
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MIRELLE SANTOS DE PAULA

**CONTAMINAÇÃO POR GASOLINA E SEUS
IMPACTOS NO MEIO AMBIENTE AQUÁTICO**



Rio Claro
2020

MIRELLE SANTOS DE PAULA

CONTAMINAÇÃO POR GASOLINA E SEUS IMPACTOS NO MEIO
AMBIENTE AQUÁTICO

Orientador: Prof. Dr. Ederio D. Bidoia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2020

P324c Paula, Mirelle Santos de
Contaminação por gasolina e seus impactos no meio ambiente aquático / Mirelle Santos de Paula. -- Rio Claro, 2020
40 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Água potável Contaminação. 2. Gasolina. 3. Biorremediação. 4. Bactérias aeróbicas. 5. Bactérias anaeróbicas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

MIRELLE SANTOS DE PAULA

CONTAMINAÇÃO POR GASOLINA E SEUS IMPACTOS NO MEIO
AMBIENTE AQUÁTICO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro, 14 de Dezembro de 2020



Mirelle Santos de Paula
(Aluna)



Ederio Dino Bidoia
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Glaucia Santos de Paula e Claiston Silva de Paula, por terem me oferecido total apoio e incentivo desde o vestibular, fazendo o impossível para que eu viesse a concluir o ensino superior estando tão longe de casa. Agradeço ao meu namorado, Bruno, por ter sido meu companheiro mesmo a distância em todos os anos da graduação e a seus pais, Viviane e Junior, que sempre me trataram como filha. Agradeço aos meus queridos avós, Domacir e Djanira, que nunca deixaram de cuidar de mim mesmo depois de crescida.

Sou imensamente grata aos meus amigos e colegas de turma: Amanda, Andreza, Livia, Mônica, Maíra e Matheus Luqueta, por terem me acolhido e oferecido sua amizade no meu pior momento da graduação. Obrigada por terem me trazido alegria, sorrisos e risadas. Sem vocês creio não teria conseguido chegar ao final do curso. MUITÍSSIMO obrigada. Vocês são as maiores alegrias que a Unesp me deu.

Agradeço infinitamente ao meu orientador, Ederio Dino Bidoia, por se dispor a me receber como sua orientanda com um período de tempo tão apertado para realizar as atividades necessárias. Sem ele eu não estaria realizando o sonho da formatura. Agradecimentos extensivos aos meus companheiros do Laboratório Multidisciplinar: Graziela, Iuri, Apraham e Nielly, por oferecerem sua amizade e auxílio, sempre se prontificando a me ajudar nos meus momentos de dúvidas. Mas em especial, agradeço à Grazi por ter me ajudado em absolutamente TUDO desde que a conheci. Agradeço a todos pelas conversas e tardes repletas de risos. Sempre vou lamentar por não tê-los conhecido antes.

E por fim, e não menos importante, agradeço à Deus. Sem Ele nada disso seria possível. Sem Ele, eu não teria conseguido.

"Tudo o que existe e vive precisa ser cuidado para continuar a existir e a viver: uma planta, um animal, uma criança, um idoso, o planeta Terra."

(Leonardo Boff)

RESUMO

A gasolina é um combustível comumente utilizado ao redor do mundo, sendo essencial para diversas atividades humanas. Os constantes derramamentos e vazamentos do combustível no solo tem causado preocupação em diversos países, uma vez que inevitavelmente, esse combustível alcança o lençol freático, contaminando águas potáveis. A gasolina possui em sua composição os compostos BTEX: hidrocarbonetos tóxicos que apresentam potencial de causar várias doenças sérias. Em vista disso, a biorremediação tem sido um processo amplamente utilizado em casos de contaminação, com o intuito de eliminar tais compostos tão nocivos de aquíferos. Sendo assim, a coluna de Winogradsky juntamente com testes de pH, condutividade elétrica, microbiológicos e de toxicidade, foram utilizados com o objetivo de avaliar o nível de toxicidade da gasolina e se houve biodegradação da mesma por meio dos microrganismos presentes na coluna. Com os resultados obtidos, foi evidenciado a toxicidade do combustível, assim como sua biodegradação no ambiente aquático.

Palavras-chave: gasolina, biorremediação, aquíferos.

ABSTRACT

Gasoline is a fuel commonly used around the world, being essential for many human activities. The constant fuel spills and leaks on the ground has caused concerns in many countries, since inevitably the fuel reaches the groundwater, contaminating drinking water. Gasoline has BTEX compounds in its composition: toxic hydrocarbons that have potential to cause several diseases. Because of it, bioremediation has been a widely used process in cases of contamination, in order to eliminate such harmful compounds from aquifers. Thus, Winogradsky column, along with pH, electrical conductivity, microbiological and toxicity tests, were used in order to evaluate the level of gasoline toxicity and whether there was biodegradation due to the action of microorganisms present in the column. The results obtained showed the toxicity of the fuel, as well as its biodegradation in the aquatic environment.

Keywords: gasoline, bioremediation, aquifers.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. Coluna de Winogradsky.....	11
2.2. Gasolina.....	12
2.2.1. Impactos negativos causados pelos compostos BTEX.....	14
2.3. Biorremediação.....	14
2.4. Ecotoxicologia.....	15
3. METODOLOGIA.....	17
3.1. Coluna de Winogradsky.....	17
3.2. Coleta da água.....	17
3.3. Local de execução do experimento.....	18
3.4. Análises físico-químicas e microbiológicas.....	18
3.4.1. Água de diluição.....	18
3.4.2. Método de diluição das amostras.....	19
3.4.3. Análise de bactérias heterotróficas.....	19
3.4.3.1. Preparo do meio de cultura Plate Count Agar.....	19
3.4.3.2. Inoculação, incubação e contagem.....	20
3.5. Procedimento analítico.....	21
3.5.1. Demanda química de oxigênio (DQO).....	21
3.5.2. Preparo de reagentes.....	22
3.5.3. Curva padrão e equação padrão.....	22
3.6. Teste de ecotoxicidade com sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	23
3.6.1. Germinação das sementes.....	25
3.6.2. Toxicidade do contaminante.....	26
3.7. Tratamento e análise de dados.....	27
4. TRATAMENTO E DESCARTE DE RESÍDUOS DA PESQUISA.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1. Aspectos da coluna de Winogradsky.....	29
5.2. pH e condutividade elétrica.....	29
5.3. Teste microbiológico (PCA).....	32
5.4. Teste de demanda química de oxigênio (DQO).....	34

5.5. Teste de ecotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i>	35
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

A gasolina é um combustível de origem fóssil detentor de alta relevância na sociedade atual, sendo um produto de grande interesse econômico e necessário para o desempenho de diversas atividades humanas. Apesar de sua importância no mundo moderno, esse combustível tem sido motivo de preocupação devido seus decorrentes derrames e vazamentos.

Apesar de ser pouco solúvel em água e inicialmente chegar ao subsolo como líquido de fase não aquosa, em contato com a água, a gasolina é dissolvida parcialmente, de forma que seus componentes mais voláteis, os hidrocarbonetos monoaromáticos conhecidos como compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) são os primeiros a alcançar o lençol freático. Tal fato se sucede por tais constituintes serem os mais solúveis em água. Os compostos BTEX são substâncias consideradas tóxicas e perigosas: são substâncias depressantes do sistema nervoso central e podem causar leucemia em casos de exposições crônicas (CORSEUIL e MARTINS, 1997).

De acordo com Silva et. al. (2002), a preocupação com a contaminação de águas subterrâneas por meio de vazamento de tanques de armazenamento subterrâneo de combustíveis, vem aumentando. Segundo dados provenientes da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA), 30% dos tanques de armazenamento subterrâneos estão com problemas de vazamento em razão do seu tempo de vida útil, que é de 25 anos. O Brasil apresenta o mesmo problema: com o grande aumento no número de postos de gasolina na década de 70, pode-se constatar que o tempo de vida útil desses tanques já tenha chegado ao fim, aumentando ainda mais as chances de vazamentos.

Alguns processos físico-químicos e biológicos têm sido utilizados para a retirada de hidrocarbonetos de petróleo puros ou dissolvidos em água subterrânea, e também outros contaminantes orgânicos em sistemas de solo subsuperficial. Seu intuito é controlar o movimento de plumas (contaminantes), tratar águas subterrâneas, e/ou descontaminar solos. Estão entre esses processos a extração de vapores do solo (SVE), recuperação de produto livre, bioventilação, extração com solventes, incineração, torres de aeração,

adsorção em carvão, biorreatores, biorremediação no local, entre outros (SANTOS, 1996).

É do conhecimento de todos que a água potável é um recurso esgotável e em virtude disso, é de extrema importância o tratamento e recuperação de aquíferos contaminados. Longos períodos de tempo e altos custos normalmente são associados a maioria dos processos utilizados para remediação. Contudo, processos biológicos como a biorremediação têm se mostrado economicamente viáveis, além de apresentar impactos ambientais mais brandos entre outros padrões exigidos pelas legislações (SANTOS, 1996).

Este trabalho teve como objetivo avaliar por meio de métodos físicos, químicos e microbiológicos se houve vestígios que evidenciassem ocorrência de biodegradação de gasolina pura no ambiente aquático utilizado: a coluna de Winogradsky; assim como estimar o nível de toxicidade de tal composto por meio do teste de toxicidade em sementes de *Lactuca Sativa*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Coluna de Winogradsky

Criada pelo russo Sergei Winogradsky em 1880, a coluna de Winogradsky foi criada com o intuito de estudar microrganismos presentes no solo. Seu uso perdurou até os dias de hoje por ser um sistema que exprime a diversidade de microrganismos em ambientes aquáticos (GOMES, 2011).

Habitualmente a coluna é feita de material transparente, como vidro ou plástico, nela são colocadas amostras de solo e água do local que se deseja analisar. Esses componentes são suplementados por uma fonte de fonte de celulose, podendo ser ela na forma de carboximetilcelulose (CMC) ou de papel picado, juntamente com uma fonte de sulfatos. Por fim, é adicionada uma solução tamponante, que tem como função manter o pH estável. O ideal é que a coluna seja tampada com uma tela fina para que não haja proliferação de mosquitos, e colocada em um local onde ela possa receber luz solar constantemente. Em poucos dias colônias de bactérias começarão a se desenvolver, alimentadas pelo substrato oferecido pela coluna. Sua disposição espacial varia de acordo com seu metabolismo, como é mostrado na Figura 1: os microrganismos aeróbios se localizam na superfície e os anaeróbios no fundo, os microaerófilos se encontrarão em uma faixa estreita da coluna e facultativos ao longo da coluna (GOMES, 2011).

Levando em consideração o que foi elucidado, a coluna de Winogradsky é um ótimo meio para acompanhar o desenvolvimento de um ecossistema aquático, podendo ser utilizada em estudos ambientais que visam a contaminação de corpos aquáticos (GOMES, 2011).

Figura 1: coluna de Winogradsky.

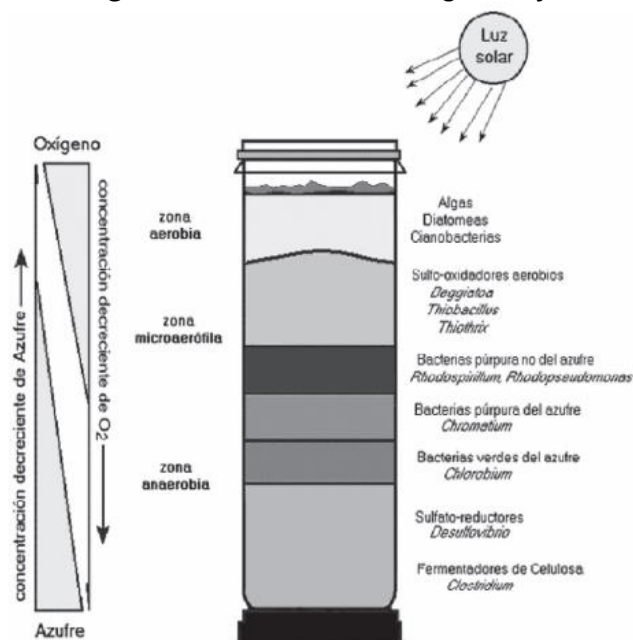


Figura 1 – Desenvolvimento de comunidade microbiana em coluna de Winogradsky, disponível em <http://www.qb.fcen.uba.ar/microinmuno/SeminarioBiodiversidad.htm>, consultado em 24/04/2011.

Fonte: Gomes, 2011.

2.2. Gasolina

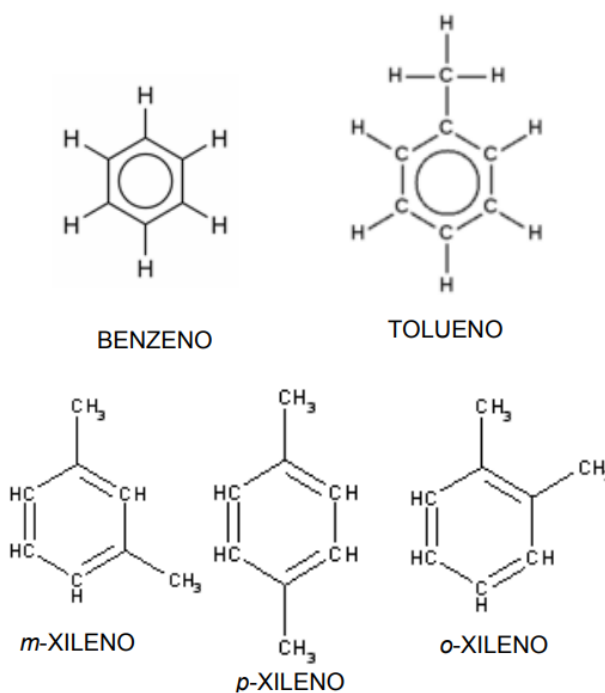
A gasolina deriva do petróleo, classificando-a como um combustível fóssil. Ela apresenta mais de 150 componentes e é formada por um conjunto de vários grupos de hidrocarbonetos, sendo eles: parafínicos (possuem cadeias retilíneas com ligações simples), naftalênicos (possuem cadeias fechadas com ligação simples), aromáticos (possuem cadeia fechada) e mistos, capazes de portar entre 4 e 13 átomos de carbono (MORALES, 2008).

A gasolina brasileira se diferencia das gasolinas de outros países por ser feita 76% gasolina e 24% etanol (álcool etílico). Segundo a Petrobras, a mistura desses dois combustíveis tem como objetivo: reduzir o consumo, aumentar a octanagem, garantir maior vida útil para os motores e fornecer maior eficiência energética. Apesar de trazer vantagens, essa prática

também traz impactos negativos, visto que a mistura dos compostos BTEX com o etanol modifica o movimento da pluma em sistemas subsuperficiais. Assim, a presença do etanol pode causar: a) aumento da solubilidade dos compostos BTEX dissolvidos em água, b) aumento da mobilidade dos BTEX dissolvidos em águas subterrâneas e c) dificuldade da biodegradação natural desses compostos, aumentando a persistência dos mesmos em águas subterrâneas (CORSEUIL e MARTINS, 1997; MORALES, 2008).

Os compostos aromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), representados na Figura 2, são constituintes da gasolina. Esses hidrocarbonetos possuem alta solubilidade em água e essa característica é um dos maiores motivos de preocupação em caso de contaminação, visto que esses constituintes são considerados tóxicos e carcinogênicos. Graças a esses atributos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), classifica esses compostos como poluentes prioritários (MORALES, 2008).

Figura 2: compostos BTEX.



Fonte: Morales, 2008.

As normas ditadas pelo Ministério da Saúde (Portaria nº 1.469/2000) referentes as concentrações limites para potabilidade da água com os BTEX são: xileno $300 \mu\text{g L}^{-1}$, etilbenzeno $200 \mu\text{g L}^{-1}$, tolueno $170 \mu\text{g L}^{-1}$, e para o benzeno, apenas $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

2.2.1. Impactos negativos causados pelos compostos BTEX

O benzeno é um composto considerado muito perigoso pelo EPA. Ele é capaz de induzir a biotransformação de certos compostos em espécies reativas (SENZOLO et al., 2000). Powley e Carlson (1999) associam tal hidrocarboneto a doenças como câncer de pulmão e leucemia, e distúrbios relacionados ao sangue como leucopenia (diminuição no número de leucócitos), anemia aplástica (produção insuficiente de células sanguíneas novas) e trombocitopenia (produção insuficiência de plaquetas). Raikhlin-Eisenkraft, Hoffer, Baum e Bentur (2001) afirmam que a inalação de tolueno está correlacionada a sintomas de síndromes neurais, como por exemplo, convulsões; déficits cognitivos, falta de atenção e memória.

2.3. Biorremediação

A biorremediação é uma tecnologia que faz uso do processo natural de degradação realizado por microrganismos (certas bactérias e fungos) para recuperar águas contaminadas. Existem microrganismos capazes de degradar uma variedade de compostos químicos, incluindo contaminantes e compostos tóxicos (SANTOS, 1996).

A **biorremediação natural** degrada contaminantes aerobicamente, mas pode ser utilizada em áreas sem oxigênio, diminuindo significativamente a concentração de contaminantes em ambientes aquáticos de superfície ou subterrâneos. Já a **biorremediação artificial**

trabalha com a inserção de populações de microrganismos capazes de degradar os contaminantes específicos daquela área. Esse método torna-se necessário em casos drásticos de poluição, onde a microbiota foi totalmente extinguida ou quando o local se encontra totalmente estéril. Nesses casos ainda pode surgir a necessidade de adicionar alguns nutrientes, como fósforo (P) e nitrogênio (N). O oxigênio, também pode ser inserido para acelerar o processo de biodegradação (SANTOS, 1996).

2.4. Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é a ciência que estuda as diferentes formas de como um ambiente pode ser contaminado por poluentes naturais ou sintéticos, além de seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre os seres vivos que compõem a biosfera. Essa área nasceu com o objetivo de monitorar o meio ambiente, levando em consideração como os seres vivos, sendo eles animais, plantas ou microrganismos, respondem à estresses químicos. Em suma, a ecotoxicologia estuda intoxicações ambientais, assim como suas consequências, com o intuito de prevenir tais quadros de contaminação e ainda, de encontrar formas para combatê-los (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Ao redor do mundo existem diversas organizações e agências que oferecem normas e padrões para bioensaios realizados em estudos ecotoxicológicos. Elas consideram as particularidades de cada procedimento, indicando um organismo modelo para a realização desses ensaios. No Brasil, a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) é uma das responsáveis por esse trabalho. Apesar de existirem organizações que lidam com tal temática a nível nacional, cada estado brasileiro possui um órgão responsável pela fiscalização de recursos naturais, podendo cada um possuir suas próprias normas para testes ecotoxicológicos, como é o caso da CETESB, em São Paulo (SILVA; POMPÊO; PAIVA, 2015).

É importante ressaltar que os resultados obtidos das análises químicas não são o suficiente para retratar se houve algum impacto

ambiental naquela região ou não. Somente sistemas biológicos são capazes de detectar os efeitos tóxicos de alguma substância (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

3. METODOLOGIA

3.1. Coluna de Winogradsky

A coluna de Winogradsky foi confeccionada com elementos retirados da UNESP, *campus* Rio Claro. A camada de sedimento foi retirada da área arborizada próxima ao departamento de Biologia Geral e Aplicada. Os materiais utilizados como recipiente para a sustentação da coluna foram garrafas pet transparentes.

Nas colunas foram utilizadas 100 g de sedimento do *campus*, 4,5 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4), 0,2 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3), 0,2 g de fosfato de dipotássico (K_2HPO_4), 0,5 g de sulfato de amônio [$(\text{NH}_4)\text{SO}_4$], 0,5 g de celulose e 1000 mL de água do lago artificial paisagístico situado no Instituto de Biociências. Foi incluída uma concentração – diferente para cada coluna – do contaminante utilizado no experimento: gasolina pura.

Ao total foram produzidas seis colunas, sendo uma a controle, na qual não havia contaminante, e as outras possuíam concentrações de 100 μL , 250 μL , 500 μL , 1000 μL e 1500 μL de gasolina pura.

3.2. Coleta da água

A água utilizada no experimento foi retirada próxima à superfície e tem como local de origem o lago paisagístico localizado no próprio campus universitário da UNESP – Rio Claro. Nele é encontrado um ecossistema composto por vegetais, microrganismos, invertebrados e matéria em decomposição. A água foi parte da fase aquosa da coluna de Winogradsky, e também, onde a substância contaminante – gasolina – foi adicionada.

3.3. Local de execução do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, no Instituto de Biociências da UNESP - *Campus* de Rio Claro.

3.4. Análises físico-químicas e microbiológicas

A medição do pH ocorreu mediante a utilização do pHmetro Digimed DMPH-2, calibrado com soluções tampões em pH 4 e 7, medido diretamente na amostra. A condutividade foi medida com o condutímetro Tecnopom CA150. A quantificação das bactérias heterotróficas foi feita de acordo com CETESB (2006). Para as análises microbiológicas foram utilizadas placas Cromoclim.

Todas as análises mencionadas foram medidas semanalmente.

3.4.1. Água de diluição

A água de diluição é constituída por duas soluções que posteriormente são somadas à uma terceira solução. A seguir, a constituição das soluções:

- Solução 1: 34 gramas de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) são dissolvidos em 500 mL de água destilada. O pH é ajustado para 7,2 com solução de hidróxidos de sódio, solução 1N e diluída a 1 litro com água deionizada. Foram necessários 175 mL de NaOH 1N para elevar o pH.
- Solução 2: 81,1 gramas de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) são dissolvidas em 1 litro de água destilada.

- Solução 3: consiste em 1,25 mL da solução 1 e 5 mL da solução 2 em 1 litro de água deionizada. Essa mistura é distribuída em tubos de cultura em quantidade que venham ter o volume de $9 \pm 0,2$ mL após a autoclavagem. A solução, por fim, é esterilizada em autoclave a 121 °C (1 Kg/cm² de pressão) durante 15 minutos.

3.4.2. Método de diluição das amostras

Foi utilizada a diluição seriada das amostras em tubos de cultura já autoclavados. Com uma pipeta esterilizada foi adicionado 9 mL de água de diluição e 1 mL de amostra, adquirindo assim uma diluição de 10 vezes. Em seguida, 1 mL foi retirado desse mesmo tubo de ensaio e adicionado a outro tubo de ensaio que também continha 9 mL de água de diluição. Desta maneira foi possível obter de $1,0 \times 10^2$. Este método foi repetido pela quantidade de vezes foram necessárias para que a contagem das colônias fosse possível pelo método analítico selecionado.

3.4.3. Análise de bactérias heterotróficas

3.4.3.1. Preparo do meio de cultura Plate Count Agar

Foi pesado 20,5 gramas do meio de cultura desidratado que logo em seguida foi dissolvido em 1000 mL de água deionizada fria. Após isso, a mistura foi aquecida, sendo frequentemente homogeneizada com bastão de vidro até que a dissolução do meio fosse completada, apresentando um aspecto translúcido. Posteriormente, o meio foi distribuído em tubos de cultura com tampa de rosca, sendo despejado

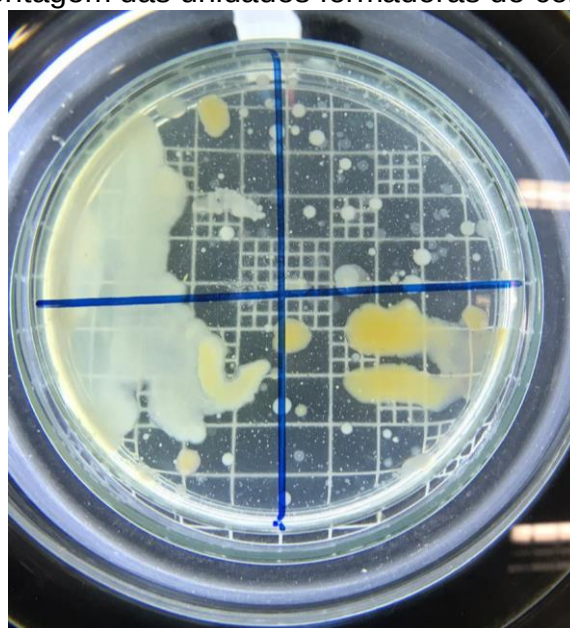
12 mL em cada tubo. Por fim, o meio foi esterilizado a 121 °C (1 Kg/cm² de pressão) em autoclave durante 15 minutos.

3.4.3.2. *Inoculação, incubação e contagem*

Os tubos de cultura foram deixados em banho-maria à 44-46 °C para que não se solidificassem. Então, foram adicionados nas placas de Petri esterilizadas: 1 mL de amostra (diluída se necessário) e o conteúdo de um tubo de ensaio. As placas foram agitadas delicadamente com movimentos que se assemelham ao número 8, isso serve para diluição e homogeneização total da amostra no meio de cultura.

O meio contendo a amostra foi então incubado à 35,0 ± 0,2 °C por 48 horas. Ao final, foi possível observar a presença de colônias e realizar a contagem das tais (Figura 3). Os resultados foram expressos e definidos pelas unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) multiplicado pelo valor da diluição.

Figura 3: contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).



Fonte: autora, 2020.

3.5. Procedimento Analítico

3.5.1. Demanda química de oxigênio (DQO)

De acordo com APHA (2012), a determinação prévia da Demanda Química de Oxigênio (DQO) da amostra é um indicativo apropriado para se obter a melhor diluição para uma dada amostra. Devido a isto, a metodologia da DQO, então, utiliza um termo-digestor a 150°C por 2 horas, com posterior leitura em espectrofotômetro. Para cada coluna é colocado 2 mL de amostra, 1,2 de solução digestora e 2,8 de solução catalítica. Seguindo a metodologia, os testes são feitos em duplicata.

Para as análises de DQO, foi elaborada a equação de análise através da montagem da curva padrão com o uso de uma solução de Biftalato de potássio. A Figura 4 representa as amostras de DQO após saírem do termo-digestor.

Figura 4: amostras de DQO após saírem do termo-digestor.



Fonte: autora, 2020.

3.5.2. Preparo de reagentes

As soluções Digestora e Catalítica são preparadas da seguinte maneira:

- Solução Digestora: 10,216 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) de grau padrão primário (previamente seco em estufa a $150^\circ C$ por 2 horas), são colocados em 500 mL de água destilada. A mistura é solubilizada com a lenta adição de 167 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Então, é adicionado 33,3 g de sulfato de mercúrio ($HgSO_4$), que é diluído em 1000 mL de água destilada e dissolvido em temperatura ambiente.
- Solução Catalítica: é pesado 5,5g de Ag_2SO_4/kg de H_2SO_4 (Sulfato de prata/kg de ácido sulfúrico). O H_2SO_4 é adicionado lentamente ao Ag_2SO_4 .
- Solução padrão de Biftalato de potássio: 0,8535 g do sal é dissolvido em água destilada e transferido para um balão volumétrico, onde o volume da solução é completado a 1000 mL. Esta solução equivale a uma DQO de 500 mg/L O_2 .

3.5.3. Curva padrão e equação padrão

Como já foi citado anteriormente, a solução padrão de Biftalato de potássio representa uma DQO de 500 mg/L O_2 . Com disso, a curva foi elaborada a partir dos valores médios de leitura de DQO para o ajuste do método, definindo, além do ponto branco já presente nele, os pontos de 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L O_2 , sendo esta a faixa da curva.

Para a validação do método, a curva após ser confeccionada em software deve apresentar o R^2 mais próximo possível de 1.

A equação obtida foi: $(DQO = (2900.8 * DQO(I)) - 0.2181)$, onde $DQO(I)$ representa o valor apresentado pela leitura no aparelho responsável pela medição.

3.6. Teste de ecotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca Sativa*)

O teste de ecotoxicidade teve como objetivo observar como se seguiu o crescimento vegetal no decorrer do experimento, e através disso, analisar se houve ou não o processo de biodegradação. A semente utilizada como bioindicador foi a de alface manteiga, que porta o nome científico de *Lactuca sativa*. A escolha de tal espécie se deu por se tratar de uma alternativa simples, de baixo custo e de sensibilidade satisfatória na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos (INAZAKI, 2001).

Os ensaios realizados em duplicata, abrangeram sete tipos de tratamento: o controle (sem adição de gasolina), controle negativo (água deionizada), e os que continham 100, 250, 500, 1000 e 1500 μL de gasolina. Foram utilizadas ao todo 14 placas de Petri, contendo papel filtro e 20 sementes em cada uma. As sementes foram arranjadas em fileiras de 6, 4 e 3 sementes, como é ilustrado na Figura 5, de modo que houvesse espaço suficiente para o crescimento das plântulas. As placas de Petri contendo as sementes, então, foram umedecidas com 4 mL de água proveniente de cada coluna.

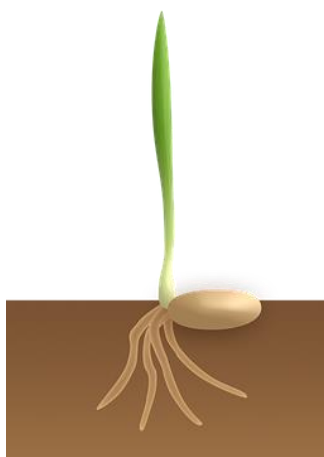
Figura 5: disposição das sementes na placa de Petri.



Fonte: autora, 2020.

Depois de montadas, as placas foram vedadas por plástico-filme PVC com o intuito de manter preservada a umidade dentro das placas, e também, cobertas com papel alumínio para que não houvesse interferência luminosa na germinação. Os ensaios foram incubados a 22 ± 1 °C por 120 horas. A Figura 6 representa uma plântula germinada.

Figura 6: representação do hipocótilo e raiz de uma planta.



Autor: desconhecido.

A Tabela 1 apresenta de forma simplificada o conteúdo de todos os ensaios realizados no teste de ecotoxicidade.

Tabela 1: conteúdos dos ensaios de ecotoxicidade da gasolina.

ANTES E DEPOIS DA BIODEGRADAÇÃO		
ENSAIOS		CONTEÚDO
Controle	C1	4 mL de água da coluna + 20 sementes
	C2	
Controle negativo	CN1	4 mL de água deionizada + 20 sementes
	CN2	
100 µL	A1	4 mL da água da coluna com contaminante + 20 sementes
	A2	
250 µL	B1	4 mL da água da coluna com contaminante + 20 sementes
	B2	
500 µL	C1	4 mL da água da coluna com contaminante + 20 sementes
	C2	
1000 µL	D1	4 mL da água da coluna com contaminante + 20 sementes
	D2	
1500 µL	E1	4 mL da água da coluna com contaminante + 20 sementes
	E2	

Fonte: autora, 2020.

3.6.1. Germinação das sementes

Sob a posse dos dados adquiridos por meio dos ensaios, foram calculados o índice de crescimento radicular (ICR) e o índice de germinação (IG) com o auxílio das fórmulas:

- i. Equação de índice de crescimento radicular:

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

Onde:

- ICR: índice de crescimento;
- CRA: comprimento da radícula;
- CRC: comprimento da radícula no controle negativo.

ii. Equação de índice de germinação:

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

Onde:

- IG: índice de germinação;
- ICR: índice de crescimento;
- SGA: número de sementes germinadas na amostra;
- SGC: número de sementes germinadas no controle negativo.

3.6.2. Toxicidade do contaminante

Os parâmetros utilizados para avaliação de toxicidade das amostras, segue o mesmo padrão utilizado por Young et. al. (2012), que classifica os valores de ICR de acordo com os efeitos de toxicidade observados:

- Inibição do crescimento da raiz: $0 < x < 0.8$
- Sem efeitos significativos: $0.8 \leq x \leq 1.2$
- Estimulação do crescimento da raiz: $x > 1.2$

Onde x representa o valor obtido no ICR.

Sementes que não atingiram 5 mm foram consideradas mortas.

3.7. Tratamento e análise de dados

Os dados referentes a coluna de Winogradsky foram tabelados com o intuito de oferecer uma melhor análise comparativa entre as diferentes concentrações do contaminante. Os gráficos apresentados foram confeccionados pelo software ORIGIN 6.0.

4. TRATAMENTO E DESCARTE DE RESÍDUOS DA PESQUISA

Todos os resíduos químicos gerados durante a pesquisa foram levados para a área de resíduos do Departamento de Biologia Geral e Aplicada em frascos devidamente rotulados. Os mesmos serão acumulados no local.

Os resíduos biológicos foram eliminados por meio da autoclave.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Aspectos das colunas de Winogradsky

Nos primeiros dias as colunas apresentaram uma coloração marrom, com sub tons que variavam de alaranjado à amarelado (Figura 7). Com a constante exposição à luz solar ao longo das semanas em que se transcorreu o experimento, suas colorações foram se transformando em esverdeadas.

Figura 7: colunas de Winogradsky (dia 0).



Fonte: autora, 2020.

5.2. pH e condutividade elétrica

Como é possível observar na Tabela 2, o pH demonstrou certo aumento, variando entre 6,24 e 8,90. Isso pode ser relacionado à formação de biossurfactantes produzidos por bactérias. Biossurfactantes são compostos de origem microbiana detentores das capacidades de alta

emulsificação e diminuição da tensão superficial (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

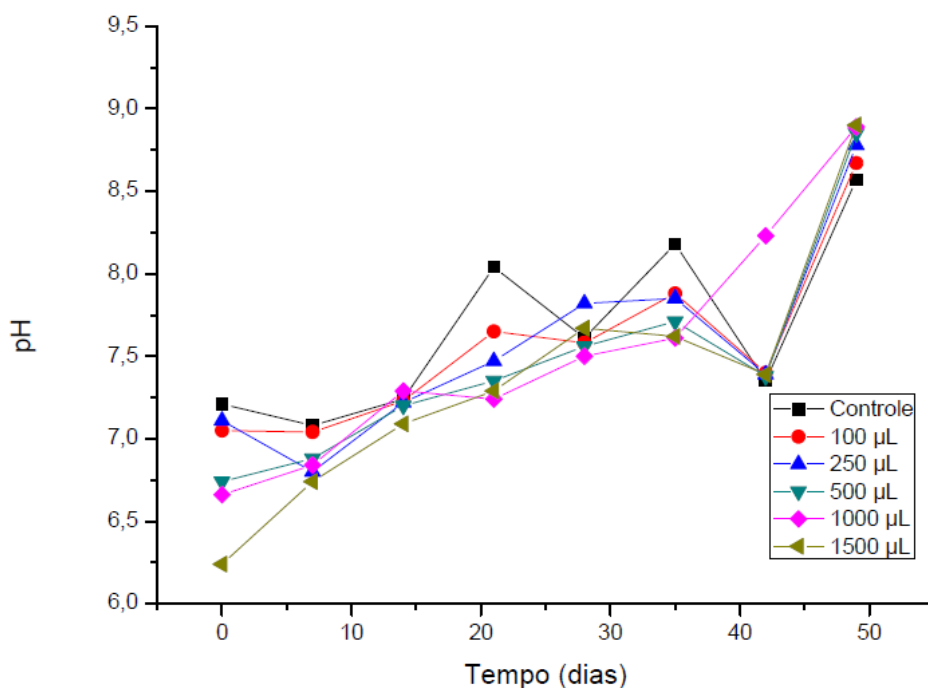
Com a emulsificação da gasolina são formadas moléculas com maior número de íons hidroxilas (OH^-), e isto levou ao aumento de pH. A Figura 8 demonstra visualmente os dados referentes à variação do pH, presentes na Tabela 2.

Tabela 2: resultados da medição do pH em relação ao tempo.

Tempo (dias)	pH					
	Controle	100 μL	250 μL	500 μL	1000 μL	1500 μL
0	7,21	7,05	7,11	6,74	6,66	6,24
7	7,08	7,04	6,80	6,88	6,84	6,74
14	7,24	7,23	7,22	7,20	7,29	7,09
21	8,04	7,65	7,47	7,35	7,24	7,29
28	7,61	7,58	7,82	7,56	7,50	7,67
35	8,18	7,88	7,85	7,71	7,61	7,62
42	7,35	7,40	7,39	7,38	8,23	7,39
49	8,57	8,67	8,78	8,85	8,89	8,90

Fonte: autora, 2020.

Figura 8: Variação do pH em relação ao tempo.



Fonte: autor, 2020.

Os valores referentes a condutividade elétrica variaram entre 1,68 e 6,14. Ao analisar e comparar os resultados expostos na Tabela 3, é possível perceber que os valores mais baixos se encontram na marcação de tempo 0 dias. No sétimo dia é possível observar um aumento expressivo na condutividade, que se mantém constante, variando minimamente até o fim do experimento. A variação da condutividade pode ser conferida na Figura 9.

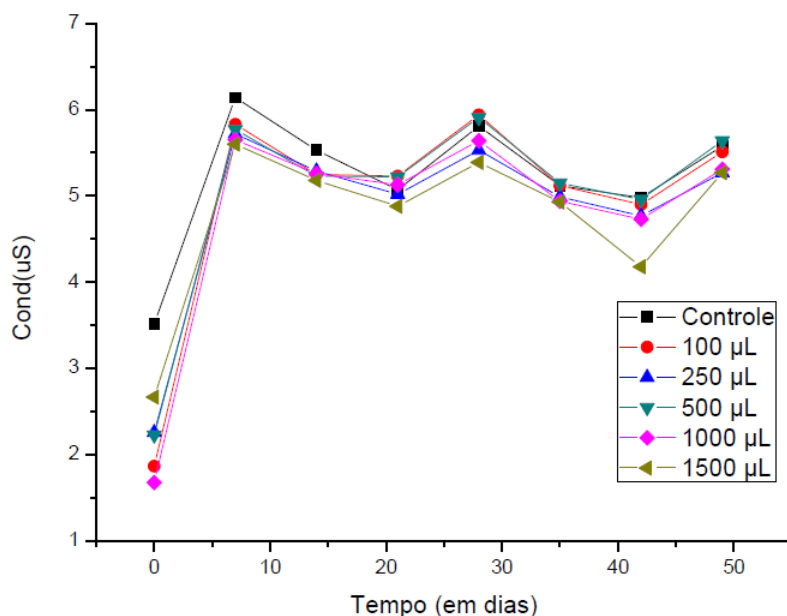
Tal fato ocorreu devido a biodegradação de compostos de hidrocarbonetos presentes na gasolina, os quais foram quebrados em moléculas menores formando moléculas-íons, e consequentemente aumentando a condutividade.

Tabela 3: resultados da medição da condutividade elétrica em relação ao tempo.

Condutividade (uS)						
Tempo (dias)	Controle	100 µL	250 µL	500 µL	1000 µL	1500 µL
0	3,52	1,87	2,26	2,23	1,68	2,67
7	6,14	5,83	5,72	5,77	5,65	5,60
14	5,53	5,25	5,29	5,23	5,26	5,18
21	5,07	5,23	5,02	5,22	5,13	4,88
28	5,81	5,94	5,53	5,91	5,64	5,39
35	5,12	5,12	4,99	5,15	4,94	4,93
42	4,98	4,90	4,77	4,96	4,73	4,18
49	5,58	5,51	5,27	5,64	5,31	5,27

Fonte: autora, 2020.

Figura 9: Variação da condutividade elétrica em relação ao tempo.



Fonte: autora, 2020.

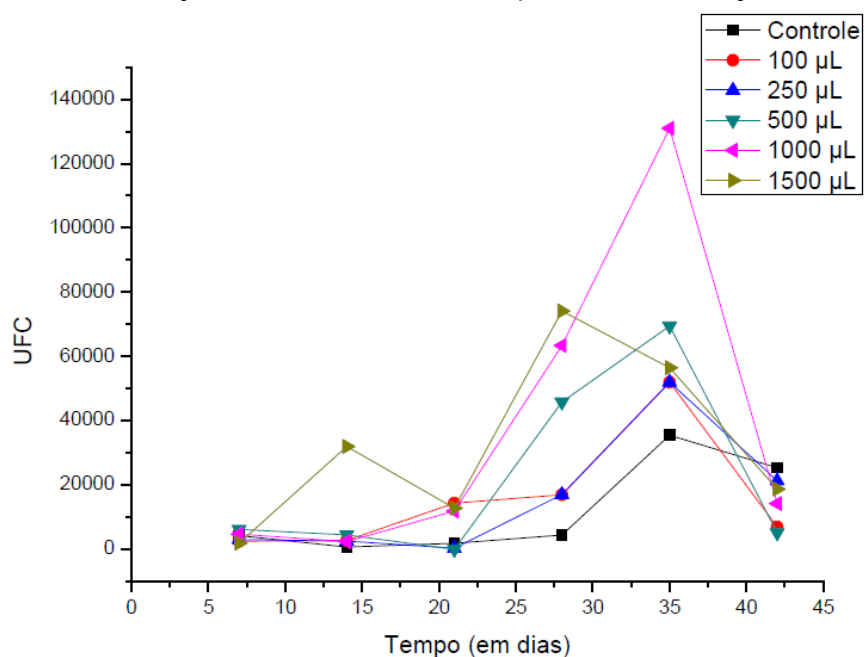
5.3. Teste microbiológico (PCA)

Os dados referentes ao teste microbiológico começaram a ser contabilizados a partir do 7º dia após a montagem da coluna de Winogradsky. Neste dia, como mostra a Tabela 4, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) das diferentes concentrações de gasolina variou entre 1.940 e 6.220 UFC. Tratando de forma breve e geral, no começo do experimento não se nota crescimento significativo; logo em seguida houve um crescimento considerável e depois, um ligeiro decaimento no número de UFC (Figura 10).

Tabela 4: resultados da medição de UFC por mL em relação ao tempo.

Tempo (dias)	UFC/mL (PCA)					
	Controle	100 µL	250 µL	500 µL	1000 µL	1500 µL
7	4280	2540	3080	6220	4740	1940
14	750	2800	2600	4500	2450	32000
21	1905	14385	375	10	11910	12805
28	4450	17000	17050	45850	63400	74150
35	35500	52000	52000	69500	131000	56500
42	25400	7000	21350	5200	14250	18750

Fonte: autora, 2020.

Figura 10: variação no número de UFC por mL em relação ao tempo.

Fonte: autora, 2020.

O quadro de crescimento microbiano nas UFC se deve ao aumento do número de bactérias durante o consumo do substrato. Uma alta disponibilidade de nutrientes cria condições ideais para que as bactérias se reproduzam. O decréscimo de UFC apresentado na última semana das colunas, indica a diminuição da concentração de substrato disponível para consumo, o que consequentemente leva a diminuição no número de colônias.

5.4. Teste de demanda química de oxigênio (DQO)

A DQO apresentou oscilações nos resultados (Tabela 5), denotando aumentos e decréscimos durante as semanas e terminando o período de análises das colunas com a queda dos valores. Esse balanço, demonstrado na Figura 11, mostra que não houve formação expressiva de microrganismos fotossintéticos, uma vez que, se assim fosse, haveria aumento de matéria orgânica ao longo do experimento devido a ação fotossintética. Um dos fatores que interfere na produção de biomassa é a influência de outros microrganismos no local (OLIVEIRA, 2013).

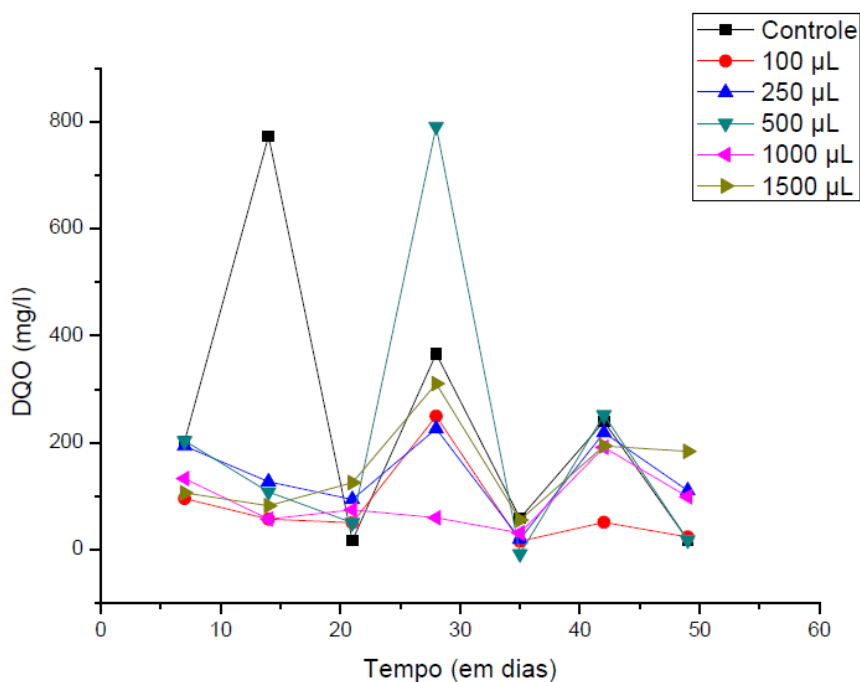
A diminuição da DQO revela a posição sobressalente de microrganismos aeróbios e anaeróbios ante os fotossintéticos, indicando que estes atuaram com maior intensidade. Enquanto metabolizavam a matéria orgânica presente no substrato da coluna e concomitantemente faziam seu processo de respiração, as bactérias consequentemente acabaram liberando biomassa, água e gás carbônico (CO_2) – em caso de respiração aeróbia –, e talvez gases metano (CH_4), sulfídrico (H_2S) e amônia (NH_3) – que são normalmente liberados na respiração anaeróbia (SOUZA, 1984; BARÃO, 2014).

Existe a possibilidade de ter ocorrido a formação de organismos fotossintéticos, dado que a coluna foi adquirindo ao decorrer do tempo uma coloração esverdeada; contudo, o crescimento de organismos aeróbios e anaeróbios podem ter suplantado o crescimento dos microrganismos fotossintéticos, diminuindo de tal forma a matéria orgânica.

Tabela 5: resultados da medição da DQO em relação ao tempo

Tempo (dias)	DQO (mg/L)					
	Controle	100 µL	250 µL	500 µL	1000 µL	1500 µL
7	202,83	95,33	193,66	203,66	132,83	106,16
14	772,83	57	127	107,83	57	82
21	17	50,33	93,66	50,33	74,5	125,33
28	366,16	249,5	226,16	791,16	59,5	310,33
35	58,66	15,33	19,5	-8	31,16	55,33
42	239,5	51,16	218,66	252	191,16	193,66
49	17,83	23,66	110,33	17,83	98,66	183,66

Fonte: autora, 2020.

Figura 11: variação da DQO em relação ao tempo

Fonte: autora, 2020.

5.5. Teste de ecotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Os testes de ecotoxicidade foram efetuados em dois momentos ao longo do experimento: uma vez no início e outra no final. O teste corresponde aos cálculos do Índice de Crescimento Radicular (ICR) e do

Índice de Germinação (IG), cuja função é mostrar se as sementes demonstraram crescimento.

Para cada ensaio foram obtidas as médias de crescimento referentes ao hipocótilo e à raiz, e a partir delas foram calculados o ICR e o IG. O número de sementes cujo crescimento radicular não atingiu 5 mm também foi contabilizado; essas sementes foram consideradas mortas. Os resultados estão expostos nas Tabelas 6 e 7. A Figura 12 mostra o exemplo de uma plântula considerada germinada.

Figura 12: medição do hipocótilo.



Fonte: autora, 2020.

Com base nos resultados do índice de crescimento radicular (ICR), que expressam o nível de toxicidade da gasolina sobre as sementes, pode-se dizer que o contaminante inibiu o crescimento radicular da plântula.

Com exceção da amostra de 1500 μ L do primeiro ensaio, que obteve um valor considerado Sem Efeitos Significativos, todos os outros valores, de ambos os ensaios, apresentaram valores abaixo de 0.8, demonstrando a interferência da gasolina no crescimento da radícula.

Tabela 6: resultados do teste de ecotoxicidade do início do experimento.

Início do Experimento					
Colunas	Comprimento Médio da Radícula (cm)	Comprimento Médio do Caule (cm)	Número De Mortes	ICR	IG
Controle	0,84	1,645	6	0,510	40,26
100 µL	1,54	2,61	1	0,590	59
250 µL	1,385	2,505	0	0,552	58,10
500 µL	1,155	2,01	2	0,554	52,48
1000 µL	1,245	2,81	3	0,443	39,63
1500 µL	1,955	2,105	1	0,928	92,8

Fonte: Autora, 2020.

Tabela 7: resultado resultados do teste de ecotoxicidade do final do experimento.

Final do Experimento					
Colunas	Comprimento Médio da Radícula (cm)	Comprimento Médio do Caule (cm)	Número De Mortes	ICR	IG
Controle	0,465	0,755	10	0,615	48,32
100 µL	0,34	0,665	12	0,511	29,2
250 µL	0,485	0,965	8	0,502	43,02
500 µL	0,405	0,855	10	0,473	33,78
1000 µL	0,425	0,895	9	0,474	47,4
1500 µL	0,585	0,99	8	0,590	54,78

Fonte: Autora, 2020.

6. CONCLUSÃO

A um primeiro momento, a biodegradação da gasolina foi evidenciada pelo aumento do pH e da condutividade elétrica. O aumento do pH indica a presença de biossurfactantes, estes formados por bactérias com a função de emulsificar e solubilizar hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, propiciando assim o crescimento de microrganismos em substratos onde tais compostos estão presentes. A emulsificação do contaminante desencadeou a formação de hidroxilas, que consequentemente, aumentaram o pH.

Esse evento é ainda atestado pelo crescimento bacteriano nas UFC no início no experimento, e o decréscimo de UFC na semana final das colunas. Houve um aumento no número de bactérias durante o período em que elas tiveram abundância de substrato. Com a diminuição deste, houve redução no número de microrganismos pois pararam de se dividir, apresentando em seguida uma queda em sua quantidade de UFC.

A DQO também apresentou uma queda, denotando a não formação de microrganismos fotossintéticos. Se houvesse a presença de tal grupo na coluna, seria notado o aumento de matéria orgânica, que consequentemente aumentaria os valores da DQO. Todavia, para reiterar tal constatação com segurança seria necessário a elaboração de testes fotossintéticos, como o teste clorofila, que evidencia a presença das clorofilas a e b.

O teste de ecotoxicidade acusou a toxicidade da gasolina, que atuou como inibidor no crescimento radicular das plântulas, interferindo em seu desenvolvimento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**. 22nd edn. American Public Health Association, Washington, DC, 2012.

BARÃO, Luigi Zanatta. **Avaliação Inicial de Lagoas de Lemnas com Chicanas na Remoção de DQO e Fósforo de Efluentes Domésticos e na Fixação de CO₂**. 2014. 77 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento de Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Contagem padrão de colônias de bactérias: Método de ensaio**. Bnh/Abes/Cetesb: São Paulo, 2006 (Norma Técnica L5.201).

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. **Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave?**. Engenharia Sanitária, v. 2, p.50-54, 1997.

GOMES, A. **Utilização da Coluna de Winogradsky para a demonstração do efeito dos metais pesados na microbiota oxidante de enxofre em ambientes aquáticos: Uma abordagem experimental**. Cadernos UniFOA, edição n. 16, p. 22, 2011.

GRYCZAK, M.; KILIPPER, J. T.; COSTA, P. D. DE; MACCARI, A.; 2018. Sementes de *Lactuca Sativa* como bioindicador de toxicidade em resíduos de construção civil. *Revista Tecnologia e Ambiente*, v. 24, p. 233–242.

INAZAKI, T. H.; PIAO, A. C. S.; BIDOIA, E. D.; RÉGIS, G.; ANGELIS, D. F. **Teste de toxicidade utilizando sementes de *Eruca sativa***. *Arquivo Instituto Biológico*, v. 68, 2001.

MAGALHÃES, Danielly de Paiva; FERRÃO FILHO, Aloysio da Silva. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. *Oecol. Bras.*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MORALES, Daiana de Lima. **Biodegradação da fração BTX e Etanol da Gasolina Comercial e da Gasolina Pura por microrganismos isolados de locais impactados**. 2008. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 772-776, set. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000500013>.

OLIVEIRA, Amanda Cristina de. **PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS *Scenedesmus* sp. EM EFLUENTE DE BOVINOCULTURA BIODIGERIDO**. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

POWLEY, Mark W; CARLSON, Gary P. Species comparison of hepatic and pulmonary metabolism of benzene. **Toxicology**, [S.L.], v. 139, n. 3, p. 207-217, dez. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x\(99\)00134-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x(99)00134-1).

RAIKHLIN-EISENKRAFT, Bianca; HOFFER, Erica; BAUM, Yelena; BENTUR, Yedidia. Determination of Urinary Hippuric Acid in Toluene Abuse. **Journal Of Toxicology: Clinical Toxicology**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 73-76, jan. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/clt-100102883>.

SANTOS, Ruy Carlos Ferreira dos. **IMPACTO DO ETANOL NA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROCARBONETOS MONO AROMÁTICOS EM AQUÍFEROS CONTAMINADOS POR DERRAMAMENTO DE GASOLINA**. 1996. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências em Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

SILVA, Rosimar Lima Brandão; BARRA, Cristina Maria; MONTEIRO, Teófilo Carlos do Nascimento; BRILHANTE, Ogenis Magno. **Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil**. Cadernos de Saúde Pública, [s.l.], v. 18, n. 6, p.1599-1607, dez. 2002. FapUNIFESP (SciELO).

SOUZA, Marcos Eduardo de. Fatores que Influenciam a digestão anaeróbia. **Revista Dae**, [S.L.], v. 44, n. 137, p. 88-94, jun. 1984.

YOUNG, Brian Jonathan; RIERA, Nicolás Iván; BEILY, María Eugenia; BRES, Patricia Alina; CRESPO, Diana Cristina; RONCO, Alicia Estela. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 76, p. 182-186, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019>.