
ECOLOGIA

MARIA CAROLINA ARNOLD GIACOMINI

**ESTUDO DE MONITORAMENTO DA BIOTA EM
COLUNAS DE WINOGRADSKY
CONTAMINADAS COM ÓLEO DIESEL PURO**

**Rio Claro
2022**

MARIA CAROLINA ARNOLD GIACOMINI

ESTUDO DE MONITORAMENTO DA BIOTA EM COLUNAS DE
WINOGRADSKY CONTAMINADAS COM ÓLEO DIESEL PURO

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino 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 Ecóloga.

Rio Claro - SP

2022

G429e	Giacomini, Maria Carolina Arnold Estudo de monitoramento da biota em colunas de Winogradsky contaminadas com óleo diesel puro / Maria Carolina Arnold Giacomini. -- Rio Claro, 2022 50 f. : il., tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Ederio Dino Bidoia 1. Ecologia aquática. 2. Biorremediação. 3. Diesel. 4. Toxicologia. 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.

MARIA CAROLINA ARNOLD GIACOMINI

**ESTUDO DE MONITORAMENTO DA BIOTA EM COLUNAS
DE WINOGRADSKY CONTAMINADAS COM ÓLEO DIESEL
PURO**

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 Ecóloga.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia (orientador)

M. Sc. Carolina Rosai Mendes

Dr. Pedro Henrique Mainardi

Aprovado em: 04 de Fevereiro de 2022



Assinatura do(a) discente



Assinatura do(a) orientador(a)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer os meus pais pelo apoio e incentivo durante todos os anos de graduação e por terem me dado a chance de poder realizar meu sonho de cursar uma faculdade pública, na área em que sempre gostei. Ao meu namorado Pedro e a nossa cachorrinha Bulma por estarem ao meu lado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço também ao meu orientador Ederio, pela paciência e por ter me dado a oportunidade de realizar este projeto de pesquisa em seu laboratório. Aos colegas de laboratório Vinícius e Carol, muito obrigada pela ajuda de sempre desde o início da minha pesquisa. Agradeço também a Graziela por ter me ajudado com as dúvidas durante todo o início do meu projeto.

Agradeço aos meus professores de graduação, por terem me ajudado a crescer profissionalmente, e a toda turma da Ecologia 017, pelos momentos que passamos juntos. A todos os amigos que conviveram comigo durante estes 5 anos de permanência em Rio Claro, sou muito grata por tudo.

A todas as pessoas que colaboraram para a minha formação de alguma forma, agradeço.

RESUMO

A utilização do petróleo na alta atividade industrial é um dos principais fatores que colaboram para a liberação de produtos petroquímicos no ambiente, favorecendo a contaminação de diversos ecossistemas, principalmente os marinhos. Derivados do petróleo, como o óleo diesel, são amplamente utilizados sobretudo no setor automobilístico, e possuem um grande potencial poluidor e alta toxicidade, gerando grandes preocupações quando são liberados no ambiente. Sendo assim, técnicas de biorremediação são empregadas para degradar os poluentes dispersos no ambiente, pois consiste em uma alternativa viável e de baixo custo. O presente trabalho teve como objetivo analisar e monitorar a microbiota aquática contaminada com diferentes concentrações de óleo diesel puro, através de Colunas de Winogradsky, ao longo de 60 dias. Os ensaios com as colunas foram feitos em duplicata (ensaios A e B) e receberam os seguintes tratamentos: 0, 1, 5 e 10 mL do contaminante. Foram feitas análises de pH, condutividade, biomassa clorofilada, quantidade de bactérias heterotróficas, além de testes ecotoxicológicos utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula). Foi possível constatar que mesmo na presença do contaminante houve o crescimento de organismos fotossintetizantes e da biomassa de clorofila a. Contudo, o óleo diesel influenciou na quantidade do pigmento fotossintético conforme o aumento de sua concentração. Além disso, o contaminante se mostrou prejudicial para a germinação de sementes, principalmente nos ensaios com alface. De modo geral, pode-se afirmar que em altas concentrações, o óleo diesel puro é nocivo para o ambiente, uma vez que a partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível constatar alterações na biota aquática.

Palavras-chave: Óleo diesel; Contaminante; Colunas de Winogradsky; Toxicidade.

ABSTRACT

The utilization of petroleum in the high industrial activity is one of the main factors which collaborate for the release of petrochemicals into the environment, promoting contamination of diverse ecosystems, mainly the marine ones. Petroleum derivatives, such as diesel, which are broadly employed especially in the automotive industry present not only great polluting potential, but also high toxicity, generating great concern whenever released in the environment. Being so, bioremediation techniques are employed in order to degrade dispersed pollutants in the environment, bringing to attention that such techniques consist of a viable low-cost alternative. This study had the objective of analyzing and monitoring the contaminated aquatic microbiota, with different concentrations of pure diesel oil, using Winogradsky Columns, during a time period of 60 days. The experiments with the columns were performed in duplicates (experiments A and B), and received the following treatment: 0, 1, 5 and 10 mL of the contaminant. Analysis of pH, conductivity, chlorophyll biomass, quantity of heterotrophic bacteria were performed, in addition to ecotoxicological tests using seeds of *Lactuca sativa* (lettuce) and *Eruca sativa* (arugula). It was possible to verify that even in the presence of the contaminant, there was growth of both the photosynthesizing organisms and chlorophyll biomass. However, the diesel influenced the photosynthetic pigment quantity, according to the increase of its concentration. Furthermore, the contaminant demonstrated to be harmful regarding seed germination, mainly in the experiments with lettuce. In conclusion, it may be generally assumed that in high concentrations, pure diesel oil is harmful to the environment, given that the results obtained from this study make it possible to verify alterations in the aquatic biota.

Key words: Diesel oil; Contaminant; Winogradsky columns; Toxicity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 <i>Objetivo geral</i>	<i>11</i>
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>11</i>
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 <i>Petróleo</i>	<i>12</i>
3.2 <i>Óleo diesel</i>	<i>13</i>
3.3 <i>Biorremediação e Biodegradação</i>	<i>14</i>
3.4 <i>Coluna de Winogradsky.....</i>	<i>16</i>
3.5 <i>Ecotoxicologia</i>	<i>17</i>
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 <i>Coleta.....</i>	<i>19</i>
4.2 <i>Local dos experimentos</i>	<i>19</i>
4.3 <i>Coleta do poluente</i>	<i>19</i>
4.4 <i>Montagem das colunas de Winogradsky</i>	<i>19</i>
4.5 <i>Análises físico-químicas</i>	<i>20</i>
4.6 <i>Análises microbiológicas.....</i>	<i>21</i>
4.6.1 <i>Preparo da água de diluição</i>	<i>22</i>
4.6.2 <i>Preparo do meio de cultura Plate Count Agar</i>	<i>23</i>
4.6.3 <i>Diluição seriada e inoculação das placas</i>	<i>23</i>
4.6.4 <i>Contagem de UFCs.....</i>	<i>24</i>
4.7 <i>Teste de pigmento fotossintético: clorofila a</i>	<i>25</i>
4.8 <i>Ensaio de fitotoxicidade com sementes de L. sativa e E. sativa.....</i>	<i>27</i>
4.9 <i>Tratamento e descarte de resíduos da pesquisa</i>	<i>29</i>
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 <i>Colunas de Winogradsky.....</i>	<i>30</i>
5.2 <i>pH e condutividade elétrica</i>	<i>33</i>
5.3 <i>Bactérias heterotróficas.....</i>	<i>36</i>
5.4 <i>Extração de clorofila a</i>	<i>37</i>
5.5 <i>Ecotoxicidade em sementes de L. sativa (alface) e E. sativa (rúcula)</i>	<i>39</i>
5.5.1 <i>Análise da porcentagem de germinação relativa</i>	<i>39</i>
5.5.2 <i>Análise da porcentagem de elongação radicular</i>	<i>42</i>
5.5.3 <i>Análise da porcentagem do índice de germinação</i>	<i>43</i>

6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento industrial e econômico impulsionou a expansão da indústria petrolífera no mundo. No entanto, a utilização em larga escala desse recurso energético trouxe sérios problemas de contaminação para o meio ambiente (DUARTE, 2016). O petróleo é composto principalmente por hidrocarbonetos e suas características físicas e químicas variam de acordo com sua origem. Alguns de seus componentes, como Benzenos, Toluenos, Etilbenzenos e Xilenos (BTEX), possuem grande destaque devido a seu potencial poluidor e são descritos como carcinogênicos e mutagênicos (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Essas moléculas são contaminantes recalcitrantes, o que leva a uma preocupação global em relação ao tema.

O petróleo cru exige um processo de refino do qual se obtém subprodutos como o óleo diesel, que é constituído por hidrocarbonetos e possui um alto teor de enxofre (DUARTE, 2016). Segundo a ANEEL (2008), o óleo diesel representa 35% do total dos principais derivados do petróleo, sendo o restante composto por gasolina (20%), não energéticos (16%), óleo combustível (14%), GLP (11%) e outros energéticos (4%). O setor automobilístico a diesel possui grande importância econômica para o Brasil, uma vez que representa a maior parte da frota do transporte rodoviário (LIMA, 2001).

Acidentes com óleo diesel e outros subprodutos do petróleo acabam se tornando um evento comum, por serem amplamente utilizados e acarretam impactos negativos ao meio ambiente. Diversos ecossistemas sofrem influência das atividades petrolíferas. Porém, devido aos maiores campos de extração de petróleo se situarem em áreas costeiras, esses ambientes se tornam mais propensos à contaminação (ARAÚJO *et al.*, 2014). Outro problema ambiental frequente são os vazamentos dos tanques de armazenamento em postos de combustíveis, podendo gerar sérios danos ambientais, como por exemplo a contaminação das águas subterrâneas e do solo, o que afeta a qualidade dos recursos hídricos (CETESB, 2011).

Em 1994, ocorreu na cidade de Santa Bárbara d'Oeste (SP), um vazamento no tanque de armazenamento subterrâneo de óleo diesel em um posto local de gasolina. Entretanto, os trabalhos de avaliação do impacto ambiental só começaram a ser desenvolvidos em 1999 (MARIANO; ANGELIS; BONOTTO, 2007). Em 2007, foi realizado um estudo nessa mesma região e constataram a presença de BTEX nas águas subterrâneas, sugerindo que os hidrocarbonetos retidos ou adsorvidos no solo continuam sendo uma fonte de contaminação crônica na área (MARIANO; ANGELIS; BONOTTO, 2007). A fim de conter as contaminações ocasionadas pelo óleo diesel e outros derivados do petróleo, muitos estudos vêm sendo

desenvolvidos envolvendo processos de biorremediação, que consiste em uma técnica baseada na utilização de microrganismos para degradar os poluentes dispersos no ambiente (WATANABE, 2001).

A biodegradabilidade em ecossistemas aquáticos tem como propósito avaliar o tempo de degradação e o grau de toxicidade para a biota. A utilização da coluna de Winogradsky, simulando um ecossistema aquático avalia processos de biodegradação. É uma técnica que permite o monitoramento biológico e avalia as mudanças que ocorrem no ambiente através do desenvolvimento das comunidades de microrganismos (SHINZATO, 2015). Essa técnica tem ganhado atenção devido a seu baixo custo e a possibilidade de execução em lugares de difícil acesso (TERAMAE, 2011). Para a montagem da coluna são colocadas amostras de água e solo do ambiente que se pretende analisar, e então, a mesma é exposta à luz solar ou artificial. O desenvolvimento dos microrganismos se dá de forma estratificada após algumas semanas, de acordo com as condições ambientais que ali se estabeleceram (GAMAZO; LÓPEZ-GOÑI; DIAZ, 2005).

Testes ecotoxicológicos também podem ser realizados para verificar a qualidade ambiental. Sementes de alface (*Lactuca sativa*) e rúcula (*Eruca sativa*), por exemplo, podem ser usadas como organismos padrão de um grupo trófico para ensaios de toxicidade. Essa técnica apresenta baixo custo e alta sensibilidade para avaliar diferentes contaminantes. Dessa maneira, é possível avaliar a taxa de germinação das sementes em questão (SHINZATO, 2015). A determinação de clorofila a é uma análise que pode ser aplicada quando se trata de poluição em ecossistemas aquáticos. A clorofila é um pigmento responsável pela fotossíntese nas plantas, algas e cianobactérias. A partir dessa avaliação é possível verificar a quantidade de biomassa fitoplanctônica, que demonstra o crescimento das algas e cianobactérias (fitoplâncton). Portanto, sendo um indicativo importante para o estudo de avaliação de impacto de contaminantes (CETESB, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Utilizar a coluna de Winogradsky para avaliar a biodegradação e a toxicidade do óleo diesel puro em diferentes concentrações em um ambiente aquoso.

2.2 *Objetivos específicos*

- I. Avaliar as alterações na biota da coluna de Winogradsky contaminada por diferentes concentrações de óleo diesel;
- II. Avaliar fatores como pH e condutividade na coluna;
- III. Realizar a determinação de biomassa por clorofila a;
- IV. Verificar a toxicidade do óleo diesel na coluna de Winogradsky utilizando sementes de *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula);
- V. Acompanhar o crescimento de bactérias heterotróficas através do modo de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Petróleo

O uso do petróleo em construções, iluminação, pavimentação de estradas, e até mesmo em preservação de múmias, faz com que esse produto venha sendo utilizado desde os tempos pré-históricos para diversos fins. Além disso, é considerado como a principal fonte de energia da atualidade. É através do petróleo que se possibilita a realização de inúmeras atividades. Esse hidrocarboneto é utilizado na formação de combustíveis como: gasolina, gás natural, óleo diesel, óleo combustível e querosene. Uma infinidade de produtos também utiliza o petróleo como matéria-prima, como plásticos, tintas, borrachas sintéticas, cosméticos, entre outros que são provenientes da indústria petroquímica (MORAIS; CORIOLANO, 2016).

Apesar de todos os benefícios, o petróleo pode acarretar significativos problemas para o meio ambiente. Em sua composição há a presença de contaminantes como enxofre e metais pesados. A grande preocupação ocorre durante o transporte de combustível, quando há chances de vazamentos em grande escala de oleodutos e navios petroleiros (THOMAS, 2004). Os diversos impactos ambientais estão diretamente ligados ao setor petrolífero, causando a degradação ambiental por diversos fatores, como: derramamento de petróleo, desmatamentos que são oriundos devido a suas instalações, poluição do ar e descarte de resíduos (DA SILVA *et al.*, 2008).

O tratamento de áreas contaminadas por petróleo se torna complexo devido a sua composição diversificada. O petróleo é uma mistura complexa, formada a partir de vários compostos, sendo constituídos em grande parte por hidrocarbonetos. Porém, suas características físicas e químicas variam de acordo com sua origem (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Segundo Thomas (2004), a composição do petróleo pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição elementar do petróleo.

Elemento	% (m/m)
Hidrogênio	11,0 - 14,0
Carbono	83,0 – 87,0
Enxofre	0,006 – 8,0
Nitrogênio	0,11 – 1,7
Oxigênio	0,1 – 2
Metais	Até 0,3

Fonte: Adaptado de Thomas (2004).

O petróleo também é considerado como uma substância natural, podendo se apresentar nos estados físicos sólido, líquido ou gasoso. Os compostos presentes nos hidrocarbonetos podem produzir corrosividade, acidez, odor, poluentes e cor, sendo que os mais comuns são: água, asfaltenos, enxofre, nitrogênio, dióxido de carbono, oxigênio e compostos metálicos (CARDOSO, 2005).

Em 2014, considerando o cenário mundial, o petróleo e o gás natural corresponderam a 52,6% da matriz energética, segundo dados do Ministério de Minas e Energia (MME, 2015), atendendo o setor de transporte, industrial e geração de energia elétrica. Isso demonstra a grande dependência que a sociedade possui em relação a essas fontes energéticas, que acabaram se tornando indispensáveis nos tempos atuais (THOMAS, 2004). Porém, tal dependência gera diversos impactos ambientais, fazendo com que os governos de diversos países começassem a buscar outras fontes de energias alternativas (ANP, 2019).

Diante disso e dos problemas ocasionados pelo petróleo, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para solucionar a contaminação de áreas atingidas. Dentre elas, está a técnica de biorremediação, que é considerada como a mais viável economicamente e mais promissora para o tratamento de ambientes contaminados por petróleo e seus subprodutos (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

3.2 Óleo diesel

Derivado do petróleo, o óleo diesel é um combustível obtido a partir do processo de refino, sendo constituído principalmente por hidrocarbonetos alifáticos e em menor escala, contém átomos de enxofre, nitrogênio, oxigênio, metais, entre outros (MENEZES *et al.*, 2006; SOUZA, 2008). Devido a presença de compostos voláteis, alcanos e naftalenos, o óleo diesel acaba tornando-se potencialmente fitotóxico. A sua fitotoxicidade aumenta na seguinte ordem: gasolina, querosene, diesel e óleos pesados. Isso sugere que as frações mais leves do combustível geram menos danos às plantas se comparadas com as frações mais pesadas (CRAFTS; REIBER, 1948). Quando presente no solo, mesmo que em pequenas quantidades, o óleo diesel pode provocar um aumento na quantidade de microrganismos, uma vez que os hidrocarbonetos podem ser utilizados como fonte de carbono. Porém, quando em quantidades muito altas, a população de microrganismos pode diminuir, ocasionando uma alteração na composição das comunidades, e consequentemente dos processos microbianos, tais como atividades enzimáticas (MEYER, 2011).

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP), uma característica que é levada

em consideração para a classificação do óleo diesel é o seu alto teor de enxofre. A Resolução ANP nº 50/2013 (BRASIL, 2013) classifica os óleos diesel de uso rodoviário em:

- 1) Óleo diesel A: combustível produzido nas refinarias e nas centrais de matérias primas, sem adição de biodiesel;
- 2) Óleo diesel B: óleo diesel A adicionado de biodiesel, com concentração estabelecida pela legislação vigente.

Em relação ao máximo teor de enxofre, seguindo a nomenclatura estabelecida no Artigo 3º da Resolução ANP nº 65/2011 (BRASIL, 2011), os óleos diesel citados acima são classificados em:

- 1) Óleo diesel A S10 e B S10: teor máximo de enxofre de 10 mg/kg;
- 2) Óleo diesel A S50 e B S50: teor máximo de enxofre de 50 mg/kg;
- 3) Óleo diesel A S500 e B S500: teor máximo de enxofre de 500 mg/kg;
- 4) Óleo diesel A S1800 e B S1800: teor máximo de enxofre de 1800 mg/kg.

Após a revogação da lei acima, ficou estabelecido de acordo com a Resolução ANP nº 50/2013 (BRASIL, 2013) que os óleos diesel A e B devem apresentar as seguintes nomenclaturas, de acordo o teor máximo de enxofre:

- 1) Óleo diesel A S10 e B S10: teor máximo de enxofre de 10 mg/kg;
- 2) Óleo diesel A S500 e B S500: teor máximo de enxofre de 500 mg/kg.

Há uma grande preocupação quanto a liberação de enxofre na atmosfera, principalmente em relação a chuva ácida, uma vez que tal evento pode ocasionar danos à saúde, à agricultura e às construções. A fim de reduzir a emissão de material particulado, e consequentemente a poluição do ar, o diesel S1800 foi substituído pelo S500 e sua comercialização foi vetada em 2014. Já o diesel S50 foi substituído pelo S10 e deixou de ser comercializado em 2013. Todas as medidas foram tomadas devido às exigências estabelecidas pela Resolução nº 415/2009 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2009, DUARTE, 2016).

3.3 Biorremediação e Biodegradação

O processo de biorremediação consiste na utilização de microrganismos para degradar poluentes dispersos no ambiente (WATANABE, 2001). Geralmente, as bactérias são as mais empregadas nessa técnica, sendo consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem biodegradação de contaminantes. Esses microrganismos conseguem transformar contaminantes potencialmente perigosos em compostos menos danosos para o ser humano e para o meio ambiente (NRC, 1993).

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas *in situ*, ou seja, a remediação é feita diretamente no local da contaminação, ou *ex situ*, quando o material contaminado é removido e destinado ao local de tratamento (MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000). O processo *in situ* é o mais empregado no mundo, pois os custos de aplicação dessa técnica tendem a ser mais baixos e os impactos ambientais envolvidos são menores. Porém, apesar do processo *ex situ* causar mais impactos e gerar mais custos devido a remoção do material contaminado, essa técnica apresenta vantagens, pois há a possibilidade de controlar os fatores ambientais que estimulam a biodegradação (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; BOOPATHY, 2000).

Independentemente do local de aplicação, tanto a biorremediação como as demais técnicas de degradação, apresentam como objetivo principal a mineralização completa dos contaminantes. Ou seja, apresentar como produto final elementos que possuem pouca ou nenhuma toxicidade, como água e gás carbônico. Portanto, para que a biodegradação ocorra, os microrganismos devem estar ativos para que possam realizar suas tarefas, e assim, metabolizarem substâncias orgânicas, das quais se obtém nutrientes e energia (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

A biorremediação pode ocorrer de forma aeróbia ou anaeróbia, requerendo oxigênio ou hidrogênio, respectivamente. No processo aeróbio, o oxigênio atua como receptor de elétrons e o hidrocarboneto é oxidado devido a atuação de enzimas oxigenases. Já o processo anaeróbio requer um meio redutor, e só ocorre devido a ação de espécies doadoras de elétrons, sendo responsáveis pela degradação de poluentes halogênicos (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Para se aplicar qualquer método de biorremediação é necessário que seja feito um estudo criterioso prévio, considerando qual o tipo e a quantidade do poluente, os custos para implementá-lo e principalmente, a concentração final ao término do tratamento (MORAIS; CORIOLANO, 2016). Assim como outras técnicas, a biorremediação também apresenta suas vantagens e desvantagens no tratamento de contaminantes (Tabela 2).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da biorremediação (continua).

Vantagens
- A limpeza ocorre <i>in situ</i> , eliminando o transporte de resíduos perigosos e custos de responsabilidade;
- Resíduos orgânicos perigosos podem ser destruídos em vez de transferidos de uma fase para outra, eliminando assim a responsabilidade a longo prazo;
- Conta com processos de biodegradação endógenos que podem ser mais rápidos e mais baratos;
- Mínimo distúrbio ambiental e do solo;
- Pode ser usado em conjunto com outras tecnologias de tratamento.

Fonte: Adaptado de Decesaro (2013).

Tabela 2. Vantagens e desvantagens da biorremediação (continuação).

Desvantagens
- Alguns resíduos, como os metais pesados, não são eliminados pelos processos biológicos (embora muitos metais possam ser biorreduzidos ou bio-oxidados para menos tóxicos e formas menos móveis); - Pode requerer monitoramento extensivo; - Requisitos e eficiência de remoção podem variar consideravelmente de um local para o outro; - Alguns contaminantes podem estar presentes em altas concentrações que inibem os microrganismos; - Há um risco para acumulação de produtos tóxicos da biodegradação

Fonte: Adaptado de Decesaro (2013).

Através da ação enzimática de microrganismos presentes no ambiente, ocorre a biodegradação (ALEXANDER, 1981, ATLAS, 1981). Devido à habilidade em degradar uma ampla variedade de substâncias xenobióticas, as bactérias, fungos e leveduras são considerados como os principais agentes biotransformadores (URURAHY *et al.*, 1998). Por serem fontes de carbono, compostos derivados do petróleo e óleos vegetais estão sujeitos a tal processo. No entanto, a biodegradação de hidrocarbonetos complexos exige a cooperação de mais de uma espécie microbiana para que os compostos sejam completamente mineralizados. Dessa forma, associações microbianas permitem a degradação mais rápida de compostos mais complexos devido a uma capacidade enzimática mais ampla (GHAZALI *et al.*, 2004).

Aplicações de técnicas *in situ* de biorremediação já foram realizadas em casos de derramamento de petróleo. Em 1989, o navio petroleiro Exxon Valdez despejou 37 mil toneladas de óleo na região costeira do Alasca. Por meio da técnica de bioestimulação foi possível acelerar o desenvolvimento e a atividade da microbiota local através da aplicação de nutrientes, resultando na biodegradação do óleo na região contaminada (FUENTES *et al.*, 2014).

Sendo assim, em seu sentido amplo, a biodegradação ambiental mostra-se como uma alternativa viável na aplicabilidade de técnicas de remediação, abrangendo aspectos socioeconômicos relevantes (MELO *et al.*, 2001), além de ser uma ferramenta de menor impacto ambiental e com um maior custo-benefício (DUARTE, 2016).

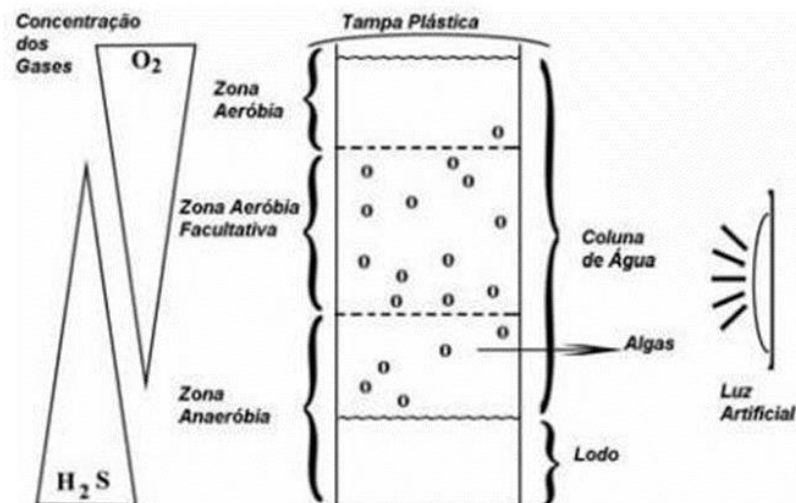
3.4 Coluna de Winogradsky

Muito utilizada em estudos de contaminação aquática, a coluna de Winogradsky foi criada em 1880, pelo microbiologista Sergei Winogradsky. A coluna permite simular um ambiente aquático e observar o crescimento e as funções de diferentes grupos de microrganismos. Ela é

composta por nutrientes, água e solo do ambiente ao qual se pretende analisar (Figura 1). Após sua montagem, a mesma é exposta à luz solar ou artificial, e então surgem estratificações de grupos de microrganismos de acordo com as condições ambientais estabelecidas (GOMES *et al.*, 2011).

Na camada mais superficial da coluna ocorre o aparecimento de algas e cianobactérias, que produzem oxigênio e mantém a zona aeróbia. Essa região apresenta a menor porcentagem de enxofre devido ao oxigênio produzido e a presença de bactérias oxidantes de enxofre, chamadas de bactérias quimiolitotróficas. Nas partes mais profundas da coluna, denominadas de zona anaeróbia, surgem microrganismos que consomem o oxigênio do sedimento e da água, favorecendo o surgimento de microrganismos anaeróbios ou fermentativos. Os produtos finais do processo de decomposição fermentativa são: ácidos orgânicos, álcoois e H_2 , que são utilizados como substrato para as bactérias redutoras de sulfato (TERAMAE, 2011). Na denominada zona microaerófila é possível observar uma coloração mais avermelhada devido à presença de bactérias púrpuras não sulfurosas. Esses microrganismos não toleram gradientes elevados de sulfeto de hidrogênio, são fotoheterotróficos e se desenvolvem em condições anaeróbias. O oxigênio presente nessa região é a difusão da zona aeróbia, tendo sua concentração limitada (LAZARO, 2009).

Figura 1. Esquema da coluna de Winogradsky.



Fonte: Sousa (2013).

3.5 Ecotoxicologia

A ecotoxicologia é a parte da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos nos ecossistemas (FORBES, 1993). Pressupõe-se o uso de testes

de toxicidade com organismos, que são chamados de bioensaios, com a finalidade de avaliar o grau de toxicidade ou o efeito biológico da substância (USEPA, 1988). Testes ecotoxicológicos utilizando vegetais são muito comuns, uma vez que constituem um recurso prático de baixo custo e alta sensibilidade na presença de substâncias tóxicas (PELEGRINI *et al.*, 2006). A toxicidade de uma substância pode variar de um organismo para outro, visto que a mesma substância pode ser tóxica para um indivíduo e inofensiva para outro. Ou então, em determinadas dosagens a mesma substância pode ser inofensiva, e em concentrações maiores pode se tornar tóxica (RODRIKS, 1994).

Ambientes aquáticos são muito suscetíveis a contaminação por petróleo e seus derivados, sofrendo com os efeitos químicos gerados pela toxicidade do poluente e com os efeitos físicos acarretados pelo recobrimento do óleo. O contato dos animais marinhos com a parcela tóxica do óleo pode levar à morte por intoxicação. Por serem relativamente solúveis em água, o benzeno, o tolueno e o xileno são compostos muito prejudiciais, pois podem tornar os organismos marinhos mais vulneráveis através da absorção desses contaminantes. Outro grupo de compostos aromáticos altamente tóxicos são os HPAs, podendo gerar efeitos carcinogênicos no homem e nos organismos marinhos (CETESB, 2015).

Os testes toxicológicos se baseiam nos diversos efeitos gerados por um composto para determinar o grau de toxicidade do mesmo. Segundo a CETESB (2015), os principais efeitos gerados pela interação do óleo com os organismos são: morte direta por recobrimento e asfixia, morte direta por intoxicação, morte de larvas e recrutas, redução na taxa de fertilização, perturbação nos recursos alimentares dos grupos tróficos superiores, bioacumulação, incorporação de substâncias carcinogênicas e efeitos indiretos subletais.

Geralmente, em ambientes aquáticos costuma-se empregar testes de toxicidade crônica. Esses testes são realizados para determinar o efeito do contaminante nos organismos após um longo período de exposição à amostra (CETESB, 2015, COSTA *et al.*, 2008). Já os testes de toxicidade aguda têm como objetivo avaliar os efeitos gerados nos organismos por um curto período de exposição. O propósito é determinar a concentração de uma substância teste, a qual produz efeitos deletérios em organismos sob condições controladas. Observa-se então a letalidade do composto, ou seja, a partir de qual concentração o agente tóxico causa a mortalidade de 50% (CL50) das espécies-teste (RAND; PETROCELLI, 1985). Sendo assim, é possível prevenir a degradação ambiental através de estudos ecotoxicológicos, uma vez que se tem a possibilidade de realizar avaliações de risco, identificando os efeitos adversos resultantes da exposição de um ambiente a um ou mais fatores de estresse ambiental (TERAMAE, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta

A coleta de água e sedimentos foi realizada no campus da Unesp de Rio Claro (SP), no lago do Departamento de Biologia. O solo foi coletado no Departamento de Biologia Geral e Aplicada. O lago foi escolhido para a coleta de água devido a presença de vegetação, pequenos vertebrados e material em degradação, simulando um lago natural.

4.2 Local dos experimentos

Todos os experimentos foram realizados no laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, do Departamento de Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Unesp – Campus de Rio Claro (SP).

4.3 Coleta do poluente

O óleo diesel utilizado nos experimentos foi cedido pela Refinaria do Planalto (REPLAN - Petrobrás) em Paulínia, SP.

4.4 Montagem das colunas de Winogradsky

Para a montagem das colunas foram utilizadas 8 garrafas plásticas de 1,5 L, previamente cortadas e limpas. Para cada coluna foram utilizados 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 dipotássio (K_2HPO_4), 0,5 g de sulfato de amônio [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], 0,5 g de fonte de carbono (filtro de papel desfiado) e 1000 mL de água do local de coleta. O procedimento foi baseado na metodologia de Loss *et al.* (2013).

Após a montagem, as colunas foram expostas à luz solar para favorecer o crescimento de organismos fotossintetizantes em diferentes profundidades da camada de sedimento (Figura 2). O desenvolvimento de populações heterotróficas e fotoautotróficas, como por exemplo as bactérias do enxofre anaeróbias, ocorre a partir do enriquecimento do sedimento com sulfatos, sulfetos e carbono orgânico (GRANT; LONG, 1989).

Com o intuito de analisar e acompanhar o desenvolvimento do ambiente com a adição de

diferentes concentrações de óleo diesel, as colunas receberam os tratamentos descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de óleo diesel puro, em mL, para cada tratamento da coluna de Winogradsky.

Tratamento	Volume de óleo diesel puro (mL)
Controle A (CA)	0
Controle B (CB)	0
Tratamento 1A (1A)	1
Tratamento 1B (1B)	1
Tratamento 2A (2A)	5
Tratamento 2B (2B)	5
Tratamento 3A (3A)	10
Tratamento 3B (3B)	10

Fonte: A autora (2021).

Figura 2. Colunas de Winogradsky logo após a montagem.



Fonte: A autora (2021).

4.5 Análises físico-químicas

Segundo a metodologia de APHA (2012), a determinação de pH foi realizada semanalmente, durante todo o experimento. Foi utilizado um pHmetro Digimed DMPH-2 calibrado com soluções tampões de pH 4 e 7 (Figura 3). A medida de pH foi realizada diretamente na amostra. As medições de condutividade elétrica foram realizadas nas mesmas condições, utilizando o condutivímetro Tecnopom CA150 (Figura 4).

Figura 3. Equipamento pHmetro Digimed DMPH-2.



Fonte: A autora (2021).

Figura 4. Condutímetro Tecnopom CA150.



Fonte: A autora (2021).

4.6 Análises microbiológicas

Bactérias heterotróficas utilizam compostos orgânicos como fontes de carbono, e estão presentes em todos os tipos de água, solo, vegetação ou ar. Tais bactérias possuem a capacidade

de se multiplicarem após degradar compostos e utilizá-los como fonte de nutrição, o que é considerado como um importante indicador da qualidade microbiológica da água (CETESB, 2006). Para a realização do estudo foi utilizada a técnica de Pour Plate descrita por APHA (2012) e pela Norma Técnica L5.201 da CETESB (2006).

4.6.1 Preparo da água de diluição

Para o preparo da água de diluição são feitas duas soluções que em seguida foram utilizadas para o preparo de uma terceira solução. Para a solução 1 foi utilizado 34 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) dissolvido em 500 mL de água destilada. Para a solução 2 pesou-se 81,1 g de cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e diluiu-se em 1 L de água destilada. Por fim, para o preparo da solução 3 adicionou-se 0,25 mL da solução 1 e 1 mL da solução 2 em um balão volumétrico de 200 mL. O balão volumétrico foi completado com água destilada. A cada 15 dias, foram preparados 24 tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (solução 3), para que posteriormente fosse realizada uma diluição seriada. Os tubos de ensaio foram tampados com algodão, vedados com papel alumínio, e esterilizados em autoclave (Figura 5).

Figura 5. Autoclave utilizada para a esterilização dos materiais.



Fonte: A autora (2021).

4.6.2 Preparo do meio de cultura Plate Count Agar

Para o preparo do meio de cultura foi utilizado 8,2 g de PCA (Plate Count Agar) e foi dissolvido em 400 mL de água destilada. Após o preparo, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C na pressão, por cerca de 20 minutos. Além do meio de cultura, foram esterilizadas 16 placas de Petri e uma caixa de ponteiras (1000 µL). Em seguida, os materiais foram levados para a cabine de fluxo laminar devidamente esterilizada.

Figura 6. Meio de cultura Plate Count Agar.



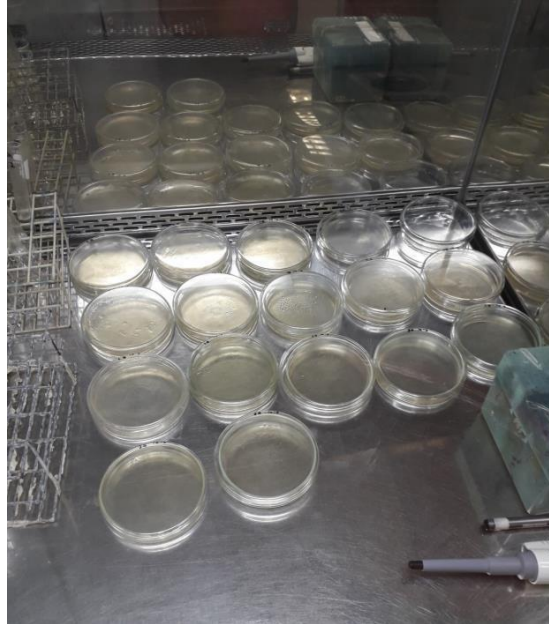
Fonte: A autora (2021).

4.6.3 Diluição seriada e inoculação das placas

As diluições seriadas foram realizadas dentro de uma cabine de fluxo laminar, esterilizada com álcool e com o uso da luz ultravioleta (por cerca de 10 minutos), garantindo que não haja contaminação no experimento. Os materiais autoclavados foram levados para dentro da cabine e rotulados de acordo com a amostra correspondente e o grau de diluição. As diluições seriadas foram feitas com o auxílio de uma pipeta de 1000 µL, também esterilizada, transferindo 1 mL da amostra para os tubos de ensaio. Ao todo foram realizadas 3 diluições para cada amostra, totalizando 24 tubos de ensaio. Posteriormente, foi realizada a inoculação das placas em duplicata, adicionando-se 1 mL da amostra diluída e 20 mL do meio de cultura (Figura 7). As placas foram agitadas gentilmente, com movimentos em formato de 8, para garantir a mistura

do meio de cultura e da amostra. Por fim, todas as placas foram vedadas com plástico filme, para evitar a contaminação, e levadas para a incubadora a 28 °C durante 48 horas (Figura 8).

Figura 7. Placas inoculadas após a diluição seriada.



Fonte: A autora (2021).

Figura 8. Incubadora utilizada para os testes microbiológicos.



Fonte: A autora (2021).

4.6.4 Contagem de UFCs

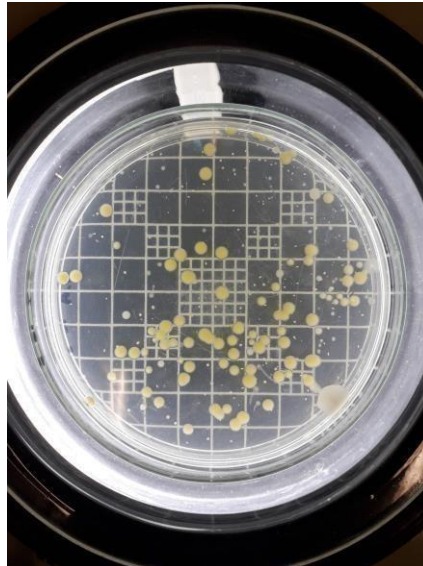
Após o período de 48 horas, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC, Figura 9), com o auxílio de um contador de colônias mecânico (Figura 10). Os

valores obtidos ao fim da contagem foram multiplicados pelo grau de diluição realizado.

$$\text{UFC/mL} = \text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 10^3$$

Ao fim da contagem, as placas foram esterilizadas em autoclave (121°C, 15 minutos), para eliminação do material biológico e posterior descarte.

Figura 9. Placa de Petri com Unidades Formadoras de Colônia.



Fonte: A autora (2021).

Figura 10. Contador de colônias mecânico.



Fonte: A autora (2021).

4.7 Teste de pigmento fotossintético: clorofila a

A clorofila a é um pigmento responsável pelo processo de fotossíntese e pela coloração verde das plantas. Ela pode ser encontrada em grupos de algas e cianobactérias e é

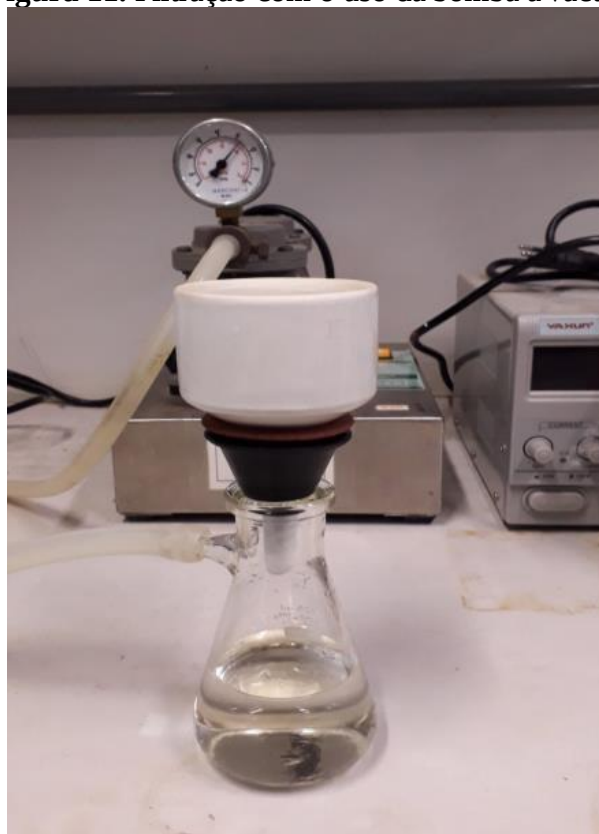
frequentemente utilizada como indicadora da biomassa fitoplanctônica, ou seja, é considerada como indicadora do processo de crescimento de algas e cianobactérias pelo enriquecimento de nutrientes, fenômeno conhecido como eutrofização (CETESB, 2014). A quantificação de clorofila a nas amostras foi realizada de acordo com o protocolo da CETESB (2014) e baseada nas equações de Jeffrey e Humphrey (1975).

Para realizar a extração de clorofila foi utilizado uma bomba a vácuo, onde foi filtrado cerca de 15 mL de cada amostra, utilizando um filtro de membrana (0,22 μm) (Figura 11 e 12). Após a filtragem, o filtro foi passado para um tubo de centrífuga e adicionado 10 mL de acetona 90% em cada tubo (Figura 13). Ao fim dessa etapa, os tubos foram levados ao banho maria a 75 °C por 5 minutos. Em seguida, ao banho de gelo por 5 minutos, e posteriormente à geladeira por um período de 24 horas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro UV-2401 PC, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm. As leituras foram feitas nos espectros de 630, 647 e 664 nm, contra o branco de acetona 90%. Os valores obtidos foram colocados na equação de Jeffrey e Humphrey (1975), para calcular a concentração de clorofila a em cada amostra.

- $Cl(a): (11,85.E664 - 1,54.E647 - 0,08.E630)$

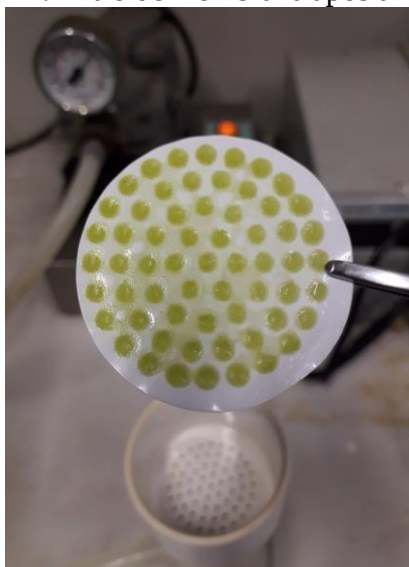
Os valores foram expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 11. Filtração com o uso da bomba a vácuo.



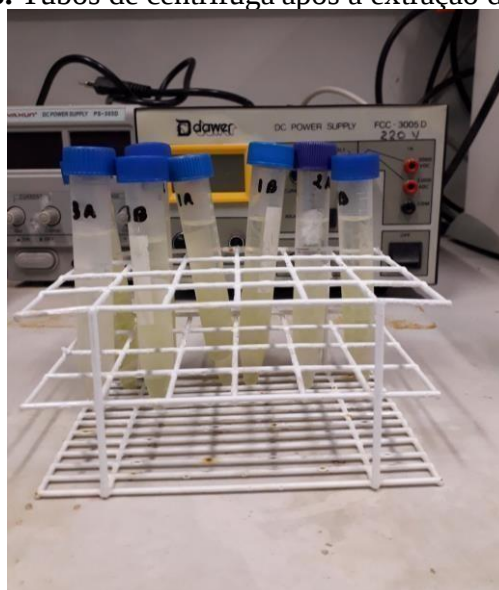
Fonte: A autora (2021).

Figura 12. Filtro de membrana após a filtração.



Fonte: A autora (2021).

Figura 13. Tubos de centrífuga após a extração de clorofila.



Fonte: A autora (2021).

*4.8 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* e *E. sativa**

Os testes de fitotoxicidade foram feitos utilizando sementes de *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula), ambas da marca Isla Park® e livres de defensivos agrícolas, índice de 98% de desempenho germinativo e 100% de pureza. Nenhuma das sementes possuem melhoramento genético ou transgênico.

As placas de Petri utilizadas no teste foram esterilizadas antes do uso. Foi colocado papel de filtro recortado no fundo das placas. Em seguida, adicionou-se 3 mL de cada amostra no

papel de filtro. Após essa etapa foram alocadas 20 sementes de *L. sativa* em triplicata (Figura 14). O mesmo procedimento foi realizado com as sementes de *E. sativa*. As placas contendo as sementes foram vedadas com plástico filme para evitar a contaminação e a perda de umidade. Sobre as placas foi colocada uma camada de papel alumínio, simulando um ambiente escuro para sua germinação. As placas foram levadas para a câmara de germinação (BOD), onde foram incubadas durante 5 dias, a 21 °C. Após esse período, foram mensuradas as radículas, em centímetros, e verificado o número de sementes germinadas (MONTEIRO; DELLAMATRICE, 2006). Como controle positivo foi utilizado o sulfato de zinco 0,05 mol/L e como controle negativo, água deionizada.

O procedimento foi realizado seguindo o teste descrito por Sobrero e Ronco (2004) e Monteiro e Dellamatrice (2006) com modificações e visa através dos cálculos de Germinação Relativa (Equação 1) e Elongação Radicular Relativa (Equação 2). O fator entre a alongação da radícula e germinação de sementes é avaliado pelo Índice de Germinação (Equação 3) (ARAÚJO *et al.*, 2010).

$$(1) \text{ Germinação Relativa (\%)} = \frac{\text{Número de sementes germinadas na Amostra}}{\text{Número de sementes germinadas no Controle}} \times 100$$

$$(2) \text{ Elongação Radicular Relativa (\%)} = \frac{\text{Enlongamento Médio na Amostra}}{\text{Enlongamento Médio no Controle}} \times 100$$

$$(3) \text{ Índice de Germinação (\%)} = \frac{\text{Germinação Relativa(\%)} \times \text{Elongação Radicular Relativa(\%)}}{100}$$

Figura 14. Sementes de alface distribuídas na Placa de Petri.



Fonte: A autora (2021).

4.9 Tratamento e descarte de resíduos da pesquisa

Todo resíduo químico dos materiais utilizados no processo de pesquisa foi destinado para a área de resíduos do Departamento de Biologia Geral e Aplicada, em frascos devidamente rotulados e estes foram acumulados no local. Todo o resíduo biológico foi levado para a autoclave, onde foi realizada a esterilização para evitar uma possível contaminação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Colunas de Winogradsky

Ao contaminar as colunas de Winogradsky com diferentes concentrações de óleo diesel puro, sendo elas 0, 1, 5 e 10 mL, foram analisados os impactos do contaminante em relação ao tempo de exposição (60 dias) e em relação às diferentes concentrações através dos testes anteriormente citados. As figuras mostradas a seguir apresentam a alteração na coloração das colunas de Winogradsky durante todas as semanas do experimento, sendo também possível, ter uma interpretação visual dos resultados (Figura 15 - 23).

Figura 15. Colunas de Winogradsky de todos os tratamentos no primeiro dia do experimento.



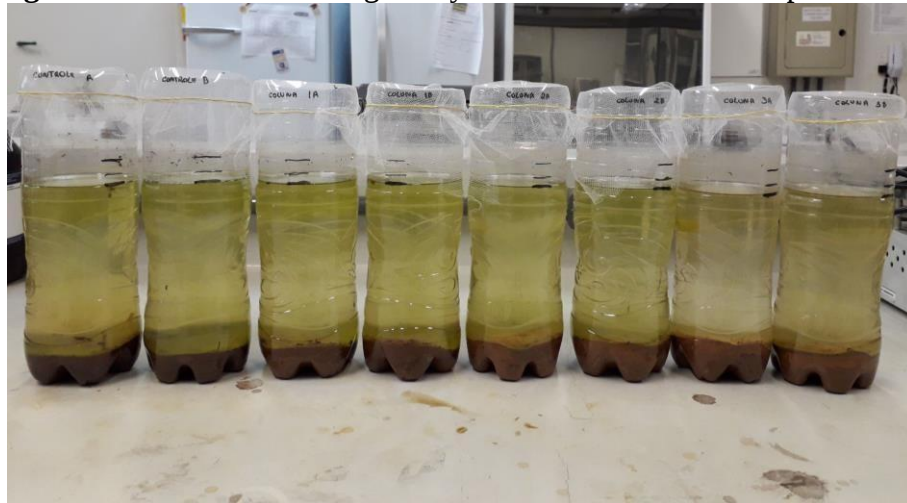
Fonte: A autora (2021).

Figura 16. Colunas de Winogradsky na segunda semana do experimento.



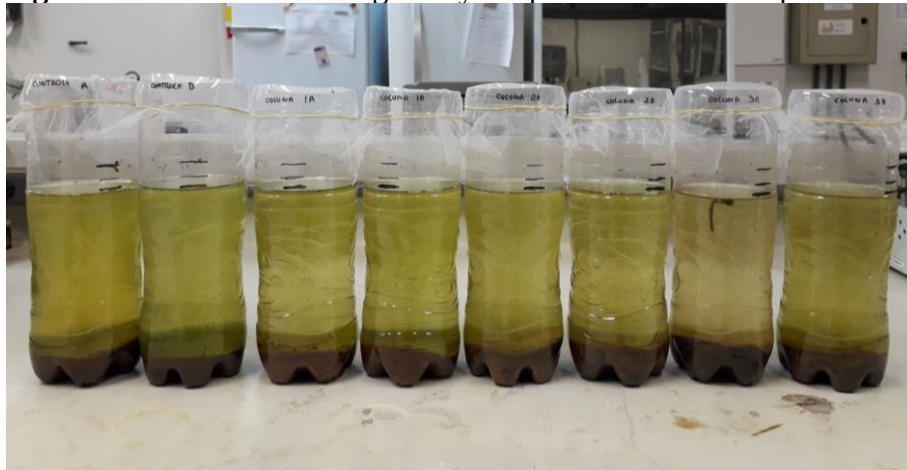
Fonte: A autora (2021).

Figura 17. Colunas de Winogradsky na terceira semana do experimento.



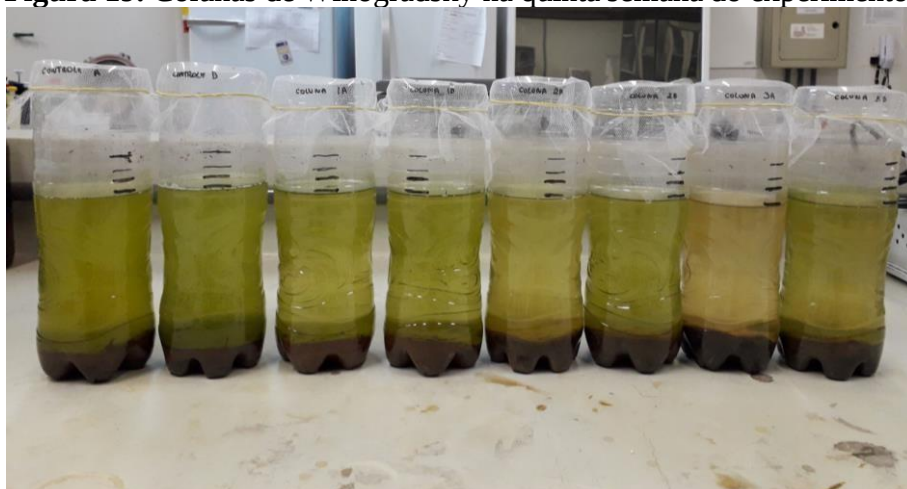
Fonte: A autora (2021).

Figura 18. Colunas de Winogradsky na quarta semana do experimento.



Fonte: A autora (2021).

Figura 19. Colunas de Winogradsky na quinta semana do experimento.



Fonte: A autora (2021).

Figura 20. Colunas de Winogradsky na sexta semana do experimento.



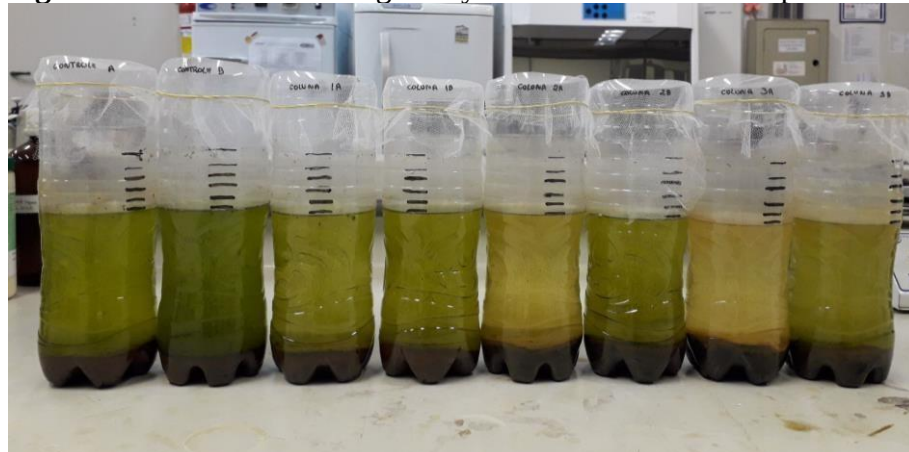
Fonte: A autora (2021).

Figura 21. Colunas de Winogradsky na sétima semana do experimento.



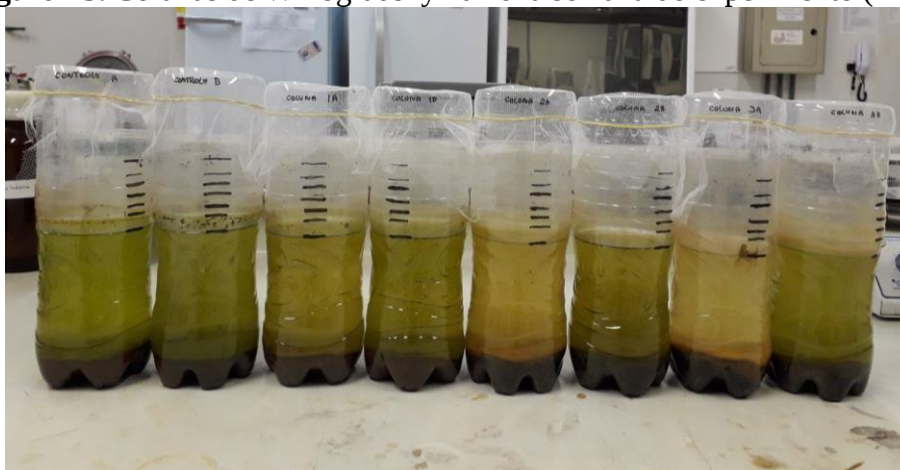
Fonte: A autora (2021).

Figura 22. Colunas de Winogradsky na oitava semana do experimento.



Fonte: A autora (2021).

Figura 23. Colunas de Winogradsky na nona semana do experimento (final).



Fonte: A autora (2021).

Considerando até a segunda semana do experimento, todas as colunas apresentaram uma coloração mais clara. A partir da terceira semana foi possível notar uma maior diferença na cor da água entre as colunas. A coluna 3A apresentou a coloração mais clara, se comparada com as demais. Na quinta semana, a coluna correspondente ao controle B estava visivelmente mais verde, seguida pelo controle A, indicando maior presença da microbiota fitoplancônica. Ambas as colunas não receberam adição de óleo diesel. A partir da sexta semana, todas as colunas se mostraram mais esverdeadas, com exceção das colunas 2A e 3A, que correspondem respectivamente a presença de 5 mL e 10 mL de óleo diesel. Isso indica uma possível influência do contaminante no crescimento de organismos fotossintetizantes.

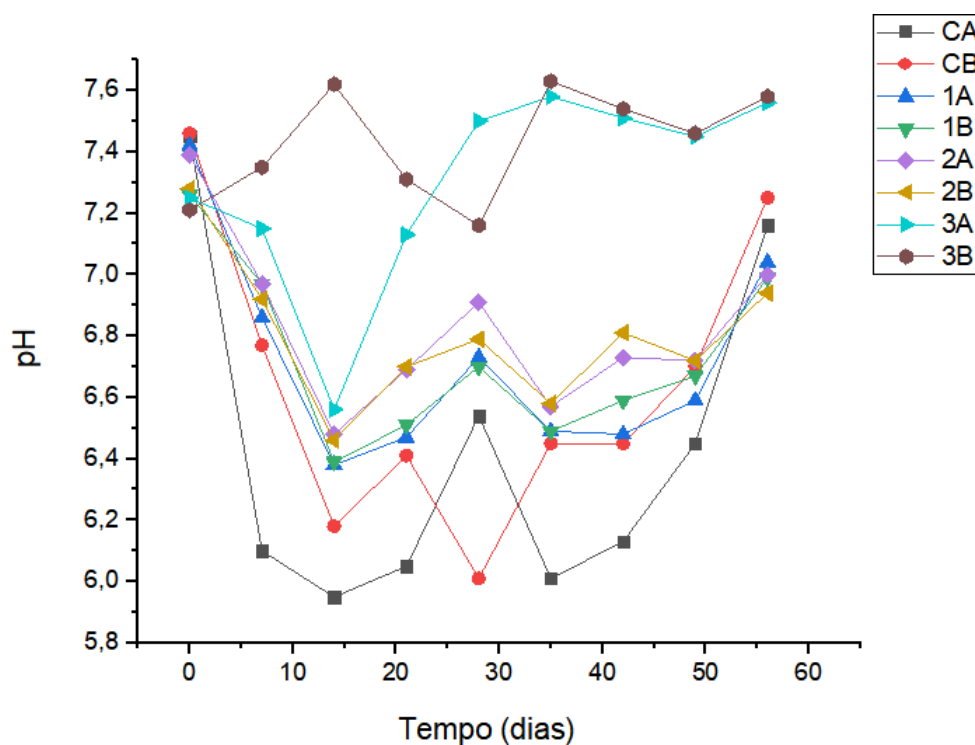
5.2 pH e condutividade elétrica

As análises de pH permaneceram constantes durante todo o tempo do experimento. Na primeira semana os valores foram altos para todas as amostras, tendo uma leve queda a partir da segunda semana (Tabela 4). No decorrer do tempo não houve grandes alterações, tendo os valores de pH variando entre 6 e 7,6. As colunas correspondentes aos tratamentos 3A e 3B, ambas contendo 10 mL de óleo diesel, obtiveram valores altos de pH durante todo o tempo de análise, indicando uma possível influência do contaminante (Figura 24).

Tabela 4. Resultados da variação de pH em relação ao tempo (dias).

Tempo	pH							
	Controle A	Controle B	Tratamento 1A	Tratamento 1B	Tratamento 2A	Tratamento 2B	Tratamento 3A	Tratamento 3B
0	7,45	7,46	7,42	7,26	7,39	7,28	7,25	7,21
7	6,1	6,77	6,86	6,97	6,97	6,92	7,15	7,35
14	5,95	6,18	6,38	6,39	6,48	6,46	6,56	7,62
21	6,05	6,41	6,47	6,51	6,69	6,7	7,13	7,31
28	6,54	6,01	6,73	6,7	6,91	6,79	7,5	7,16
35	6,01	6,45	6,49	6,49	6,57	6,58	7,58	7,63
42	6,13	6,45	6,48	6,59	6,73	6,81	7,51	7,54
49	6,45	6,7	6,59	6,67	6,72	6,72	7,45	7,46
56	7,16	7,25	7,04	6,99	7	6,94	7,56	7,58

Fonte: A autora (2021).

Figura 24. Gráfico contendo as variações de pH em função do tempo. (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3; A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.

Fonte: A autora (2021).

Em relação a condutividade elétrica, os valores obtidos apresentaram maiores variações (Tabela 5). Houve um padrão que se repetiu para todas as amostras, no qual a condutividade elétrica aumentou até a quarta semana e depois houve uma estabilização nos valores nas semanas seguintes (Figura 25). No tempo 0, os valores estavam baixos, indicando baixa condutividade elétrica inicial. Na semana seguinte, houve um aumento considerável nos

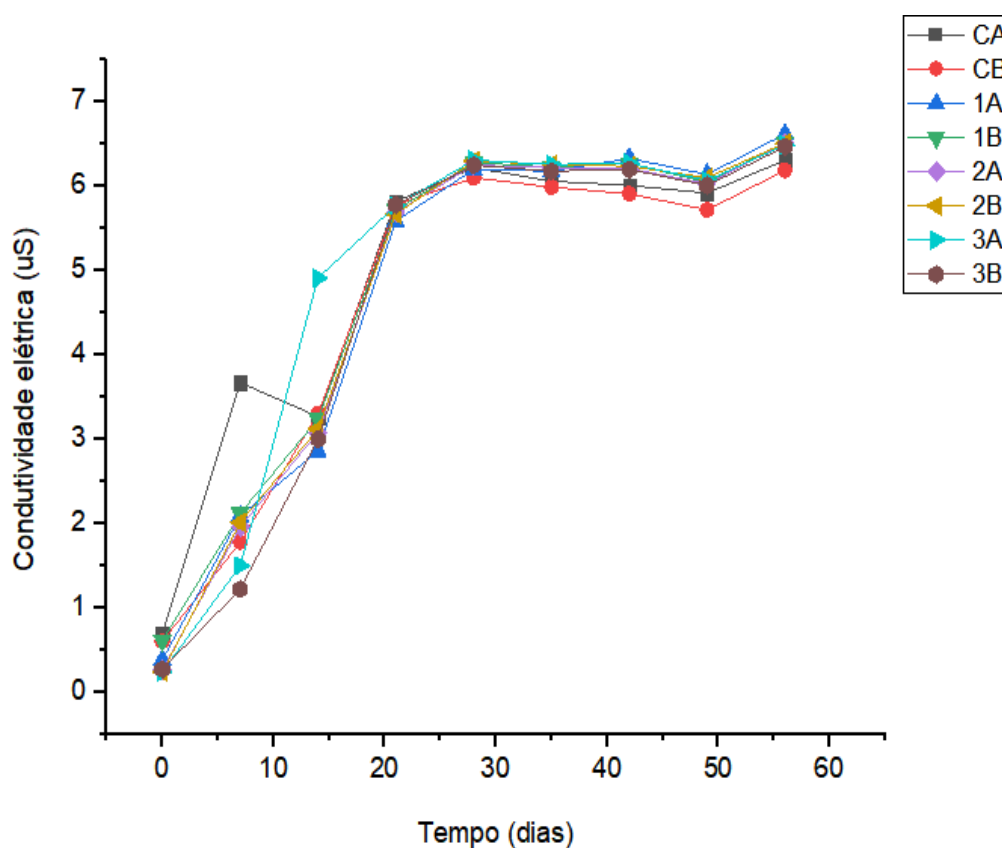
valores, sendo que a coluna Controle A obteve o valor mais elevado, 3,67 uS/cm. Após a quarta semana houve a estabilização nos valores de condutividade. Isso pode estar relacionado com a estabilização da comunidade microbiana nas colunas de Winogradsky, visto que esta tende a ocorrer após 4 semanas (SOUSA, 2013).

Tabela 5. Resultados das variações de condutividade elétrica em relação ao tempo (dias).

Tempo	Condutividade elétrica							
	Controle A	Controle B	Tratamento 1A	Tratamento 1B	Tratamento 2A	Tratamento 2B	Tratamento 3A	Tratamento 3B
0	0,69	0,6	0,38	0,61	0,26	0,24	0,24	0,27
7	3,67	1,78	2,09	2,12	1,96	2,01	1,5	1,22
14	3,27	3,3	2,86	3,24	3,08	3,12	4,91	3
21	5,82	5,78	5,59	5,72	5,69	5,67	5,77	5,78
28	6,22	6,1	6,2	6,28	6,25	6,3	6,31	6,25
35	6,06	5,99	6,18	6,23	6,22	6,26	6,26	6,18
42	6,01	5,91	6,33	6,27	6,21	6,24	6,27	6,2
49	5,92	5,72	6,14	6,05	6,03	6,1	6,07	6,01
56	6,31	6,19	6,62	6,52	6,52	6,51	6,49	6,47

Fonte: A autora (2021).

Figura 25. Gráfico contendo as variações de condutividade elétrica em função do tempo. (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

5.3 Bactérias heterotróficas

Em relação ao crescimento das bactérias heterotróficas, no geral, houve o crescimento microbiano, estabilização e queda, em tempos diferentes para cada coluna durante o experimento. As colunas Controle A e Controle B apresentaram leves quedas ao longo do tempo (Tabela 6). Os tratamentos 1A e 1B, ambos contendo 1 mL de óleo diesel, apresentaram um pico de crescimento em 30 dias, tendo uma queda na comunidade microbiana nas semanas seguintes.

As colunas correspondentes aos tratamentos 2A e 2B apresentaram seus picos de atividade microbiana em tempos diferentes. A coluna 2A obteve maior atividade em 15 dias e a coluna 2B em 30 dias, que correspondem respectivamente à terceira e quinta semana do experimento (Tabela 6). O mesmo ocorreu para os tratamentos 3A e 3B, no qual foi registrado um pico de crescimento durante a quinta semana para a coluna 3A, sendo de 356.000 UFCs/mL e de 203.000 UFCs/mL durante a terceira semana para a coluna 3B.

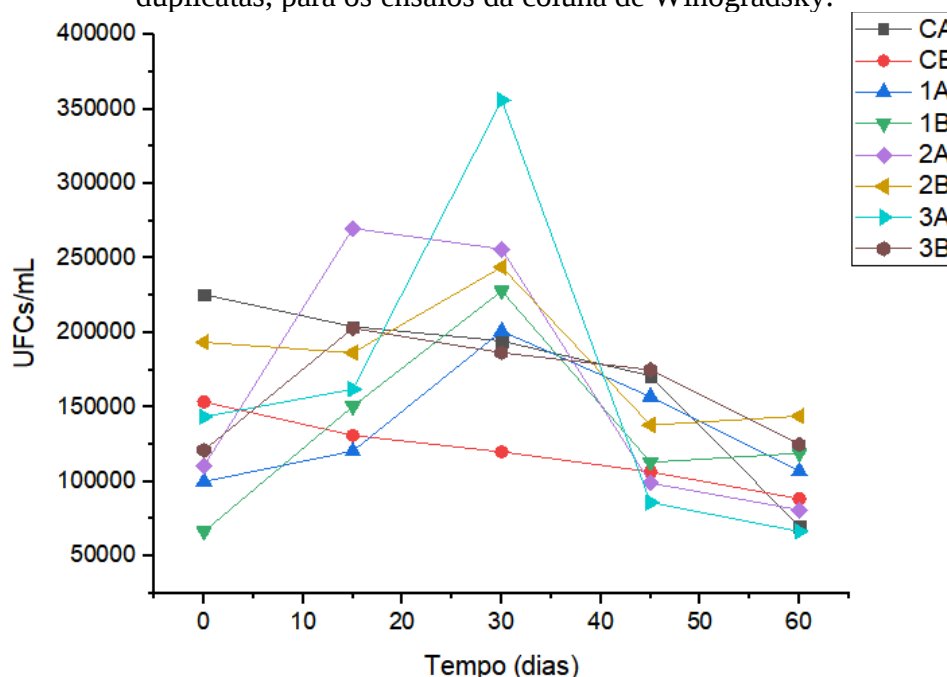
Tabela 6. Resultados da contagem de UFCs/mL em relação ao tempo (dias).

Tempo	UFC/mL							
	Controle A	Controle B	Tratamento 1A	Tratamento 1B	Tratamento 2A	Tratamento 2B	Tratamento 3A	Tratamento 3B
0	225.500	153.500	100.000	66.500	110.500	193.500	143.500	121.000
15	204.000	131.000	120.500	150.500	270.000	186.500	162.000	203.000
30	194.500	120.000	201.000	228.000	256.000	244.000	356.000	186.500
45	171.000	106.500	157.000	113.000	99.000	138.000	86.000	175.000
60	70.000	88.500	107.000	119.000	81.000	144.000	66.500	125.000

Fonte: A autora (2021).

Durante a última semana do experimento foi possível observar que as colunas 1A, 1B, 2B e 3B apresentaram valores de UFCs maiores se comparados com as colunas controle (CA e CB), sendo os valores 107.000, 119.000, 144.000 e 125.000 UFCs/mL, respectivamente. Isso sugere que os microrganismos presentes conseguiram se desenvolver biodegradando o contaminante (Figura 26).

Figura 26. Gráfico contendo os resultados da variação de UFCs/mL em função do tempo. (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.

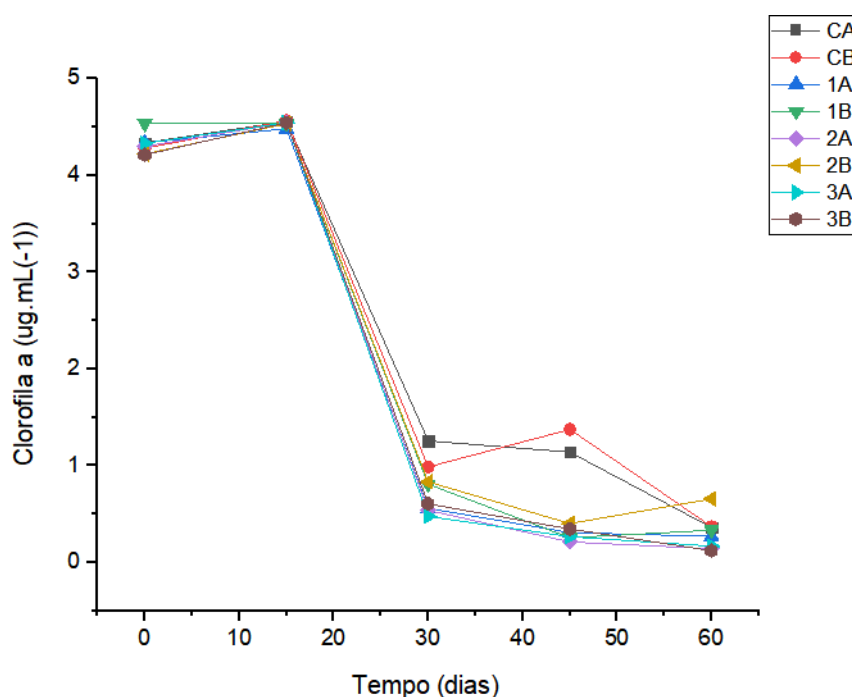


Fonte: A autora (2021).

5.4 Extração de clorofila a

Os valores de clorofila a apresentaram alterações significativas após os 15 dias do experimento, tendo uma queda relevante nos valores (Figura 27). A quantidade de pigmento no início foi mais alta devido à maior disponibilidade de nutrientes nas colunas, o que provoca um aumento da biomassa, caracterizando um aumento de algas. A partir do dia 30 houve um decréscimo de clorofila a nas colunas, que pode estar relacionado com o declínio dos nutrientes ao longo do tempo e com o consumo dos mesmos pelas algas (VERCELLINO; BICUDO, 2006).

Figura 27. Gráfico contendo as variações de clorofila a em função do tempo. (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

No geral, os valores registrados na Tabela 7, as colunas controle (CA e CB) obtiveram maiores quantidades de clorofila a em comparação com os outros tratamentos. Em 30 dias, a coluna Controle A apresentou um valor de $1,25671 \text{ ug.mL}^{-1}$, enquanto que na mesma semana a coluna 3A obteve um valor de apenas $0,47706 \text{ ug.mL}^{-1}$. O mesmo ocorreu em 45 dias, quando a coluna Controle B registrou uma quantidade de $1,37475 \text{ ug.mL}^{-1}$ e ao mesmo tempo, a coluna 3A chegou a uma quantidade de apenas $0,26685 \text{ ug.mL}^{-1}$. Apenas na última semana do experimento houve uma exceção para a coluna 2A, que registrou uma quantidade maior de clorofila, sendo de $0,65821 \text{ ug.mL}^{-1}$. O menor valor registrado foi de $0,12233 \text{ ug.mL}^{-1}$ para a coluna correspondente ao tratamento 3B, também na última semana do experimento.

Tabela 7. Resultados da quantidade de clorofila a nas amostras em relação ao tempo (dias).

Clorofila A (ug.mL^{-1})								
Tempo	Controle A	Controle B	Tratamento 1A	Tratamento 1B	Tratamento 2A	Tratamento 2B	Tratamento 3A	Tratamento 3B
0	4,3356	4,27962	4,33733	4,53613	4,29795	4,21978	4,33026	4,21287
15	4,55821	4,5669	4,48166	4,53451	4,54636	4,53443	4,54474	4,54466
30	1,25671	0,98835	0,56017	0,80823	0,53979	0,83355	0,47706	0,60611
45	1,14051	1,37475	0,30987	0,25651	0,21262	0,40262	0,26685	0,34673
60	0,36237	0,37082	0,27049	0,33357	0,14263	0,65821	0,16862	0,12233

Fonte: A autora (2021).

A partir dos dados registrados foi constatado que o óleo diesel influenciou na quantidade de clorofila a nas colunas. Todas as amostras que contém adição do contaminante, sendo elas de 1 (1A e 1B), 5 (2A e 2B) e 10 mL (3A e 3B), apresentaram valores mais baixos do pigmento fotossintético em comparação com as colunas controle (CA e CB), que não contém adição de óleo diesel.

5.5 Ecotoxicidade em sementes de *L. sativa* (alface) e *E. sativa* (rúcula)

5.5.1 Análise da porcentagem de germinação relativa

A água (controle negativo), apresentou 100% de germinação relativa na primeira e na última semana (Tabela 8 e 9, Figura 29 e 30). Os outros tratamentos apresentaram porcentagens menores de germinação relativa. As colunas controle (CA e CB) também apresentaram taxas menores que o controle negativo, possivelmente por conta da atividade microbiana e dos compostos presentes na água. Durante as duas semanas que foram realizados os experimentos de fitotoxicidade nas sementes, notou-se que as colunas com maiores concentrações de óleo diesel apresentaram menores taxas de germinação relativa em comparação com as colunas que não continham a presença do contaminante. Isso se deve ao fato de que o óleo diesel pode causar efeitos crônicos ou agudos nas plantas, além de interferir nas relações hídricas (RACINE, 1994).

O menor valor registrado foi de 68,33% para as sementes de rúcula durante a última semana do experimento (Figura 30, Tabela 9). Essa taxa foi registrada na coluna 3B, que corresponde a 10 mL, corroborando com o fato de que o óleo diesel é prejudicial à germinação das plantas. Em relação às sementes de alface, o menor valor foi de 71,67% para as colunas 3A e 3B, ambas também com concentrações mais altas de óleo diesel (Figura 30, Tabela 8). No geral, percebe-se que as sementes de alface apresentaram porcentagens de germinação relativa maiores do que as sementes de rúcula, se mostrando um pouco mais resistentes à ação do contaminante (Tabela 10).

Tabela 8. Resultados da porcentagem de germinação relativa das sementes de alface em função do tempo (semanas).

Porcentagem (%) de germinação relativa									
Tempo	Água	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
1	100	98,33	98,33	96,67	93,33	93,33	91,67	90	81,67
9	100	98	97,33	93,33	91,67	88,33	85	71,67	71,67

Fonte: A autora (2021).

Tabela 9. Resultados da porcentagem de germinação relativa das sementes de rúcula em função do tempo (semanas).

Porcentagem (%) de germinação relativa									
Tempo	Água	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
1	100	100	96,67	88,33	90	80	76,67	80	83,33
9	100	98	98,33	86,67	86,67	78,33	73,33	75	68,33

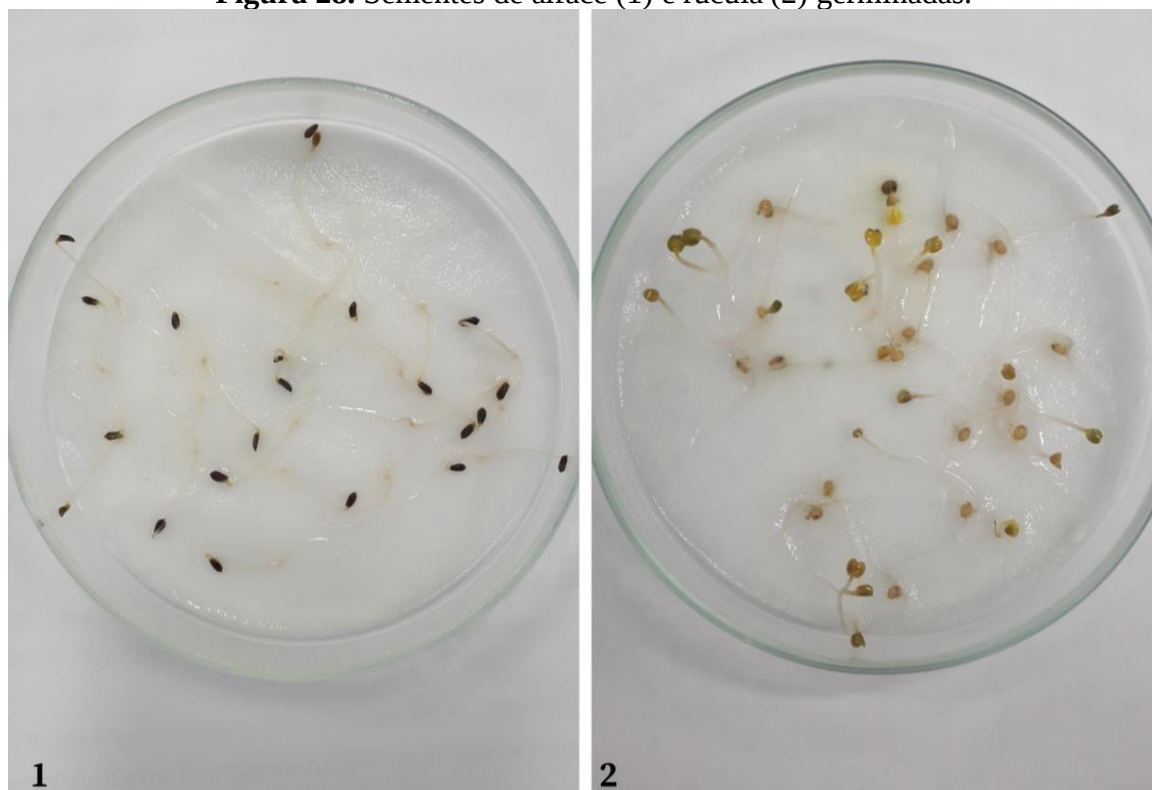
Fonte: A autora (2021).

Tabela 10. Média da porcentagem de germinação relativa das sementes de alface e rúcula.

Média da porcentagem (%)									
Sementes	Água	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Alface	100	98,16	97,83	95	92,5	90,83	88,33	80,83	76,67
Rúcula	100	99	97,5	87,5	88,33	79,16	75	77,5	75,83

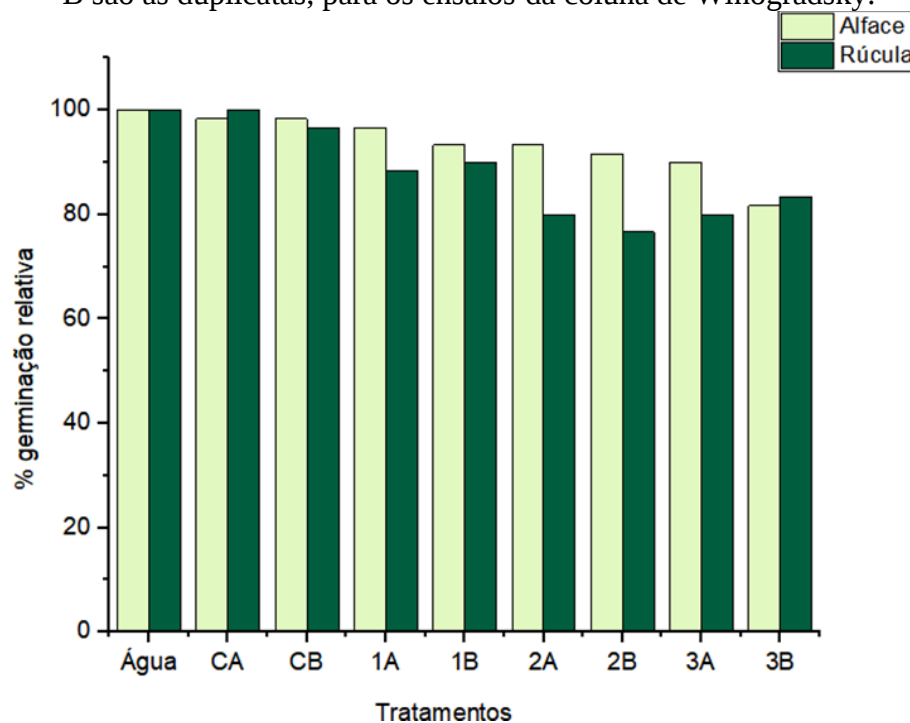
Fonte: A autora (2021).

Figura 28. Sementes de alface (1) e rúcula (2) germinadas.



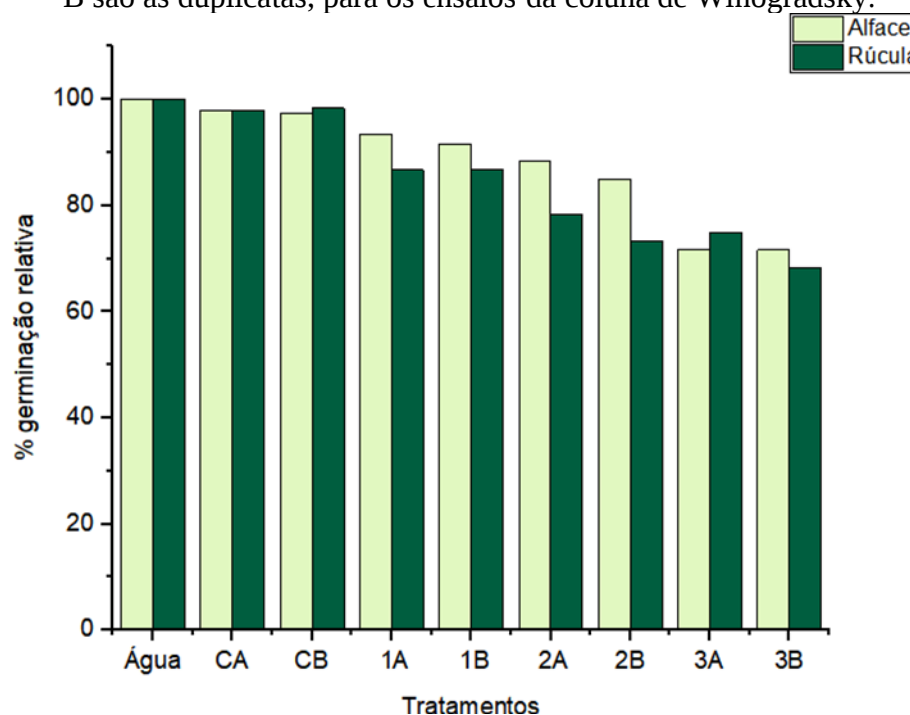
Fonte: A autora (2021).

Figura 29. Gráfico contendo a porcentagem de germinação relativa das sementes de alface e rúcula durante a primeira semana do experimento. (Água) Controle negativo, com água destilada; (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

Figura 30. Gráfico contendo a porcentagem de germinação relativa das sementes de alface e rúcula durante a última semana do experimento. (Água) Controle negativo, com água destilada; (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

5.5.2 Análise da porcentagem de alongação radicular

As sementes de rúcula apresentaram taxas muito maiores de alongação radicular em comparação com as sementes de alface, sendo mais perceptível durante a primeira semana do experimento (Tabela 11 e 12, Figura 31). O maior valor registrado foi de 155,35% para a rúcula no tratamento 2B na semana 1. O menor valor foi de 71% para a alface no tratamento 3B na semana 9 (Figura 32). Nos ensaios com a alface houve um padrão para todos os tratamentos, em que a porcentagem de alongação radicular diminui na medida em que a concentração de óleo diesel aumenta. O mesmo não ocorreu com as sementes de rúcula (Tabela 13).

Nos ensaios com a rúcula, as colunas com adição de óleo diesel apresentaram, em geral, taxas de alongação radicular maiores do que as colunas controle (CA e CB) e ao controle negativo (água) durante a primeira semana. Entre as possíveis explicações, é possível inferir que os efeitos do óleo diesel não foram significativos para as sementes de rúcula, uma vez que o experimento ainda estava no início. Na semana 9 nota-se que o contaminante influenciou no crescimento da raiz, apresentando taxas próximas a 100% para os tratamentos controle e taxa próxima a 80% no tratamento 3B.

Tabela 11. Resultados da porcentagem de alongação radicular das sementes de alface em relação ao tempo (semanas).

Porcentagem (%) de alongação radicular									
Tempo	Água	CA	CB	1 ^a	1B	2A	2B	3A	3B
1	101,65	98,26	101,19	97,62	100,64	96,07	95,25	98,72	87,48
9	100	98,44	96,71	88,84	90,67	89,57	89,66	73,74	71

Fonte: A autora (2021).

Tabela 12. Resultados da porcentagem de alongação radicular das sementes de rúcula em relação ao tempo (semanas).

Porcentagem (%) de alongação radicular									
Tempo	Água	CA	CB	1 ^a	1B	2A	2B	3A	3B
1	102,71	132,25	136,74	143,1	153,1	128,45	155,35	144,42	140,54
9	100	101,41	100,3	93,85	93,33	92,15	85,56	87,78	83,33

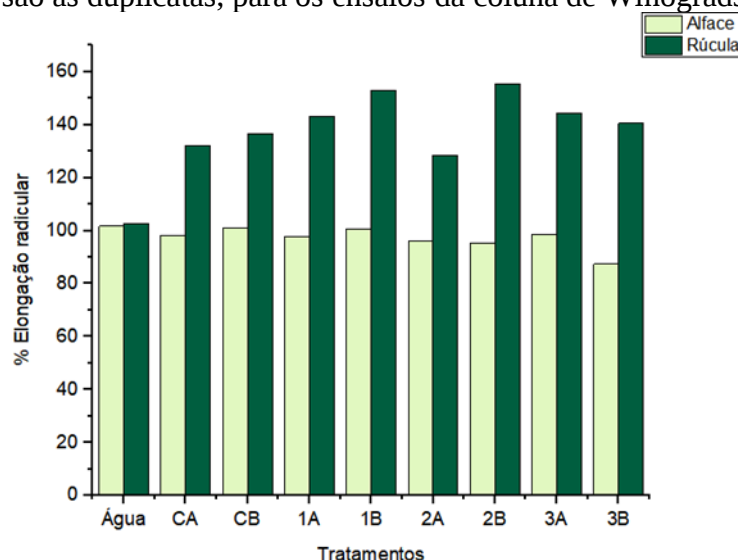
Fonte: A autora (2021).

Tabela 13. Média da porcentagem de alongação radicular das sementes de alface e rúcula.

Média de porcentagem (%)									
Sementes	Água	CA	CB	1 ^a	1B	2A	2B	3A	3B
Alface	100,82	98,35	98,95	93,23	95,65	92,82	92,45	86,22	79,24
Rúcula	101,35	116,83	118,52	118,47	123,21	110,3	120,45	116,1	111,93

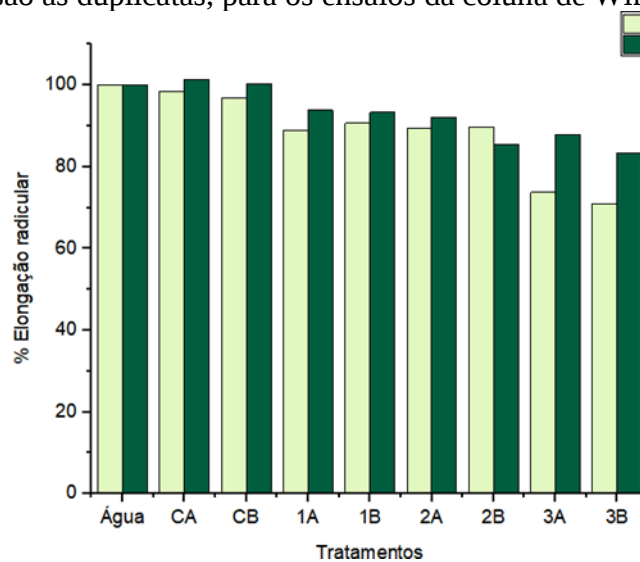
Fonte: A autora (2021).

Figura 31. Gráfico contendo a porcentagem de elongação radicular das sementes de alface e rúcula durante a primeira semana do experimento. (Água) Controle negativo, com água destilada; (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

Figura 32. Gráfico contendo a porcentagem de elongação radicular das sementes de alface e rúcula durante a última semana do experimento. (Água) Controle negativo, com água destilada; (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

5.5.3 Análise da porcentagem do índice de germinação

Os valores de porcentagem do índice de germinação registrados, em geral, foram maiores para o controle negativo e para as colunas controle (CA e CB) do que para os outros tratamentos. A única exceção ocorreu para a coluna 1B durante a semana 1, registrando um valor de 137,6%

para a semente de rúcula (Tabela 15). Nos ensaios utilizando sementes de alface, os efeitos do contaminante sobre a germinação ficam mais perceptíveis na semana 1 e na semana 9 (Figura 33 e 34). O tratamento com o controle negativo (água) apresentou um valor de 101,65% na primeira semana, enquanto que o tratamento 3B registrou uma taxa de 73,8% (Tabela 14). Na última semana, as colunas controle (CA e CB) e o controle negativo, apresentaram valores próximos a 100%. As colunas com maiores concentrações de óleo diesel, como o tratamento 3A e 3B, indicaram valores de germinação próximos a 50%.

Nos ensaios com a rúcula, o óleo diesel não apresentou efeitos significativos na primeira semana. O controle negativo registrou um valor de índice de germinação abaixo das outras colunas contaminadas (Tabela 16). Na semana 9 foi possível notar que conforme a concentração de óleo diesel aumenta, a porcentagem do índice de germinação diminui. As colunas Controle apresentaram taxas próximas a 100%, enquanto as colunas 3A e 3B com cerca de 60%, mostrando um efeito nocivo do contaminante.

Tabela 14. Resultados da porcentagem do índice de germinação das sementes de alface em relação ao tempo (semanas).

Porcentagem (%) do índice de germinação									
Tempo	Água	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
1	101,65	96,63	99,65	94,56	93,87	89,83	87,91	88,61	73,8
9	100	96,81	95,2	82,94	83,1	79,21	76,33	53,1	50,86

Fonte: A autora (2021).

Tabela 15. Resultados da porcentagem do índice de germinação das sementes de rúcula em relação ao tempo (semanas).

Porcentagem (%) do índice de germinação									
Tempo	Água	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
1	102,71	132,25	131,86	126,12	137,6	102,5	119,37	115,8	117,56
9	100	99,68	98,67	81,39	80,89	72,22	62,86	65,82	57,33

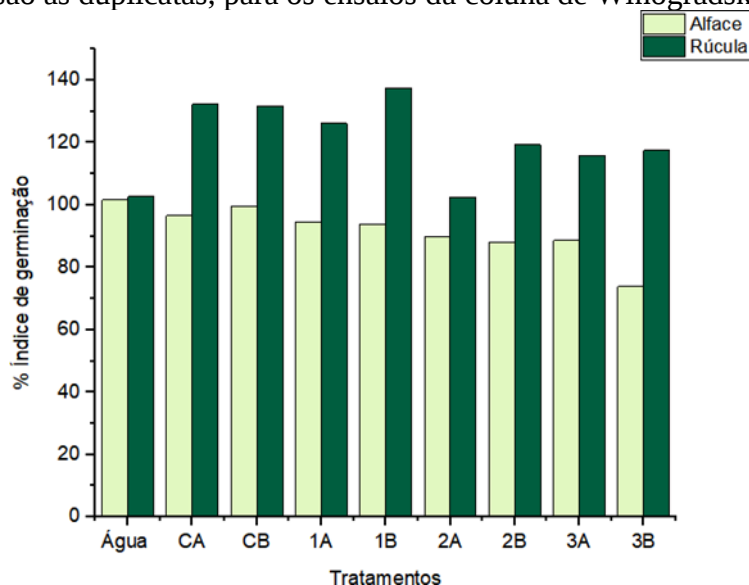
Fonte: A autora (2021).

Tabela 16. Média da porcentagem do índice de germinação das sementes de alface e rúcula.

Média da porcentagem									
Sementes	Água	CA	CB	1A	1B	2A	2B	3A	3B
Alface	100,82	96,72	97,42	88,75	88,48	84,52	82,12	70,85	62,33
Rúcula	101,35	115,96	115,26	103,75	109,24	91,69	91,11	90,81	87,44

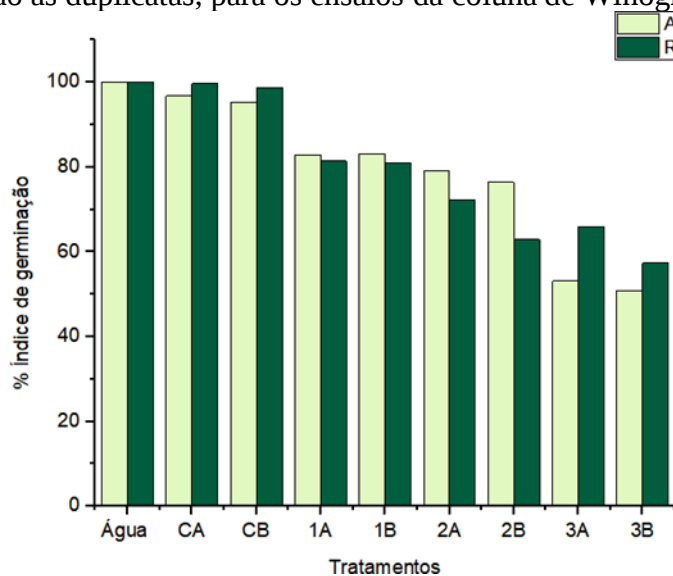
Fonte: A autora (2021).

Figura 33. Gráfico contendo a porcentagem do índice de germinação das sementes de alface erúcula durante a primeira semana do experimento. (Água) Controle negativo, com água destilada; (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

Figura 34. Gráfico contendo a porcentagem do índice de germinação das sementes de alface erúcula durante a última semana do experimento. (Água) Controle negativo, com água destilada; (C) Tratamento controle; (1) Tratamento 1; (2) Tratamento 2; (3) Tratamento 3. A e B são as duplicatas, para os ensaios da coluna de Winogradsky.



Fonte: A autora (2021).

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que a presença do óleo diesel influencia negativamente um ecossistema, uma vez que os testes realizados demonstraram alterações na biota aquática. Apesar da presença do contaminante, houve o crescimento de organismos fotossintetizantes e da biomassa de clorofila a. Contudo, quanto maior a concentração de óleo diesel menor a disponibilidade do pigmento fotossintético, demonstrando toxicidade, durante todo o tempo do experimento.

Quanto ao crescimento das bactérias heterotróficas, estas conseguiram se desenvolver mesmo em um ambiente contaminado, tendo seu pico de atividade após um mês de experimento, para a maioria das colunas. Isso demonstra que o processo de biorremediação é válido para tratar ambientes afetados por poluentes, como produtos derivados do petróleo. Com relação às análises de pH e condutividade, não houve mudanças significativas, sendo que esta última aumentou ao longo das semanas conforme adaptação dos microrganismos ao meio.

Os testes ecotoxicológicos, utilizando sementes de *Lactuca sativa* (alface) e *Eruca sativa* (rúcula) demonstraram que o óleo diesel afeta negativamente a germinação das sementes, como observado principalmente nas análises de germinação relativa e no índice de germinação. Quanto à elongação radicular, as sementes de alface se mostraram mais sensíveis conforme aumentava a concentração do óleo diesel, tanto na primeira como na última semana, demonstrando a toxicidade do contaminante. O mesmo não ocorreu com as sementes de rúcula durante a semana 1 do experimento, sendo difícil estabelecer alguma conclusão.

De modo geral pode-se afirmar que o óleo diesel, em altas concentrações, é prejudicial para a biota aquática. Sendo assim, apresentando influência sobre os organismos presentes e aos processos realizados pelos mesmos, uma vez que todos os parâmetros estudados no presente projeto apresentaram algum grau de sensibilidade ao contaminante.

REFERÊNCIAS

- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**. 2019. Acesso em: 30 de agosto de 2021. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/arquivos/central-conteudos/anuario-estatistico/2019/2019-anuario-versao-impressao.pdf>
- ANEEL, Agência Nacional de Energia Elétrica do Brasil. **Atlas de energia elétrica do Brasil: Derivados de petróleo**. ANEEL, Brasília, 2008. Disponível em: www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas3ed.pdf. Acesso em: 05 de março de 2021. 233 p.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v. 211, n. 4478, p. 132-138, 1981.
- ANDRADE, J. D. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and waste water**. American Public Health Association, Washington, 22ª ed., 2012. 1504 p.
- ARAÚJO, E. A. *et al.* Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1940-1948, 2010.
- ARAÚJO, C. S. T. *et al.* Oil spills: Environmental consequences and recovery strategies. **Oil spills**, p. 87, 2014.
- ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological reviews**, v. 45, n. 1, p. 180, 1981.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.
- BRASIL. **Resolução ANP nº 50, de 23 de dezembro de 2013**. Diário oficial da União, Brasília, DF, 23 dezembro de 2013.
- BRASIL. **Resolução ANP nº 65, de 09 de dezembro de 2011**. Diário oficial da União, Brasília, DF, 09 dezembro de 2011.
- BRASIL. **Resolução CONAMA nº 415, de 24 de setembro de 2009**. Diário oficial da União, Brasília, DF, n. 184, 25 setembro de 2009.
- CARDOSO, L. C. **Petróleo do poço ao posto**. Qualitymark Editora Ltda, 2005.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma Técnica L5.201: Contagem padrão decolônias de bactérias: Método de ensaio**. São Paulo, 2006.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma técnica L5.306: Determinação de Clorofila a e Feofitina a: método espectrofotométrico**. São Paulo, 2014.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Vazamentos de óleo. **Efeitos do óleo nos organismos**, São Paulo, 2015. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/tipos-de-acidentes/vazamentos-de-oleo/impactos-ambientais/efeitos-do-oleo-nos-organismos/>. Acesso em: 27 março de 2021.
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Principais acidentes internacionais**, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/emergencias-quimicas/wp-content/uploads/sites/22/2013/12/Principais-acidentes-internacionais.pdf>. Acesso em: 10 março de 2021.
- COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

CRAFTS, A.; REIBER, H. Herbicidal properties of oils. **Hilgardia**, v. 18, n. 2, p. 77-156, 1948.

DA SILVA, J. M. C. *et al.* Impactos Ambientais da Exploração e Produção de Petróleo na Bacia de Campos, RJ. In: **IV Encontro Nacional da Anppas**, Brasília, DF, 2008. 19 p. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3427239/mod_resource/content/1/petróleo.pdf. Acesso em: 07 de setembro de 2021.

DECESARO, A. **Bioestimulação de solo contaminado por compostos oleosos com biomassa microalgal inativa**. 2013. 61 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Engenharia Ambiental) – Universidade de Passo Fundo, Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Passo Fundo, 2013.

DUARTE, L. D. A. **Detoxificação de petróleo e óleo diesel por consórcios microbianos de origem marinha**. 2016. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2016.

FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Springer Science & Business Media, Londres, 1993. 248 p.

FUENTES, S. *et al.* Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4781-4794, 2014.

GAMAZO, C.; LÓPEZ-GOÑI, I.; DÍAZ, R. **Manual práctico de Microbiología**. Elsevier, Barcelona, 3 ed., 2005. 244 p.

GHAZALI, F. M. *et al.* Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 54, n. 1, p. 61-67, 2004.

GOMES, A.; OSÓRIO, L. D. S. 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**, v. 6, n. 16, p. 21-28, 2011.

GRANT, W. D.; LONG, P. E. **Microbiologia ambiental**. Acirbia, New York, 1989. 332 p.

JEFFREY, S. T.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und physiologie der pflanzen**, v. 167, n. 2, p. 191-194, 1975.

LAZARO, C. Z. **Obtenção e caracterização filogenética de consórcio de bactérias púrpuras não-sulforosas consumidoras de ácidos orgânicos visando a produção de hidrogênio em reator anaeróbio de batelada**. 2009. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

LIMA, M. P. **O custeio do transporte rodoviário**. Artigos CEL, 2001. 12 p. Disponível em: <http://files.transporte-e-distribuicao.webnode.com/200000039-2985c2a7fa/Apostila%20-%20O%20custeio%20do%20Transporte%20Rodovirário.pdf>. Acesso em: 07 de setembro de 2021.

LOSS, R. A. *et al.* Biohydrogen production by a mixed photoheterotrophic culture obtained from a Winogradsky column prepared from the sediment of a southern Brazilian lagoon. **Renewable Energy**, v. 50, p. 648-654, 2013.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v. 40, n. 4, p. 339-346, 2000.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. D. F. D.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.

MELO, I. S. *et al.* Biodegradação. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2001.

MENEZES, E. W. *et al.* Effect of ethers and ether/ethanol additives on the physicochemical properties of diesel fuel and on engine tests. **Fuel**, v. 85, n. 5-6, p. 815-822, 2006.

MEYER, D. D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias**. 2011. 161 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, 2011.

MME, Ministério de Minas e Energia. **Resenha energética brasileira: Exercício de 2014**. MME, Brasília, 2015. Acesso em: 30 de agosto de 2021. Disponível em: <http://antigo.mme.gov.br/documents/36208/948169/7.14+-+Resenha+Ener%C3%A9tica+Brasileira+2014.pdf/9aa82d3f-a9df-5671-31b3-a5d4d7c27f42>. Acesso em: 30 mar. 2021.

MONTEIRO, R. T. R.; DELLAMATRICE, P. M. Toxicidade de Resíduos Têxteis Tratados por Microrganismos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p.63-66. 2006.

MORAIS FILHO, M. C.; CORIOLANO, A. C. F. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **HOLOS**, v. 7, p. 133-150, 2016.

NRC, National Research Council. **In situ bioremediation: When does it work?** National Academies Press, Washington, 1993. 207 p.

PELEGRINI, N. N. B. et al Estudo da sensibilidade de sementes de *Euruca Sativa* (Rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. In: **XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA) João Pessoa-PB**. 2006.

RACINE, C. H. Long-term recovery of vegetation on two experimental crude oil spills in interior Alaska black spruce taiga. **Canadian Journal of Botany**, v. 72, n. 8, p. 1171-1177, 1994.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. FMC Corporation, Princeton, 1985. 666 p.

RODRICKS, J. V. **Calculated Risks: Understanding the Toxicity of Chemicals in our environment**. Cambridge University Press, Reino Unido, 1994. 282 p.

SHINZATO, C. M. **Colunas de Winogradsky com águas contaminadas por petróleo e derivados monitoradas por ensaios ecotoxicológicos**. 2015. 24 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2015.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**, Canadá, v. 4, p. 71-79, 2004.

SOUSA, M. L. **Processo eletrolítico usado na degradação de efluentes têxteis e avaliação de seu potencial toxicológico e ecotoxicológico**. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2013.

SOUZA, T. B. **Revisão da equação de cálculo de índice de cetano para as características do diesel comercializado no Paraná**. 2008. 142 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Térmicos e Químicos) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TERAMAE, K. H. **Análise ecotoxicológica utilizando colunas de winogradsky contaminadas por óleo lubrificante usado e biodiesel**. 2011. 94 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ecologia) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2011.

THOMAS, J. E. **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2ª ed., 2004. 272 p.

URURAHY, A. F. *et al*. Effect of aeration on biodegradation of petroleum waste. **Revista de Microbiologia**, v. 29, n. 4, p. 254-258, 1998.

USEPA, US Environmental Protection Agency. **Water Quality Standards Criteria Summaries: A compilation of State/Federal Criteria: Arsenic**. Office of water regulations and standards, Washington, 1988. 62 p.

VERCELLINO, I. S.; BICUDO, D. D. C. Sucessão da comunidade de algas perifíticas em reservatório oligotrófico tropical (São Paulo, Brasil): comparação entre período seco e chuvoso. **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, p. 363-377, 2006.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current opinion in biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 237-241, 2001.