactérias em solo e toxicidade em alface**. Rio Claro: Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia – UNESP – IB, 2018.

FERRAZZA, F. L. F.; BORGES, G. T.; JACOBOSKI, D. T. K.; CONTI, L.; PARAGINSKI, R. T. **Efeito de diferentes doses de zinco na qualidade de sementes de diferentes cultivares de trigo**. ScientiaTec: Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS, Rio Grande do Sul, v. 9, n. 2, p. 44-56, jul. 2022.

FUENTES Guevara, M. D.; MELLO, A. G.; CORRÊA, É. K.; GUEDES, H. A. S.; CORRÊA, L. B.; NAZARI, M. T. **Fitotoxicidade em águas residuárias domésticas utilizando sementes como bioindicadores**. Revista DAE, São Paulo, v. 66, n. 216, p. 49-58, abr./jun. 2019. Disponível em: <http://revistadae.com.br/artigos/artigo_edicao_216_n_1773.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2024.

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, p. 9438–9446, 2011. Acesso em 22 set. 2024.

LAPA, Mariel. **Avaliação Ecotoxicológica de Solos Impactados com Borra Oleosa Submetidos a Diferentes Tratamentos de Biorremediação**. Pelotas: Universidade Federal de

Pelotas, 2014. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/esa/files/2014/10/TCC-MARIEL-LAPA.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2023.

LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. **Evaluation of the Biodegradation of Different Types of Lubricant Oils in Liquid Medium. Brazilian Archives of Biology and Technology.** Vol.52, n. 5: pp. 1285-1290, September-October 2009. Acesso em: 30. nov. 2024

ISSN 1516-8913

MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e petroquímicos: biorremediação de áreas afetadas.** Rio Claro: Departamento de Bioquímica e Microbiologia – UNESP – IB, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/ed7e2650-46b9-4d68-b57a-9dae46c4d090/content>>. Acesso em: 08 nov. 2024.

NUPIS – NÚCLEO DE PESQUISA EM INSTRUMENTAÇÃO E SEPARAÇÕES ANALÍTICAS. **Condutometria.** Juiz de Fora: UFJF, 2016. Disponível em:<<https://www2.ufjf.br/nupis/files/2016/08/Condutometria3.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

PAREDES, Deborah P.; FERREIRA, Marcelo U.; LIMA, Nathália F. et al. **Epidemiologia molecular da malária por Plasmodium vivax no Brasil: uma revisão sistemática.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 117, n. 3, p. 1-17, mar. 2022. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/55914/DeborahParedes_et al_IOC_2022.pdf?sequence=3>. Acesso em: 22 nov. 2023.

PETROBRAS DISTRIBUIDORA. **Nova Gasolina Brasileira.** Disponível em: <https://brseguro.br-petrobras.com.br/wcm/connect/lib_portalconteudo/home/produtos+e+servicos/para+seu+veiculo/gasolina/gasolina+>. Acesso em: 19 abr. 2023.

PEDUTO, T. A. G.; JESUS, T. A.; KOHATSU, M. Y. **Sensibilidade de diferentes sementes em ensaio de fitotoxicidade.** Revista Brasileira de Engenharia Ambiental e Sanitária, v. 4, n. 2, p. 200-212, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/336356024_Sensibilidade_de_diferentes_sementes_em_ensaio_de_fitotoxicidade>. Acesso em: 04 dez. 2023.

SANTOS, V. **Reações químicas: 3a parte**. Porto Alegre: Colégio de Aplicação da UFRGS, 2020. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/colegiodeaplicacao/wp-content/uploads/2020/10/REAC%CC%A7O%CC%83ES-QUI%CC%81MICAS-3a-Parte.pdf>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

SILVA, J. P.; SANTOS, Y. R. P.; BELLO, M. I. M. C. V. **Aplicação da ANOVA e dos testes de Fisher e Tukey em dados de recalque de edifícios de múltiplos pavimentos**. *Revista Principia*, João Pessoa, v. 59, n. 3, p. 829–845, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2021id5388>>. Acesso em: 02 set. 2024.

STEIN, Torsten. **Bacillus subtilis antibiotics: structures, syntheses and specific functions**. *Molecular Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 845–857, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>. Acesso em: 29 nov. 2024.