UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA AMBIENTAL

INGRID REGINA AVANZI

**ÁREAS AFETADAS POR BTEX NA REGIÃO DE CUBATÃO:
ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA
BIORREMEDIAÇÃO E IMPACTOS SOCIOAMBIENTAIS CAUSADOS
POR ESTES COMPOSTOS**

São Paulo
2012

INGRID REGINA AVANZI

ÁREAS AFETADAS POR BTEX NA REGIÃO DE CUBATÃO: ISOLAMENTO DE
MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO E IMPACTOS
SOCIOAMBIENTAIS CAUSADOS POR ESTES COMPOSTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Ambiental.

Área de Concentração: Ciência Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Elen Aquino Perpetuo.

São Paulo
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Avanzi, Ingrid Regina

Áreas afetadas por BTEX na região de Cubatão: isolamento de micro-organismos com potencial para biorremediação e impactos socioambientais causados por estes compostos. /

Ingrid Regina Avanzi; orientador Claudio Augusto Oller do Nascimento; co-orientadora Elen Aquino Perpetuo. . – São Paulo, 2012.

135 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental) – Universidade de São Paulo

1. Biodegradação 2. Poluição do solo 3. Hidrocarbonetos
I. Título

INGRID REGINA AVANZI

ÁREAS AFETADAS POR BTEX NA REGIÃO DE CUBATÃO: ISOLAMENTO DE
MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO E IMPACTOS
SOCIO-AMBIENTAIS CAUSADOS POR ESTES COMPOSTOS

Esta dissertação foi julgada adequada à
obtenção do título de Mestre em Ciência Ambiental e
aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciência Ambiental da Universidade de
São Paulo.

São Paulo, 04 de julho de 2012.

Professor Doutor Claudio Augusto Oller do Nascimento
Universidade de São Paulo - Procam/Poli

Prof. Doutora Sônia Maria Flores Giancesella
Universidade de São Paulo - Procam/IO

Doutora Luciana Gimenes Jandelli
Instituto de Botânica - IBt

Aos meus pais e ao meu noivo

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e de todos, agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, confortando-me nos momentos difíceis e compartilhando dos momentos felizes.

Ao meu noivo, e, sobretudo amigo, Raphael, por compreender a minha falta além de todo o apoio dado a conclusão do trabalho.

Aos meus pais e meu irmão, Valdomiro, Márcia e Wallace pelo incentivo e estímulo.

A minha co-orientadora, Prof. Dra. Elen Aquino Perpetuo, pela oportunidade da Iniciação Científica, que foi a porta de entrada ao ingresso no Mestrado, pelos “puxões de orelha” que ajudaram (e bastante) na conclusão deste trabalho, no esclarecimento e entendimento daquilo que ninguém entendia e principalmente por todos os conselhos dignos de uma “mãe”.

Ao coordenador e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental da USP, pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso, especialmente ao Prof. Dr. Claudio Augusto Oller do Nascimento pela orientação neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Louise, Alan, Marcela e Rafaela pelo apoio, paciência, amizade e risadas dentro e fora do laboratório.

Aos meus ex-colegas de laboratório, mas não menos importantes: Anderson, Kelly, Paula, Bruna, Dra. Juliana, Stanley, Murillo, Matheus e Déborah.

Aos amigos Bruno Karolsky e Dra. Marinalva Martins Pinheiro do Instituto de Ciências Biomédicas da USP pelas palavras sábias que proporcionaram um novo rumo à pesquisa.

Ao Msc. Ricardo José, pela assistência técnica na manipulação de equipamentos, compra de reagentes e demais pendências que não foi possível terceirizar.

Ao meu amigo Emerson pela compreensão nos dias de corpo presente e de mente ausente.

Ao INCT de Estudos em Meio Ambiente, situado no Cepema-POLI-USP em Cubatão-SP, pela infra-estrutura laboratorial.

A FUSP e FAPESP pelo apoio financeiro.

Finalmente, ao meu sobrinho Marcus Vinicius, ao qual desejo muita saúde e um futuro repleto de realizações (espero que ele saiba que, ao menos, estamos tentando de tudo para garantir um futuro melhor para sua geração, esperando que ele possa fazer o mesmo pelos seus seguintes).

"A tecnologia moderna deve à ecologia um pedido de desculpa."

(Alan M. Eddison)

RESUMO

AVANZI, I.R. **Áreas afetadas por BTEX na região de Cubatão**: isolamento de micro-organismos com potencial para biorremediação e impactos socioambientais causados por estes compostos. 2012. 135 fls. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A poluição do solo por uso de derivados de petróleo como o grupo de hidrocarbonetos denominado de BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos), apresenta grande risco às comunidades residentes próximas a esses locais. Esses compostos são tóxicos, comprovadamente cancerígenos e podem levar uma pessoa a morte, mesmo em concentrações extremamente baixas. O cidadão, muitas vezes não tem noção do que sejam estes contaminantes e o grande perigo que representam. Milhares de residências têm sido construídas sobre resíduos perigosos que continuam ativos, emitindo gases e/ou contaminando o lençol freático. Em particular, na região de Cubatão, o problema se agrava com o uso indevido de águas de rios e riachos, que por um processo de percolação, acabam sendo contaminados pelos poluentes presentes no solo, podendo ocorrer de o ponto de coleta de água ser próximo a um sítio contaminado. Este estudo relata o isolamento e caracterização de quatro cepas de bactérias isoladas de um solo contaminado com BTEX em Cubatão-SP, através da técnica de enriquecimento seletivo de culturas. A idéia é que estas cepas possam ser utilizadas em futuros processos de biorremediação (tratamento) destes solos. Além disso, o trabalho conta com o auxílio de programas socioambientais existentes no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-POLI-USP) os quais tem como um dos objetivos conscientizar a população carente cubatense, que faz uso indevido da água contaminada, aos perigos da exposição ao BTEX.

Palavras-chave: Biodegradação, poluição do solo, hidrocarbonetos.

ABSTRACT

AVANZI, I.R. **Contaminated areas by BTEX in Cubatão:** isolation of microorganisms with bioremediation potential and study of environmental and social impacts caused by these compounds. 2012. 135 p. Master's Degree thesis - Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Contaminated soils by hydrocarbons known as BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene), represent a risk to communities who live close to these places. These compounds are toxic, carcinogenic and can cause death to people, even in extremely small concentrations. Citizens often have no idea who and how hazardous are these contaminants. Millions of homes have been built on dangerous active wastes, emitting gases and contaminating the groundwater. In particular, the problem is worst in Cubatão due to inappropriate use of water from rivers and streams, which by a percolation process, contaminate soil. Most of the time the water collected points are near the contaminated site. This study reports the successful isolation and characterization of 4 bacteria strains isolated from an industrial soil in Cubatão-Brazil, using a culture enrichment technique. The idea is to use these microorganisms in future soils bioremediation processes (treatment). This work has as partners, social and environmental programs from the Center for Training and Environmental Research (CEPEMA-POLI-USP), which has as goal educate poor people against dangers of BTEX.

Keywords: Biodegradation, soil pollution, hydrocarbons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de duas diferentes contaminações de BTEX no solo (KAROLSKY, 2012 – comunicação pessoal).	26
Figura 2- Representação da atividade catabólica das enzimas mono-oxigenase, dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase em BTEX (HENDRICKX et al., 2006).	32
Figura 3-Transformação do Benzeno em catecol	33
Figura 4- Mapa de Cubatão relacionando a localização dos bairros sem saneamento básico com o ponto de coleta de solo contaminado (FONTE: Google Earth, 2012).	37
Figura 5- Fluxograma das atividades desenvolvidas em laboratório, adaptadas de Avanzi (2009).	43
Figura 6- Local da coleta de solo.....	44
Figura 7- Alunos da ETEC discutindo questões ambientais	52
Figura 8- Resultado da análise em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas para o solo contaminado. Os picos em 3 minutos e 5 minutos representam respectivamente os compostos tolueno e xileno.	54
Figura 9- Biodegradação do BTE (50 ppm). Incubação foi feita em 10 dias, agitação controlada à 200 rpm, temperatura de 30°C e BTE como única fonte de carbono.	60
Figura 10- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 50 ppm de BTE, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.	61
Figura 11- Biodegradação do BTEX (100 ppm). Incubação foi feita em 30 dias, agitação controlada à 200 rpm, temperatura de 30°C e BTEX como única fonte de carbono.	62
Figura 12- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 100 ppm de BTEX, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.	63
Figura 13- Cromatogramas dos experimentos de gasolina comercial 10%, após 21 dias de incubação a 30°C e agitação a 200 rpm. (A) Controle; (B) <i>Serratia</i> sp.; e (C) C3. Verifica-se	

os compostos Benzeno (2.2 min), Tolueno (3.5min), Xileno (5 min), Etil-benzeno (8.3min) e Fenol (10.2min).	64
Figura 14- Cromatogramas dos experimentos de gasolina comercial 10%, após 21 dias de incubação a 30°C e agitação a 200 rpm. (D) <i>Klebsiella</i> sp. e (E) <i>Pseudomonas</i> sp. Verifica-se os compostos Benzeno (2.2 min), Tolueno (3.5min), Xileno (5 min), Etil-benzeno (8.3min) e Fenol (10.2min).	65
Figura 15- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 10% de gasolina, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.	65
Figura 16- Biodegradação do fenol e catecol (100 ppm). Incubação foi feita em 7 dias, agitação controlada a 200 rpm, temperatura de 30°C e fenol/catecol como única fonte de carbono.	67
Figura 17- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 100 ppm de fenol, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.	67
Figura 18- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 100 ppm de catecol, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.	68
Figura 19- Relação entre absorbância e UFC.	69
Figura 20- Relação entre absorbância e UFC.	69
Figura 21- Relação entre absorbância e UFC.	69
Figura 22- Relação entre absorbância e UFC.	70
Figura 23- Via orto de degradação do catecol a succinato + acetil-Co-A.	72
Figura 24- Consumo de O ₂ pelas cepas isoladas durante a biodegradação.	74
Figura 25- Cromatogramas da DBO contendo 50 ppm de BTEX, após 18 dias de incubação.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Abairramento de Cubatão segundo o Decreto nº9.410 de 2009.	27
Tabela 2- Organismos conhecidos que metabolizam BTEX e a via metabólica utilizada.	34
Tabela 3- Resultados de identificação instantânea das cepas isoladas através do equipamento LT Microflex espectrômetro de massa (Bruker Daltonics).	59
Tabela 4- Comportamento das cepas isoladas frente aos diferentes compostos	71

LISTA DE SIGLAS

16 S RNA - Fragmento com peso de 16S do ácido ribonucléico ribossomal

Abs - absorbância

ADH - arginina dihidrolase

ADI - assimilação de ácido adipato

ARA - assimilação de arabinose

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de pesquisa básica de alinhamento local)

BTE - Benzeno, Tolueno e Etil-benzeno

BTEX - Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno

C3 - Cepa 3

CAP - assimilação de ácido caprato

Cepema-Poli-Usp - Centro de Pesquisa e Capacitação em Meio Ambiente da Universidade de São Paulo

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CIT - assimilação de citrato

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DNA- Ácido desoxirribonucléico

EA- Educação Ambiental

ESC - hidrólise de β -glucosidase

ETA - Estação de Tratamento de Água

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

ETEC - Escola Estadual Técnica

g - gramas

GC - Gas Chromatography (cromatógrafo gasoso)

GEL - protease

GLU - assimilação de glucose

GNT - assimilação de potássio de gluconato

h - horas

HPLC - High Performance in Liquid Chromatography (Cromatógrafo líquido)

ID - identificação

IPT- Instituto de Pesquisas Tecnológicas

MAL - assimilação de maltose

MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption/ionization (Matrix de dessorção a laser assistida / ionização)

MAN - assimilação de manitol

min - minutos

MLT - assimilação de malato

MNE - assimilação de manose

MS - mass spectrometer (espectrometria de massas)

NAG - assimilação de N-acetil-glucosamina

nm - nanômetro

NO₃ - redução dos nitratos em nitritos

OG - Órgão Gestor

OX - citocromo oxidase

PAC - assimilação de fenil-acetato

PCR - Polymerase chain reaction (Reação de polimerase em cadeia)

PNG - β -galactosidase

Ppm - Partes por milhão

ProNEA- Programa Nacional de Educação Ambiental

RNA- Ácido ribonucleico

rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal

Sabesp - Companhia de Saneamento básico do Estado de São Paulo

s - segundos

SP - São Paulo

TOF - time-of-flight (tempo de voo)

Tris-HCl – Tris (hidroximetil) amino metano acidificado com Ácido Clorídrico

TV- televisor

UE - Unidades Espaciais

UEPE - Unidades de Pesquisa e Estatística

UFC - Unidades formadoras de colônias

URE - urease

UV- Ultra-violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C- graus Celsius

μL - microlitro

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

CO₂- Gás Carbônico

Da - dalton

FeSO₄ - Sulfato de ferro

Hz - hertz

KH₂PO₄ - Fosfato de Potássio

kV - kilovolt

M2 - meio mínimo bacteriano contendo alguns sais

mg.L⁻¹ - miligramas por litro

MgSO₄ - Sulfato de magnésio

mM - mili molar

mm - milímetros

NH₄Cl - Cloreto de amônio

O₂ - oxigênio

r² - coeficiente de determinação

λ - lâmbida (comprimento de onda)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	19
1.2 HIPÓTESES	20
1.3 OBJETIVOS	21
1.3.1 Objetivos gerais	21
1.3.2 Objetivos específicos	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 PROBLEMAS AMBIENTAIS CAUSADOS POR DERIVADOS DE PETRÓLEO.....	23
2.1.1 Contaminação de águas subterrâneas por compostos derivados do petróleo	24
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA	26
2.2.1 Cubatão e a industrialização	28
2.2.2 O homem e o BTEX	29
2.3 TOXICOLOGIA DO BTEX.....	30
2.4 O USO DE MICRO-ORGANISMOS NO TRATAMENTO DE ÁREAS CONTAMINADAS.....	31
2.4.1 Identificação de micro-organismos pela técnica do 16S	34
2.5 SANEAMENTO BÁSICO, UM PROBLEMA EM CUBATÃO.....	35
2.5.1 Resíduos sólidos domiciliares	35
2.5.2 Água	35
2.5.3 Esgoto urbano.....	36
2.6 PERCEPÇÃO DOS PROBLEMAS AMBIENTAIS.....	37
2.6.1 Divulgação e cultura científica	38
2.6.2 A educação ambiental como ferramenta para discussão de políticas públicas	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO	43
3.1.1 Caracterização da área	44
3.1.1.1 Isolamento de micro-organismos resistentes	45

3.1.2	Identificação de micro-organismos de interesse.....	45
3.1.2.1	Amplificação do 16S	45
3.1.2.2	Teste Bioquímico do API	46
3.1.2.3	Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas MALDI-TOF	46
3.1.3	Ensaio de biodegradação do BTEX , BTE e gasolina comercial	47
3.1.3.1	Biodegradação por batelada	48
3.1.3.2	Análise em cromatografia gasosa	49
3.1.4	Crescimento Celular	49
3.1.5	Relação entre Absorbância e Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	49
3.1.6	Determinação da via de clivagem do catecol	50
3.1.7	Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	50
3.2	DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA.....	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	ANÁLISE DO SOLO	53
4.2	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO	54
4.2.1	Teste Bioquímico do API NE <i>Biomerieux</i> ®	54
4.2.2	Sequenciamento do 16S	55
4.2.3	Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas MALDI-TOF	58
4.3	DEGRADAÇÃO DE BTEX E SEUS INTERMEDIÁRIOS.....	59
4.3.1	Biodegradação do BTE	59
4.3.2	Biodegradação do BTEX	61
4.3.3	Biodegradação da gasolina comercial	63
4.3.4	Identificação e biodegradação de intermediários.....	66
4.3.5	Relação entre Absorbância e Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	68
4.3.6	Determinação da via de clivagem do catecol	71
4.3.7	Demanda Biológica de Oxigênio	73
4.4	DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA.....	76
5	CONCLUSÕES.....	78
6	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO

A questão do gerenciamento dos passivos ambientais tem sido tema difundido no Brasil e no mundo, e debatido com muita frequência no meio empresarial por envolver despesas elevadas e dificuldades de caráter legal.

No Brasil, a disposição de resíduos sólidos industriais no solo foi praticada de forma descontrolada e sem qualquer restrição, fato este que perdurou durante décadas, devido à falta de uma política ambiental efetiva. Resta agora, proceder ao tratamento e remediação de tais áreas contaminadas, de modo a minimizar os impactos sobre o meio ambiente e a saúde humana. Para o tratamento de áreas contaminadas, mais especificamente de solos contaminados, diversas são as tecnologias e metodologias empregadas, seja pela incorporação de um agente biológico, capaz de degradar os contaminantes de interesse, seja por via química, capaz de converter o contaminante a formas menos tóxicas (ANDRADE et al., 2010). A escolha da tecnologia para o tratamento depende do conhecimento sobre o local afetado, da dinâmica do contaminante, do solo e, sobretudo, do uso futuro previsto para a área.

A remediação de solos contaminados com derivados de petróleo geralmente utiliza três processos convencionais: imobilização, separação ou destruição do contaminante. A imobilização ou isolamento consiste na criação de barreiras físicas visando evitar a migração de contaminantes, sendo considerada uma técnica de alta praticidade e baixo custo. A separação consiste na extração do contaminante e na transferência deste para uma fase de gerenciamento mais fácil (líquida ou gasosa). Já a destruição do contaminante, segundo Higarashi (1999), é o processo pelo qual se consegue mineralizar as moléculas dos contaminantes convertendo-as em substâncias inócuas, no entanto, nem sempre isto ocorre e, algumas vezes, há degradação incompleta com a geração de intermediários indesejáveis.

Entre as técnicas de remediação de solos contaminados, uma que vem se destacando ao longo dos últimos anos, é a biorremediação, técnica que se utiliza de organismos vivos

(plantas, fungos ou micro-organismos) para a recuperação de sítios contaminados. De modo geral, a biorremediação baseia-se na degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade de micro-organismos presentes ou adicionados no local de contaminação (BERNOTH et al., 2000). Isso porque, os micro-organismos são seres com uma grande versatilidade catabólica, que desenvolveram estratégias para obtenção de energia a partir de praticamente todos os compostos e desempenham um papel crucial no desenvolvimento sustentável da biosfera e no ciclo biogeoquímico. A abundância de micro-organismos, juntamente com a sua grande capacidade para a transferência horizontal de genes e suas altas taxas de crescimento, lhes permite evoluir rapidamente e se adaptar às condições do ambiente em mudança, até mesmo para ambientes extremos que não permite a proliferação de outros organismos vivos. A grande diversidade genética dos micro-organismos é o grande responsável por suas versatilidades metabólica (DE LORENZO, 2011; TIMMIS & PIEPER, 1999; LOVLEY, 2003).

Devido a essa grande variedade encontrada nos micro-organismos, existem espécies capazes de desenvolvimento em ambientes altamente hostis, como em altas temperaturas (KUROSAWA et al., 2005) ou ambientes degradados pelo homem (HENDRICKX et al., 2005; FAHY et al., 2008).

Em ambientes com alta concentração de substâncias tóxicas, como ambientes expostos ao BTEX (benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos), foi comprovado que comunidades de micro-organismos estavam se desenvolvendo no local (WANG et al., 2008). Este estudo em particular aconteceu no porto de Xiamen, importante porto internacional em Taiwan, comprovando que determinados organismos presentes nas águas poluídas com derivados de petróleo possuíam a capacidade de crescimento naquelas condições.

1.1 PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

Em decorrência de uma industrialização desordenada e sem planejamento, a região de Cubatão sofreu com os impactos ambientais decorrentes destas ações. Diante deste fato, a

região de Cubatão chegou a níveis alarmantes de poluição atmosférica e do solo e, entre os contaminantes de solo mais comuns e que ainda persistem até os dias de hoje, devido à alta concentração de indústrias na região, estão os derivados de petróleo, entre eles os BTEX. Em relação ao tratamento destes compostos, os processos biológicos ainda são a melhor opção, em termos de custo-benefício. Porém, este tratamento apresenta melhor eficácia quando realizado com os próprios micro-organismos presentes na região contaminada (isolamento).

Os micro-organismos estão presentes nos mais diversos ambientes em grande quantidade de espécies e representantes, sendo a forma de vida mais abundante no solo. Um grama de solo pode conter 109 procariotos e mais de 2000 tipos de genoma (SCHLOSS et al., 2003). Em solos contaminados, este número pode ser reduzido, porém os micro-organismos presentes tornam-se especializados em obter energia a partir dos compostos poluentes.

1.2 HIPÓTESES

Águas poluídas com BTEX, quase sempre são resultadas da percolação destes compostos através do solo previamente contaminado. Na região de Cubatão, muitas vezes esta água é utilizada pelas comunidades de baixa renda, para fins domésticos e/ou recreacionais, representando um sério risco à saúde desta comunidade. Além disso, pode contaminar toda a fauna aquática, que também pode ser consumida pela comunidade.

A conscientização desta comunidade, através de educação ambiental, é a única maneira de esclarecer os riscos aos quais as pessoas estão expostas e prevenir possíveis danos à saúde humana.

Pelo conhecimento da população, através de educação ambiental, das possíveis consequências do uso de águas sem tratamento, a comunidade terá suporte para exigir junto aos órgãos governamentais um maior comprometimento, no sentido de preservar e recuperar o ambiente. A partir desta conscientização, acredita-se que haja uma maior responsabilidade em relação ao uso destas águas.

Diante dos impactos socioambientais causados pelo BTEX, faz-se necessário desenvolver tecnologias de remediação destes compostos. Uma importante ferramenta utilizada para degradar estes compostos, é o uso de micro-organismos que os utilizam como fonte de carbono.

O isolamento de micro-organismos naturalmente presentes em solo contaminado aumenta significativamente a chance de sucesso da técnica de biorremediação. A biorremediação é uma metodologia atrativa e confiável para o tratamento de solos e cursos d'água contaminados, considerando-se muito eficiente, além de econômica, versátil e principalmente por causar uma menor perturbação ao ambiente, já que é um sistema de estimulação de processos naturais de remediação (BENTO, 2008).

A biorremediação *in situ* é uma técnica desenvolvida para restaurar áreas poluídas. Ela se utiliza dos micro-organismos já adaptados aos locais poluídos e aperfeiçoa o ambiente para a máxima atividade destes. Em ambientes poluídos com BTEX, é uma técnica bastante utilizada para recuperar solos e aquíferos afetados com hidrocarbonetos (LOVLEY, 2001; BALDWIN et al., 2008).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo esclarecer os impactos ambientais causados pelos contaminantes provenientes do processamento do petróleo, em particular o BTEX, às comunidades que utilizam águas contaminadas com estes compostos, diretamente ou indiretamente, através da cadeia alimentar. A idéia foi iniciar uma ação de esclarecimento junto à sociedade e também de prestação de serviço público, diagnosticando os principais problemas enfrentados por esta população, permitindo que suas atitudes sejam tomadas

conscientemente, ou seja, conhecendo a realidade do ambiente a sua volta. Esta atitude será útil para que os tomadores de decisões ajam em benefício das populações locais e da preservação da natureza. Informações científicas foram disseminados a fim de que possam subsidiar os tomadores de decisões e, sobretudo prover conhecimento à população.

1.3.2 Objetivos específicos

Neste trabalho, isolamos e identificamos linhagens de micro-organismos presentes em um sítio contaminado por BTEX e avaliamos a capacidade destes micro-organismos em biodegradar BTEX, visando uma futura aplicação no processo de biorremediação.

Também promovemos a divulgação através de curso ministrado nas dependências do CEPEMA- POLI- USP e da ETEC Cubatão, e divulgação do trabalho em meios de comunicação mais acessíveis, como jornais e internet, visando à conscientização da população em relação ao uso de águas sem tratamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tendo em vista a complexidade do tema, os aspectos sociais e a diversidade de fatores físico-químicos e biológicos atuantes em áreas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo, a revisão bibliográfica foi realizada objetivando demonstrar de forma sucinta o comportamento dos hidrocarbonetos de petróleo, os processos de biodegradação e como eles afetam diretamente a população.

2.1 PROBLEMAS AMBIENTAIS CAUSADOS POR DERIVADOS DE PETRÓLEO

Os problemas ambientais podem decorrer do impacto da urbanização predatória sobre o ecossistema (JACOBI, 1999). Com a crescente preocupação em relação aos impactos ambientais provenientes das atividades industriais, resultantes do sistema econômico-social contemporâneo, surge a necessidade de ações proativas na tentativa de se diminuir potenciais desequilíbrios ao meio ambiente ou, no caso de impactos já identificados, ações corretivas para que as consequências da poluição sejam, na medida do possível, revertidas e/ou melhor controladas. Um dos problemas evidentes consiste nos contaminantes provenientes de áreas onde há a exploração e/ou o processamento de petróleo. A poluição do solo com hidrocarbonetos é um problema que afeta regiões de destilação e uso de derivados de petróleo. Seus derivados, dentre eles o grupo de hidrocarbonetos denominado de BTEX, apresentam grande risco a comunidades próximas a esses locais. BTEX é o acrônimo para o grupo de hidrocarbonetos monocíclicos aromáticos que é constituído por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos. Ele representa parte dos produtos do petróleo, sendo o principal componente da fração solúvel em água. Geralmente, estas substâncias contaminam o solo, aquíferos, lagos e mares em regiões onde se processa o petróleo (SCHNEIDER et al., 2006;

WANG et al., 2008) trazendo grandes danos ao ambiente e se tornando um dos maiores problemas onde tal processamento ocorre. Além dos danos ambientais, já é conhecido que esses elementos são potencialmente cancerígenos, podendo causar leucemia e mieloma, e quanto maior a exposição a essas substâncias, maior é o risco de desenvolvimento dessas doenças (CONSTANTINI et al., 2008; DUTTA et al., 2008).

2.1.1 Contaminação de águas subterrâneas por compostos derivados do petróleo

A água subterrânea tem se tornado uma fonte alternativa de abastecimento de água para o consumo humano. Isto devido tanto à escassez quanto à poluição das águas superficiais, tornando os custos de tratamento, em níveis de potabilidade, cada vez mais elevados. As águas subterrâneas se apresentam em quantidades muito maiores que as superficiais (cerca de 25 vezes mais), porém nem sempre estão disponíveis e estão intimamente relacionadas com as águas superficiais e com as fontes de contaminação relacionadas ao solo e às águas superficiais. Em geral, as águas subterrâneas são potáveis e dispensam tratamento prévio, pois os processos de filtração e depuração do subsolo promovem a purificação da água durante a sua percolação no meio, tornando-se uma fonte potencial de água de boa qualidade e baixo custo, podendo sua exploração ser realizada em áreas rurais e urbanas (SILVA et al., 2002).

A escassez e a poluição dos recursos hídricos, entretanto, têm consequências sociais, econômicas e ambientais, pois:

- Comprometem o equilíbrio dos ecossistemas, dificultando a conservação da flora e da fauna e a diluição de efluentes;
- Provocam doenças por causa da má qualidade ou pela falta de água em quantidade suficiente para as necessidades mínimas;
- Impedem o desenvolvimento socioeconômico, ao prejudicarem as atividades de recreação e pesca e as propostas paisagísticas; o desenvolvimento industrial, ao dificultar a geração de energia elétrica, refrigeração de máquinas, produção de alimentos, navegação e

turismo; e o desenvolvimento da agricultura, ao dificultar a produção de cereais, frutas e hortaliças (PHILLIPI JR. e MARTINS, 2005).

Porém, mesmo as águas subterrâneas podem ter sua qualidade afetada pela presença de contaminantes nocivos no solo. Estes contaminantes são substâncias perigosas que apresentam uma ou várias características físico-químicas ou tóxicas ao organismo humano ou meio ambiente, como por exemplo: substâncias mutagênicas, cancerígenas, infecciosas, etc. (SHIANETZ, 1999). Um esquema de contaminação por vazamento de tanque de armazenamento de combustível é mostrado na figura 1. Onde o desenho A mostra um vazamento que ocorre geralmente em tanques de postos de combustíveis onde os tanques de armazenamento são subterrâneos. Esse tipo de contaminação afeta o subsolo e a camada saturada (azul). Existe a formação de uma fase livre e uma fase dissolvida que percorre grandes distâncias podendo contaminar outros locais. E o B exemplifica um vazamento de tanque de armazenamento de combustível sobre o solo. Quando ocorre este tipo de vazamento, existe a contaminação superficial do solo formando uma fase livre e uma fase adsorvida. A fase livre superficial pode penetrar no subsolo e formar outra fase livre e uma fase dissolvida na camada saturada do subsolo. Em ambos os casos ocorrem uma contaminação do solo, água e ar através da volatilização do BTEX (figura 1).

No caso de derivados de petróleo, os maiores problemas de contaminação são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos, que são os constituintes mais solúveis e mais móveis da fração da gasolina. Estes hidrocarbonetos monoaromáticos, tais como benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (orto-, meta-, para-), denominados “BTEX”, são poderosos depressores do sistema nervoso central, apresentando toxicidade crônica, mesmo em pequenas concentrações (da ordem de $\mu\text{g.L}^{-1}$). O benzeno é reconhecidamente o mais tóxico de todos os BTEX. Trata-se de uma substância comprovadamente carcinogênica (podendo causar leucemia, ou seja, câncer dos tecidos que formam os linfócitos do sangue), se ingerida, mesmo em baixas concentrações durante períodos não muito longos de tempo. Uma exposição aguda (altas concentrações em curtos períodos) por inalação ou ingestão pode causar até mesmo a morte de uma pessoa (SILVA et al., 2002).

Figura 1- Esquema de duas diferentes contaminações de BTEX no solo (KAROLSKY, 2012 – comunicação pessoal).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA

A Zona Industrial está situada na porção norte do município de Cubatão, na região sudeste do estado de São Paulo. Segundo Augusto Filho et al.(1988), a área está situada numa região que compreende um relevo de transição entre o Planalto Atlântico e a Baixada Santista, representados respectivamente pela Serra de Cubatão e por uma planície com complexa rede de drenagens da bacia hidrográfica do Rio Cubatão. O clima é tropical com variações quente e úmido, verificando-se também a existência de microclimas ocasionados pela variação do relevo (TORRES et al., 2002). De acordo com a Cetesb (1985), a umidade relativa do ar é da

ordem de 70 a 90%. Devido ao efeito orográfico, nas escarpas da Serra do Mar a pluviosidade média anual é em torno de 4.000 mm, enquanto nas zonas mais baixas é de 2.500 mm (IPT,1985). A cidade de Cubatão até 2009 ainda não tinha uma legislação que definisse quais os bairros e os seus limites ou suas denominações oficiais. Assim, áreas de invasão, conjuntos residenciais construídos pela iniciativa pública ou empresas particulares, simples quarteirões, antigos "bairros" operários, às vezes com mais de uma denominação, acabam sendo genericamente chamados de bairros, mas após o Decreto nº 9.410 de 15 de setembro de 2009 (ANEXO B) os bairros foram regularizados como “Unidades de Pesquisa e Estatística” e classificados em “Unidades Espaciais Urbanas”, “Unidades Espaciais Transitórias”, “Unidades Espaciais Ambientais” e “Unidades Espaciais Industriais”, como a tabela a seguir:

Tabela 1- Abairramento de Cubatão segundo o Decreto nº9.410 de 2009.

Legenda	Denominação	Classificação
UEPE 1	Vila Elizabeth	U.E. Urbanas
UEPE 2	Sítio Cafezal	U.E. Urbanas
UEPE 3	Jardim Anchieta	U.E. Urbanas
UEPE 4	Jardim São Francisco	U.E. Urbanas
UEPE 5	Centro	U.E. Urbanas
UEPE 6	Vila Couto	U.E. Urbanas
UEPE 7	Santa Rosa	U.E. Urbanas
UEPE 8	Vila Nova	U.E. Urbanas
UEPE 9	Vila Natal	U.E. Urbanas
UEPE 10	Vila São José	U.E. Urbanas
UEPE 11	Jardim Nova República	U.E. Urbanas
UEPE 12	Parque São Luís	U.E. Urbanas
UEPE 13	Jardim Casqueiro	U.E. Urbanas
UEPE 14	Ilha Caraguatá	U.E. Urbanas
UEPE 15	Vale Verde	U.E. Urbanas
UEPE 16	Vila Fabril	U.E. Urbanas
UEPE 17	Vila Light	U.E. Urbanas
UEPE 18	Pinhal do Miranda	U.E. Transitórias
UEPE 19	Cota 200	U.E. Transitórias
UEPE 20	Itutinga-Pilões	U.E. Transitórias
UEPE 21	Vila Esperança	U.E. Transitórias
UEPE 22	Vila dos Pescadores	U.E. Transitórias
UEPE A	Serra Pilões-Zanzalá	U.E. Ambientais

UEPE B	Caminho do Mar	U.E. Ambientais
UEPE C	Parque Perequê	U.E. Ambientais
UEPE D	Serra do Poço do Meio	U.E. Ambientais
UEPE E	Serra do Mogi	U.E. Ambientais
UEPE F	Serra do Morrão	U.E. Ambientais
UEPE G	Areais	U.E. Ambientais
UEPE H	Guará-Vermelho	U.E. Ambientais
UEPE I	Ilha Pombeva	U.E. Ambientais
UEPE J	Ilha do Tatu	U.E. Ambientais
UEPE K	Volta do Santana	U.E. Ambientais
UEPE L	Ilha Nhapium	U.E. Ambientais
UEPE M	Cotia-Pará	U.E. Ambientais
UEPE N	Paranhos	U.E. Ambientais
UEPE O	Marzagão	U.E. Ambientais
UEPE P	Mãe Maria	U.E. Ambientais
UEPE IND 1	Cruzeiro Quinhentista	U.E. Industriais
UEPE IND 2	Perequê	U.E. Industriais
UEPE IND 3	Raiz da Serra	U.E. Industriais
UEPE IND 4	Piaçaguera	U.E. Industriais

2.2.1 Cubatão e a industrialização

Os altos índices de poluição observados entre a década de 70 e começo dos anos 80 em Cubatão-SP fizeram com que a cidade ganhasse fama nacional e internacional de cidade mais poluída do mundo, e devido a sua geomorfologia, foi até chamada de “Vale da Morte”. A poluição desenfreada da cidade começou após a Grande Depressão Econômica Mundial de 1929, quando o governo federal passou a concentrar esforços na industrialização do País.

A partir da década de 1930, o então presidente Getúlio Vargas concentrou esforços para a instalação de indústrias de base no País (BORGES et al., 2002), principalmente no estado de São Paulo. Nesse contexto, a partir de 1955, aconteceu o estabelecimento sistemático de indústrias de porte no município de Cubatão. A escolha dessa região se deu exclusivamente pela sua posição geográfica privilegiada: proximidade com o porto de Santos

e a capital, obtenção de energia abundante e barata, além das condições favoráveis do sistema viário e ferroviário (BORGES et al., 2002).

Tal escolha, transformou Cubatão em um desastre ambiental, decorrente não apenas do caráter dos seus processos industriais, mas também e principalmente devido a fatores geográficos (HOGAN, 1990) pois a baixa velocidade dos rios, a interrupção dos fluxos naturais por drenagem e os aterros impedem que os resíduos despejados na água sejam facilmente levados ao mar aberto e a consequência disto foi o envenenamento do estuário com todo o tipo de substância tóxica (AMARAL E SILVA et al., 1982).

2.2.2 O homem e o BTEX

As principais fontes ambientais de benzeno produzidas pelo homem incluem as emissões industriais, gases da exaustão de automóveis e abastecimento de veículos automotores (FUNDACENTRO, 1996). A partir da Segunda Guerra Mundial, o benzeno e outros hidrocarbonetos aromáticos passaram a ser obtidos do petróleo, sendo este hoje sua principal fonte, do qual se extraem frações com maior grau de pureza. Os processos carboquímicos das siderúrgicas perderam importância econômica, mas, no entanto, são os que mais preocupam do ponto de vista de contaminação ambiental. Os hidrocarbonetos aromáticos, entre eles o benzeno, são considerados subprodutos da destilação do gás de coqueria e com baixo valor comercial. Por esta razão, em geral, há pouca prioridade de manutenção das unidades de fornos de baterias de coquerias, bem como de linhas de gás (AUGUSTO & NOVAES, 1999).

Desta forma, a poluição ambiental no interior dessas plantas industriais é grande, sem controle e submete os trabalhadores à exposições contínuas ao benzeno (NOVAES, 1992; BARBOSA, 1997). Desde 1987, o Brasil é exportador deste produto e de seus derivados e tem apresentado uma curva crescente de produção, o que implica em aumento dos riscos para os trabalhadores das empresas produtoras (FUNDACENTRO, 1981, 1988, 1993).

Os aquíferos podem ser contaminados diretamente ou indiretamente, uma vez que pelo fato destas substâncias serem solúveis em água, acabam se espalhando para diversos ambientes e contaminam principalmente reservas de água em aquíferos através da permeabilidade do solo. O uso destas reservas contaminadas pode causar intoxicação e aumentar as chances de desenvolvimento de câncer devido à atividade carcinogênica de BTEX (HENDRICKX et al., 2005; SCHNEIDER et al., 2006; CONSTANTINI et al., 2008). É importante salientar que determinados problemas apresentam uma gravidade tão grande que a exata mensuração dos seus efeitos pode demorar até trinta anos após a ocorrência da contaminação, já que os resíduos tóxicos podem penetrar no solo e atingir o lençol freático da região, espalhando seus efeitos em profundidade e tamanho não-estimáveis (MOISA, 2005).

O cidadão em geral, não tem a mínima noção do que sejam estes contaminantes e o grande perigo que representam. Milhares de residências têm sido construídas sobre resíduos perigosos que continuam ativos, emitindo vapores, gases e/ou contaminando o lençol freático (FISCHER, 2006). Em particular, na região de Cubatão, o problema se agrava com o uso indevido de águas de rios e riachos, que não possuem nenhum tipo de tratamento. Muitas vezes, o ponto de coleta de água, situa-se ao lado da origem da contaminação.

2.3 TOXICOLOGIA DO BTEX

BTEX constituem um grande problema, pois esses compostos aromáticos são tóxicos tanto ao meio ambiente como ao ser humano, nos quais atuam como depressores do sistema nervoso central e apresentam toxicidade crônica mais significativa que os hidrocarbonetos alifáticos (também presentes no petróleo e derivados), mesmo em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (WATTS et al., 2000). O benzeno é reconhecidamente o composto mais tóxico dentre os BTEX e, por isso, pode ser apontado como o agente mais preocupante no tocante à saúde pública (ANDRADE et al., 2010).

Estudos sobre os efeitos tóxicos das marés negras sobre a fauna marinha fizeram menção aos efeitos danosos do benzeno, tolueno e xilenos não só ao organismo humano, como também a outros seres vivos. As doses tóxicas são de 10 a 90 mg.L^{-1} para o benzeno e a

inalação de tolueno ou xilenos pode induzir distúrbios no modo de falar, na visão, audição, no controle dos músculos e outros, além de sugerirem a associação entre benzeno e xilenos e o surgimento de tumores cerebrais (TIBURTIUS et al., 2004). Estes poluentes influenciam sistemas endócrinos e enzimáticos, e quando ingeridos por organismos marinhos passam através da parede intestinal e se tornam parte da reserva lipídica. Quando dissolvidos no tecido adiposo, os hidrocarbonetos são preservados, porque estão protegidos do ataque microbiano, podendo ser transferidos da presa para o predador e, eventualmente, ao homem. Quando hidrocarbonetos aromáticos são incorporados pela flora e fauna, ligam-se às moléculas protéicas e ao tecido gorduroso, sendo transferidos através da cadeia alimentar, sem alterações da estrutura (TIBURTIUS et al., 2004).

Muitos seres expõem-se à contaminação por hidrocarbonetos derivados do petróleo por ingestão de cadáveres, ou de outros animais ou plantas que tenham acumulado hidrocarbonetos no seu organismo, em quantidades insuficientes para causar lesão a estes organismos, mas pode trazer sérias implicações para a pesca e a saúde pública (TIBURTIUS et al., 2004).

2.4 O USO DE MICRO-ORGANISMOS NO TRATAMENTO DE ÁREAS CONTAMINADAS

O BTEX por serem altamente tóxicos são de difícil degradação, contaminando as áreas onde se encontram por vários anos. Estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar meios de degradação desses hidrocarbonetos para minimizar sua presença no ambiente por meio da biodegradação, ou seja, degradação através de vias metabólicas presentes em determinados micro-organismos que utilizam os hidrocarbonetos em questão como fonte de energia, transformando estes compostos em gás carbônico e água (DOU et al., 2008; PHALE et al., 2007; FAHY et al., 2008). Estes organismos conseguem se desenvolver na presença desses hidrocarbonetos e são geralmente encontrados em ambientes terrestres e aquáticos poluídos com essas substâncias.

Na ausência de oxigênio, a degradação de BTEX anaeróbica utiliza micro-organismos que conseguem quebrar o anel aromático dos hidrocarbonetos e utilizar sulfatos e nitratos comoceptor final de elétrons provindos desta quebra (DOU et al., 2008). Os micro-organismos anaeróbicos são bastante importantes, destacando-se nos últimos anos, devido à forma de contaminação que ocorre em locais expostos ao BTEX. Como estes hidrocarbonetos são bastante solúveis eles acabam penetrando no subsolo, local com pouco oxigênio disponível, ficando impossível a atividade de micro-organismos aeróbicos que utilizam este gás comoceptor final de elétrons. Já os micro-organismos anaeróbicos, conseguem degradar os hidrocarbonetos nos locais sem oxigênio atuando em uma área muito maior do local contaminado (LOVLEY, 2001).

Já em locais onde o oxigênio está presente em abundância, uma degradação aeróbica acontece. Nestes locais estão presentes bactérias aeróbicas estritas e anaeróbicas facultativas que possuem os genes que codificam para oxigenases (mono-oxigenase e dioxigenase), enzimas que atacam o anel aromático dos hidrocarbonetos através da adição de radicais hidroxilas (HENDRICKX et al., 2006) (figura 2).

Figura 2- Representação da atividade catabólica das enzimas mono-oxigenase, dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase em BTEX (HENDRICKX et al., 2006).

As monooxigenases e a dioxigenases acrescentam radicais hidroxilas ao anel aromático. Este primeiro ataque do anel aromático é o passo inicial para a clivagem do anel pela catecol 2,3-dioxigenase (meta clivagem) e pela catecol 1,2-dioxigenase (orto clivagem)

transformando-o em uma estrutura metabolizável pelo micro-organismo (TÁNCICS et al., 2008).

Os micro-organismos aeróbicos necessariamente utilizam o oxigênio comoceptor final de elétrons e em locais com escassez de oxigênio, a atividade desses micro-organismos fica restrita. Estes organismos naturalmente se encontram nas bordas dos locais poluídos em contato com o ar, não tendo a capacidade de agir em grandes distâncias em direção ao subsolo (LOVLEY, 2001).

Os micro-organismos aeróbios convertem os compostos aromáticos em um intermediário comum, o catecol. Este pode sofrer dois tipos de clivagem: *meta* ou *orto* clivagem, resultando em diferentes intermediários. No teste para detectar a via de degradação do catecol, observou-se que todas as bactérias que degradam o catecol, o fazem pela via *orto*-. A Figura 21 demonstra a transformação do benzeno em catecol, o qual é quebrado pelas dioxigenases, seguindo uma das duas vias, de acordo com o local da quebra do anel.

Figura 3 Transformação do Benzeno em catecol

Recentemente, com o avanço das técnicas de genômica, proteômica e metagenômica, pudemos compreender a diversidade metabólica dos organismos cultiváveis e não cultiváveis (SINGH, 2006). Fica evidente, através da Tabela 2, que a diversidade metabólica é devida à constituição genética de um micro-organismo particular. Genes envolvidos na biodegradação podem estar localizados no cromossomo hospedeiro, em plasmídeos conjugativos e não conjugativos, em plasmídeos lineares, transposons, elementos conjugativos integrados ou ilhas genômicas.

Tabela 2- Organismos conhecidos que metabolizam BTEX e a via metabólica utilizada.

Organismo	Localização/ tamanho/gene	Biodegradação (tipo de clivagem do anel aromático)	Referência
<i>Pseudomonas pickettii</i> PKO1	Cromossomo (26,5kb, 10 genes)	Tolueno, Benzeno, Fenol e Cresol (meta clivagem)	Kukor & Olsen, 1991
<i>Rhodococcus</i> sp. DK17	Plasmídeo (pDKI-380kb e pDK2-330kb)	Xilenos, Etil-benzeno, Benzeno, Tolueno, Fenol (meta clivagem)	Kim et al., 2002
<i>Burkholderia</i> sp. JS150	Genoma (14,3kb, 12 genes)	Tolueno, benzeno e cloro benzeno (meta clivagem)	Kahng et al., 2001
<i>Pseudomonas putida</i> MT-2	Transposon <i>Tn</i> 4651 (56kb)	Tolueno e xilenos (meta clivagem)	Sentchilo et al., 2000

2.4.1 Identificação de micro-organismos pela técnica do 16S

Na natureza, existe uma diversidade de micro-organismos ainda desconhecidos (STALEY & KONOPLA, 1985; HUGENHOLTZ et al., 1998; DOJKA et al., 1998; RONDON et al., 2000). Estima-se que aproximadamente de 1 a 10 % dos micro-organismos podem ser isolados por método cultura, em meio líquido ou sólido (BORNEMAN et al., 1996; KUSKE et al., 1997) e taxas relativamente baixas de novos micro-organismos têm sido caracterizados e cultivados atualmente (SEBAT et al., 2003). Não é surpreendente que poucas observações importantes, relacionadas com ecologia microbiana, antecederam as técnicas moleculares, visto que, antes destas terem sido desenvolvidas, as informações a respeito das comunidades microbianas eram coletadas diretamente do ecossistema ou dos micro-organismos isolados (ATLAS & BARTHA, 1998).

Apenas a partir da década de 80, houve um grande avanço nas metodologias moleculares desenvolvidas para análise da diversidade microbiana dos solos (AMANN et al., 1995; ZHOU et al., 1996; BORNEMAN & TRIPLETT, 1997; CULLEN & HIRSCH, 1998;

SANDAA & BARTHA, 1998) e tais protocolos se tornaram cada vez mais rotineiros (DROZDOWICZ, 1997).

A clonagem e sequenciamento do gene do DNA/RNA ribossomal (rDNA/rRNA) torna possível a identificação dos micro-organismos ainda desconhecidos ou não cultivados (BORNEMAN et al., 1996). Os estudos com o gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (ATLAS & BARTHA, 1998).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG et al., 1997; KUSKE et al., 1997; HENTSCHEL et al., 2002). Além disso, essas sequências parciais possuem algumas vantagens em relação às sequências completas, como redução do tempo de análise e diminuição do custo do trabalho.

2.5 SANEAMENTO BÁSICO, UM PROBLEMA EM CUBATÃO

2.5.1 Resíduos sólidos domiciliares

No município de Cubatão, funciona desde 2003 o aterro sanitário particular, localizado no município de Santos, no Sítio das Neves, o qual é muito bem operado e mantido. Nas áreas urbanizadas a coleta é diária, de aproximadamente 120 toneladas por dia e satisfaz a população. Embora exista uma coleta seletiva de lixo feita pelo grupo Defensores do Verde, composto por cerca de 30 pessoas, ela é insuficiente para as dimensões do município.

2.5.2 Água

O sistema de abastecimento de água e coleta e tratamento de esgotos nos municípios da Baixada Santista é de competência da Sabesp. A disponibilidade hídrica do município advém de dois mananciais: a do Rio Cubatão e a do Rio Pilões, que abastecem também os municípios de Santos, São Vicente e parte de Praia Grande, e, num futuro próximo, parte de Guarujá. Há duas estações de tratamento: ETA 3, com capacidade de 4.500 litros por segundo e ETA-Pilões, com capacidade de 600 litros por segundo.

A Sabesp possui 44 pontos de monitoramento fixos e diversos aleatórios. Nas áreas regularizadas, a maior parte dos domicílios recebe água potável, correspondendo à aproximadamente 40% da população do município. A exceção é o bairro Vale Verde, que não tem abastecimento de água potável. Nas áreas de ocupação irregular, a Sabesp não tem sistema de fornecimento de água potável, o que resulta que cerca de 60% da população não é atendida pelo sistema. Como a Sabesp não está autorizada a atender às áreas de ocupação irregular, a prefeitura vem executando o projeto Água Limpa, para alimentar os Bairros-Cota e outros, estimando-se que atenda a cerca 20 mil pessoas. O projeto se baseia na captação de água de várias nascentes, canalizadas através de mangueiras, armazenada em caixas d'água de 15 mil litros e distribuída através de ramais de diâmetros menores. A qualidade da água fornecida no projeto Água Limpa não tem controle adequado, já tendo sido constatada contaminação em alguns pontos, com risco para a saúde da população (AGENDA 21, 2005).

2.5.3 Esgoto urbano

Atualmente 35% do esgoto das áreas urbanas regulares do município é coletado e tratado por lagoa de aeração e decantação. A Sabesp está ampliando a lagoa de tratamento. Um problema enfrentado pela Companhia são ligações clandestinas de águas pluviais na tubulação de esgoto, provocando transbordamento e dificuldades no tratamento (AGENDA 21, 2005).

Não há qualquer tipo de coleta de esgotos nos bairros Cota, assim como em outras áreas de invasão como a Vila Esperança e a Água Fria, por exemplo, (figura 3) - o que provoca a contaminação de solos, córregos e do Rio Cubatão. Não há um sistema de controle

permanente da prefeitura sobre a qualidade do tratamento do esgoto, sendo que a Vigilância Sanitária só age quando há denúncia ou irregularidade aparente, ficando o controle a cargo exclusivo da Sabesp e sua fiscalização exercida pela Cetesb (AGENDA 21, 2005).

Figura 4- Mapa de Cubatão relacionando a localização dos bairros sem saneamento básico com o ponto de coleta de solo contaminado (FONTE: Google Earth, 2012).

2.6 PERCEPÇÃO DOS PROBLEMAS AMBIENTAIS

“O meio ambiente é o resultado das recíprocas relações entre sociedade e natureza num espaço e tempo concretos. O ambiente se gera e se constrói ao longo do processo histórico de ocupação e transformação do espaço por parte de uma sociedade”. (MEDINA, 1998). A relação existente entre o homem e o meio ambiente situa-se, assim, numa perspectiva estritamente utilitária voltada exclusivamente para a exploração econômica, trazendo sérios prejuízos à vida no nosso Planeta.

Percepção pode ser definida “como o processo de extrair informações”, ela é o centro da cognição ou aquisição de conhecimento; é o processo que leva o indivíduo a receber e extrair certas informações sobre o ambiente. (BACELAR, 1998). “A percepção dos problemas e das soluções varia entre os diferentes grupos sociais, mostrando a interpretação específica e particularizada dos fatores intervenientes” (JACOBI, 1999). Além de que o relacionamento “homem-natureza-sociedade” hoje em dia, não é feito de modo harmonioso, uma vez que o ser humano procura utilizar de modo não educado e ético os recursos naturais. A humanidade toma consciência dos referidos problemas e já avalia as consequências das catástrofes que têm atingido o ser humano trazendo sérias dificuldades à sustentabilidade, apresentando uma grande preocupação em relação às questões ambientais (CASTRO, 2003).

A Educação Ambiental é o principal meio de se conseguir uma mudança no comportamento das pessoas, em relação ao meio ambiente, o que é proporcionado através da formação e desenvolvimento de uma consciência ecológica voltada para o bem-estar da humanidade. Educação Ambiental é um processo lento, contínuo, pessoal, coletivo e exige perseverança. Observa-se que a criança de hoje já procura ter cuidado com o meio ambiente, parecendo já haver o início da formação de uma consciência ecológica, o que certamente trará futuramente melhores condições de vida para o ser humano (CASTRO, 2003).

2.6.1 Divulgação e cultura científica

No panorama mundial, há uma forte preocupação e um interesse crescente pela alfabetização científica. Muitos projetos estão sendo elaborados em função da necessidade de tornar mais acessíveis os conhecimentos científicos à população em geral.

Primeiramente, é necessário conceituar os termos alfabetização científica e letramento científico e tecnológico. Segundo Araujo et al. (2006) a alfabetização científica relaciona-se à aprendizagem dos conteúdos e enunciados científicos, enquanto que, segundo Santos e Mortimer (2001), “letramento científico e tecnológico seria a condição de quem não apenas reconhece a linguagem científica e tecnológica, mas cultiva e exerce práticas sociais que usam tal linguagem”.

Há divergências na utilização dos termos “alfabetização científica” e “cultura científica”, pois segundo Vogt e Polino (2003) a cultura científica centra-se nos grupos de interesse científico, processos coletivos estruturados em torno de sistemas de comunicação e difusão da ciência enquanto que, a alfabetização científica centra-se no indivíduo. Já John Durant (2005) apresenta três abordagens de alfabetização científica (o conhecimento científico, o método científico e o que, no conceito de Vogt e Polino poderia ser chamado “cultura científica”).

O ponto de vista de Durant sobre a terceira abordagem da alfabetização científica que “vai além da ciência como um processo idealizado, levando em conta a Ciência como uma prática social” (DURANT, 2005) é complementado por Araujo et al. (2006), dizendo ser:

importante desmistificar a representação social da Ciência como verdade absoluta, feita por gênios, fruto de descobertas pessoais, em que o processo de produção do saber científico é idealizado e distorcido. O desafio é permitir que o público entenda a Ciência como uma construção humana, dinâmica, falível e compreenda o complexo caminho por onde passa um conhecimento científico antes de ser aceito pela comunidade científica de forma consensual e de se tornar apto a ser divulgado.

A partir dessa posição podemos entender que o importante a ser levado à população é a forma com que a ciência é “produzida”, ou seja, falseável e refutável antes mesmo de ser aceita como “senso comum”.

Até o século XV a divulgação científica na Europa era restrita, após o surgimento da tipografia a informação começou a ser divulgada através de livros, mas as descobertas ainda eram restritas por cartas. Até os anos 90 houve um crescimento exponencial na quantidade de periódicos publicados e após este período, entramos na era da internet onde as informações são mais eficientemente propagadas do que as impressas. O acesso às informações não

garante que se possa transformá-las em conhecimentos, porém é preciso que haja uma participação ativa do sujeito, procurando explicitar as relações que compõem essas informações e significando-as a partir dos conhecimentos, gerando novas formas de representá-los (ARAÚJO et al., 2006).

Hoje em dia não há mais espaço somente para a escola tradicional, sendo de extrema importância o uso de outras formas de se obter informação (TV, internet, jornais e revistas) além da sala de aula, pois não é possível simplesmente “blindar” o espaço escolar e se fechar para a “avalanche de informações” que são encontradas nos espaços não escolares. Por isso, há uma grande preocupação com a qualidade das informações e muitos pesquisadores procuram investigar de que maneira é possível associar informação e conhecimento de forma complementar e não excludente.

Este trabalho espera levar à população o conhecimento científico aqui contido, transpondo didaticamente os assuntos abordados, não somente alfabetizando-os cientificamente, mas também os inserindo ativamente na cultura científica.

2.6.2 A educação ambiental como ferramenta para discussão de políticas públicas

A crise ambiental e os riscos globais do século XXI, além dos medos e angústias gerados na vida social, exigem dos governos (com planejamento e formulação de políticas públicas) e da sociedade civil (com a mobilização de suas organizações) ações concretas de enfrentamento para garantir a continuidade da vida na Terra. As políticas públicas da educação no Brasil fomentadas pelo Órgão Gestor (OG) da Política Nacional de Educação Ambiental vêm levando em consideração uma educação ambiental crítica, participativa, transformadora e emancipatória, em sintonia com os princípios do “Tratado de Educação Ambiental para Sociedades Sustentáveis e Responsabilidade Global”.

Pela educação, podemos aprender a prevenir e enfrentar os riscos globais, a reinventar a política e a cidadania, com profundas mudanças nas formas de pensar e nos estilos de vida. Longe de enfatizar visões catastróficas e sua “profecia da ruína”, procura-se compreender a

ambivalência da modernidade e a necessidade de políticas públicas educacionais capazes de enfrentar os grandes desafios postos contemporaneamente a partir de uma perspectiva sistêmica. A educação ambiental forma e prepara cidadãos para a reflexão crítica e para uma ação social corretiva ou transformadora do sistema, e torna viável o desenvolvimento integral dos seres humanos (PHILIPPI & PELICIONI, 2005).

Jacobi (2003) reflete sobre a discussão da complexidade ambiental, que abre uma estimulante oportunidade para compreender a gestação de novos atores sociais que se mobilizam para a apropriação da natureza, para um processo educativo articulado e compromissado com a sustentabilidade e a participação, apoiado numa lógica que privilegia o diálogo e a interdependência de diferentes áreas de saber, mas também questiona valores e premissas que norteiam as práticas sociais prevalecentes, implicando mudança na forma de pensar e transformação no conhecimento e nas práticas educativas. Práticas educativas essas, que possibilitam uma relação entre os saberes e baseiam-se em um processo educativo articulado, utilizando a participação coletiva como principal ferramenta de questionamento de políticas públicas.

A Política Nacional de Educação Ambiental (PNEA) - instituída pela Lei nº 9.795/99 - e seu decreto de regulamentação em 2002 têm contribuído para acelerar o processo de institucionalização da Educação Ambiental no país, cujo marco inicial, pelo menos para o ensino formal, foi a Lei nº 6.938/81, a qual, ao instituir a Política Nacional de Meio Ambiente, determinou a inclusão da EA em todos os níveis de ensino.

Desde 2002, com a regulamentação da PNEA, o Programa Nacional de Educação Ambiental (ProNEA) propõe fortalecer o Sistema Nacional de Meio Ambiente, por meio do qual a PNEA deve ser implementada em regime de colaboração com os entes da Federação. Sua missão é a de contribuir com a educação para a sustentabilidade, para uma sociedade educada ambientalmente. Uma das diretrizes do Programa Nacional de Educação Ambiental diz respeito ao aperfeiçoamento e fortalecimento dos sistemas de ensino, de meio ambiente e de outros que tenham interface com a EA. As outras valorizam a transversalidade e interdisciplinaridade; a descentralização espacial e institucional; a sustentabilidade socioambiental; e a democracia e participação social.

A educação ambiental surge como uma das possíveis estratégias para o enfrentamento da crise civilizatória de dupla ordem, cultural e social. Sua perspectiva crítica e emancipatória visa à deflagração de processos nos quais a busca individual e coletiva por mudanças culturais e sociais estão dialeticamente indissociadas. A articulação de princípios de Estado e comunidade, sob a égide da comunidade, coloca o Estado como parceiro desta no processo de transformação do *status quo* situado, segundo Boaventura de Souza Santos, como um “novíssimo movimento social”. No campo ambiental, o Estado tem crescido em termos de marcos regulatórios, sem uma capacidade operacional que condiga com a demanda em vista da redução do Estado (década de 1990) e da ausência de reformas que não sejam a do Estado mínimo. À educação ambiental cumpre, portanto, contribuir com o processo dialético Estado-sociedade civil que possibilite uma definição das políticas públicas a partir do diálogo.

Neste contexto, o cidadão comum do município de Cubatão, que em geral desconhece os problemas ambientais que o cercam, incluindo a exposição à contaminantes como o BTEX e o perigo que representam, poderia a partir deste conhecimento tomar uma postura diferente em relação aos tomadores de decisão, e visar melhorias no saneamento básico da cidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTOS EM LABORATÓRIO

O projeto foi realizado no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (CEPEMA-POLI-USP) na cidade de Cubatão, São Paulo, seguindo o fluxograma da figura 4.

Figura 5- Fluxograma das atividades desenvolvidas em laboratório, adaptadas de Avanzi (2009).

O local contaminado possui histórico de derramamento de combustível automotivo de um tanque de armazenamento. O local do tanque foi drenado após o derramamento ocorrido em 2008 e desde então monitorado. Não houve desenvolvimento de um tratamento de remediação no local além da drenagem imediata.

3.1.1.1 Isolamento de micro-organismos resistentes

As amostras de solo foram utilizadas para o isolamento dos micro-organismos ali presentes utilizando o protocolo adaptado de Avanzi (2009). A seleção de micro-organismos tolerantes e com potencial para utilização do BTEX como fonte de carbono, foi realizada através da inoculação de uma amostra de solo em meio mínimo mineral (10 mL de FeSO_4 a 1 mM, 1mL de MgSO_4 a 1 M, 0,5 mL de CaCl_2 a 1M e 10 mL de M2 - NH_4Cl 5g, Na_2HPO_4 17,4g, KH_2PO_4 10,6g) contendo 25 mg.L^{-1} de BTEX à temperatura ambiente. A avaliação do crescimento celular foi feita após 30 dias e os micro-organismos que cresceram nestas condições foram plaqueados em meio mínimo mineral sólido contendo concentrações crescentes de BTEX (até 50 mg.L^{-1} de BTEX).

3.1.2 Identificação de micro-organismos de interesse

3.1.2.1 Amplificação do 16S

Os micro-organismos foram identificados através de extração do DNA baseando-se no protocolo de Chen & Kuo (1993). A amplificação dos nucleotídeos do gene que codifica o RNAr 16S foi realizada através de PCR (reação de polimerase em cadeia) com o seguinte protocolo: $0,3 \mu\text{L}$ do DNA genômico, $0,2 \mu\text{L}$ da enzima Taq-polimerase (1 unidade), $5 \mu\text{L}$ do

tampão da enzima Taq (GE), 1 µL dNTPs (10mM), 1 µL do iniciador 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3'), 1 µL do iniciador 1401R (5'CGGTGTGTACAAGACCC3'). As amostras foram submetidas a 30 ciclos de 95°C por 1 min., 61°C por 30 s, 72°C por 50 s em um termociclador. A eficiência da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel contendo 1% de agarose, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). A sequência obtida do gene 16S foi analisada pelo sequenciador de DNA ABI modelo 310 A (Applied Biosystems) e o kit de sequenciamento ABI Prism (Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit, Perkin-Elmer).

3.1.2.2 Teste Bioquímico do API

O Kit API® 20 NE (Biomérieux) é composto por 20 provas bioquímicas para identificação de bactérias não fermentadoras, gram negativas, com oxidase positiva e não-entéricas. Estas galerias são comercializadas com fornecimento de software em que aparecem os valores de ID (porcentagem de segurança do micro-organismo identificado) e valor T (porcentagem de proximidade do micro-organismo identificado com cepa padrão). A amostra foi incubada a 30°C nos meios que compõe a galeria de provas, e realizada a leitura após 24 e 48 horas, sendo assim, os resultados são caracterizado como positivos e negativos, de acordo com o manual do fabricante.

3.1.2.3 Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas MALDI-TOF

Recentemente, uma nova metodologia de identificação de micro-organismos foi apresentada à comunidade científica. A identificação taxonômica através de espectrometria de massas tem sido realizada por MALDI-TOF (Matrix de dessorção a laser assistida

/ ionização), fornecendo perfis de proteínas de cada micro-organismo isolado, e os resultados, comparados com o banco de dados do equipamento.

A metodologia empregada foi a extração de ácido etanol / fórmico, que é sugerido pela *Bruker Daltonics*. Em resumo, as células de uma única colônia foram transferidas da placa e misturadas com cuidado para um tubo com 300 mL de água estéril. Foi adicionado etanol absoluto (900 mL) e centrifugado a 10.000 g por 2 minutos em temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante foi descartado e os pellets foram secos e misturados com 50 mL de ácido fórmico 70% e 50 mL de acetonitrila. A suspensão foi centrifugada a 10.000 g por 2 minutos e 1 mL do sobrenadante foi colocado sobre uma placa de 96 poços de aço polido e secas à temperatura ambiente (25°C). Cada amostra foi coberta com 1 mL da solução matriz (que consistia de uma solução saturada de um-ciano-4-hidroxi-ácido cinâmico em 50% acetonitrila trifluoroacético 2,5%), visando a preparação da amostra para a análise no equipamento.

As medidas foram realizadas com o equipamento LT Microflex espectrômetro de massas (*Bruker Daltonics*) usando software FlexControl (versão 3.0, *Bruker Daltonics*). Espectros foram gravados no modo linear positivo (frequência laser, 20 Hz; uma fonte de íons de tensão, 20 kV; fonte de íons dois tensão, 18,6 kV; tensão lente, 7,5 kV; faixa de massa, de 2000 a 20 000 Da). Para cada espectro, foram tiradas 240 fotografias e 50 tiros a partir de posições diferentes da mancha-alvo (modo automático) e analisadas.

Os espectros foram importados para o software Biotyper (versão 2.0, *Bruker Daltonics*), processados pelo modelo de correspondência com as configurações-padrão e os resultados foram apresentados em uma tabela de classificação. Essa classificação trata-se de um processo de correspondência de padrão proposto pelo fabricante Biotyper MALDI-TOF (MT), com pontuações que variam ID 0-3. Resultados menores de 1,70 foram considerados como baixa identificação; pontuações entre 1,7 e 1,9 foram consideradas como ID confiável para gênero, e pontuações maiores que 1,9 foram consideradas como ID confiável para identificação de espécies.

3.1.3 Ensaios de biodegradação do BTEX , BTE e gasolina comercial

As linhagens isoladas a partir de solos contaminados foram utilizadas nos ensaios de biodegradação que envolviam: crescimento celular, o consumo de BTE, BTEX e gasolina comercial, e identificação de seus intermediários.

3.1.3.1 Biodegradação por batelada

Confirmada a resistência destes micro-organismos ao BTEX, foram realizados ensaios em frascos simulando um biorreator, contendo 20% do volume total de cultura celular com absorbância 0,8 em $\lambda = 600\text{nm}$ (6 mL), BTEX (50 mg.L^{-1}) e meio mínimo mineral (volume final 30mL), além dos experimentos foi feito um controle negativo contendo apenas o contaminante e o meio mínimo afim de analisar a quantidade de composto volatilizado. As amostras ficaram em um agitador de bancada (Cientec mod. CT-712RN) à 30°C e agitação a 200 rpm por 30 dias. As condições de aeração e temperatura do experimento de batelada condiz com estudos anteriores feitos por Gracioso et al (2010), em que fixou as condições ótimas para a biodegradação de aromáticos. Diariamente, 1 mL da amostra foi retirado para análise.

A fim de testar a eficiência das cepas para biodegradar gasolina comercial, as células bacterianas provenientes do ensaio contendo BTE foram colhidas por centrifugação a 10.000 xg durante 20 minutos a 4°C em centrífuga Cientec de alta velocidade. Os sedimentos celulares foram lavadas duas vezes com 0,85% de NaCl para descartar o excesso de BTE ligado aos pellets celulares e foram transferidos para um balão de 50 mL com tampa de rosca (para evitar a perda de compostos voláteis) contendo 40 mL de MM acrescido de 10% de gasolina comercial .

3.1.3.2 Análise em cromatografia gasosa

Parte da alíquota retirada diariamente foi analisada em cromatógrafo a gás Varian 450-GC acoplado ao espectrômetro de massas Varian 240-MS para avaliação do consumo de BTEX e identificação de intermediários, nas seguintes condições: 35°C por 4 minutos, rampa de temperatura de 20°C por minuto e temperatura final de 150°C, tempo total de análise 12 minutos. Uma curva de calibração injetando diferentes padrões de BTEX de concentrações conhecidas foi feita previamente para a validação do método (dados não mostrados).

3.1.4 Crescimento Celular

O crescimento da cultura celular foi observado diariamente através da retirada de uma alíquota de 1 mL do ensaio e realizada a leitura da sua absorbância em uma cubeta de quartzo, no espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu) em diferentes comprimentos de onda, verificando uma melhor absorbância, e portanto padronizado em $\lambda = 600\text{nm}$.

3.1.5 Relação entre Absorbância e Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Esta metodologia envolve a contagem direta das células crescidas em placas contendo meio de cultura. Foram aplicados cerca de 10 μL de uma suspensão de bactérias (com uma absorbância conhecida) em uma placa de Petri contendo meio sólido de cultura e incubados 24h a 30°C. Após este tempo de incubação, foi realizada a contagem manual das UFCs. A contagem direta consiste numa técnica rápida, mas tem como principais limitações contagens errôneas, devido às pequenas dimensões de algumas células, ou pela formação de agregados celulares. Por este motivo, deve ser sempre associada a outro método de contagem celular.

3.1.6 Determinação da via de clivagem do catecol

O catecol é amplamente conhecido como intermediário na biodegradação da grande maioria dos aromáticos, servindo de substrato para a quebra do anel aromático (HENDRICKX et al, 2006). Para a determinação da via de clivagem do catecol foi utilizado o método proposto por Hammann & Kutzner (1998), para tanto 1 mL dos inóculos bacterianos capazes de mineralizar BTEX como fonte de carbono foram colocados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio mínimo mineral acrescidos de 5 µL de benzeno. Os frascos foram incubados sob agitação a 120 rpm por 24 h à temperatura ambiente. As células foram sedimentadas por centrifugação, lavadas três vezes com tampão TrisHCl (50 mM, pH 8,0). Em seguida, as células obtidas foram adicionadas a tubos de ensaio contendo 1,5 mL de tampão Tris-HCl (0,50 mM pH 8,0), 0,3 mL de tolueno e 1,5 mL de catecol a 9 mM, os quais foram agitados vigorosamente e incubados a 28°C. No caso de *meta* clivagem do substrato, uma cor amarela seria formada dentro de 15 a 60 minutos devido ao acúmulo de semialdeído 2-hidroximucônico. Quando a cor amarela não foi observada, os tubos foram incubados por 12 horas e então testados quanto a presença de β-cetoadipato pela reação de Rothera, que consiste na adição de 1 g de uma mistura seca, constituída de 60 g de (NH₄)₂SO₄, 0,6 g de nitroprussiato de sódio e 0,5 mL de solução de amônia (33%), aos tubos de ensaio. A formação da coloração roxa indica a quebra do catecol pela via de *orto* clivagem (HAMMANN & KUTZNER, 1998).

3.1.7 Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)

Em um frasco âmbar, apropriado para a DBO, foi adicionado 1 mL de cada solução nutriente da DBO (Cloreto férrico 0.018 N, Cloreto de cálcio 0.25 N, Sulfato de magnésio 0.41 N e Tampão fosfato 0.025 N), 8,7ml de cultura bacteriana a uma absorbância de 0,8 a $\lambda=600$ nm, qsp 160 mL de uma solução de BTEX (50 mg/L). As garrafas de DBO foram mantidas sob agitação constante (200 rpm) a 20 °C por 20 dias. Esta técnica determina o consumo de oxigênio através da quantificação da queda de pressão dentro das garrafas seladas. A pressão dentro do sistema diminui, pois o oxigênio disponível é consumido pelos micro-organismos, sendo expressa em mg/L. O CO₂ produzido pelos micro-organismos através da oxidação de matéria orgânica não apresenta efeitos sobre a medida de pressão uma vez que é removido pelos cristais de hidróxido de sódio nas tampas das garrafas, as quais não tem contato com as amostras. Um frasco contendo apenas a cultura do micro-organismo e as soluções nutrientes também foi preparado para servir como controle de biodegradação. Ao final do processo, uma alíquota da amostra foi separada para análise química quantitativa de BTEX.

3.2 DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Hoje em dia, ainda que não intencionalmente, adultos e crianças estão em contato com diferentes outras fontes de informação científica fora da escola, pois somente a escola não é capaz de prover toda a educação e a informação científica requerida pelo cidadão, ao longo da vida, na busca de acompanhar as rápidas transformações técnico-científicas, em nível mundial, e de participar nas decisões relacionadas ou influenciadas pela ciência.

Neste trabalho, o público alvo escolhido para a divulgação científica foram os alunos do Curso Técnico em Meio Ambiente da ETEC de Cubatão-SP (Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza). Trata-se de alunos que identificam as intervenções ambientais, analisam suas consequências e propõem ações para prevenção, minimização e/ou remediação de seus efeitos. O objetivo desta ação foi utilizar o conhecimento bem como a linguagem

local destes alunos, moradores da cidade, para que sejam agentes disseminadores do conhecimento científico.

Para isto, na manhã de 30 de maio de 2011 os alunos da ETEC estiveram nas dependências do CEPEMA-POLI-USP, participando de atividades em laboratório e discussões sobre os projetos de pesquisa ali desenvolvidos. Esta atividade fez parte da Semana do Meio Ambiente de Cubatão-SP (figura 6).

Figura 7- Alunos da ETEC discutindo questões ambientais

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DO SOLO

Foram realizadas 2 tipos de análises do solo. Uma análise físico-química, para levantamento das características gerais dos solos analisados (Anexo A) e uma análise de contaminantes orgânicos presentes no local contaminado por cromatografia gasosa como explicado anteriormente em material e métodos (figura 7).

O teste de verificação de contaminação por aromáticos resultou na presença de tolueno e xileno, confirmando a contaminação ocorrida com o vazamento de combustível. As substâncias benzeno e etil-benzeno não puderam ser identificadas neste experimento. Isto pode ter ocorrido devido à saturação da fibra utilizada, pois na identificação de aromáticos, muitas vezes existe uma competição dos compostos pela fibra e uns apresentam mais afinidade que os outros, podendo mascarar os resultados. A volatilização das substâncias também poderia ser o motivo. Contudo, todos os cuidados foram tomados para evitar este fato, como o imediato isolamento do solo em recipiente fechado evitando-se que qualquer substância fosse perdida, além do imediato processamento da amostra.

Figura 8- Resultado da análise em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas para o solo contaminado. Os picos em 3 minutos e 5 minutos representam respectivamente os compostos tolueno e xileno.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

4.2.1 Teste Bioquímico do API NE *Biomeriëux*®

Através da técnica de plaqueamento seletivo, quatro cepas foram selecionadas e identificadas primariamente com testes bioquímicos do API NE: para a CEPA 1 estes testes forneceram resultados positivos para GLU (assimilação de glucose), ESC (hidrólise de β -glucosidase), PNG (B-galactosidase), ARA (assimilação de arabinose), MNE (assimilação de manose), MAN (assimilação manitol), NAG (assimilação de N-acetil-glucosamina), MAL

(assimilação de maltose), GNT (assimilação de potássio de gluconato), CAP (assimilação de ácido caprato), ADI (assimilação de ácido adipato), MLT (assimilação de malato), CIT (assimilação de citrato) e OX (citocromo-oxidase) e esta composição de resultados originou um código que inserido ao sistema on-line de identificação do fabricante resultou em um ID de 99,3% *Burkholderia cepacia* e 0,3% *Pseudomonas luteola*; para a CEPA 2 estes testes forneceram resultados positivos para NO₃ (redução dos nitratos a nitritos), GLU, ESC, PNG, GLU, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC (assimilação de fenil-acetato) e OX, esta composição de resultados originou um código que inserido no sistema on-line de identificação do fabricante que resultou em um ID de 96,4% *Burkholderia cepacia*, 3,4% *Aeromonas hydrophila* e 0,1% *Pseudomonas luteola*; para a CEPA 3 estes testes forneceram resultados positivos para NO₃, CIT, PAC e OX, esta composição de resultados originou um código que inserido no sistema on-line de identificação do fabricante que resultou em um ID de 37,4% *Achromobacter denitrificans*, 24,9% *Oligella ureolytica*, 17,2% *Alcaligenes faecalis*, 12,4% *Bordetella bronchiseptica* e 5,7% *Comamonas testosteroni*; e para a CEPA 4 testes bioquímicos forneceram resultados positivos para ADH (arginina dihidrolase), URE (urease), GEL (protease), GLU (assimilação de glucose), MAN (assimilação manitol), NAG (assimilação de N-acetil-glucosamina), GNT, CAP, ADI e OX, esta composição de resultados originou um código que inserido no sistema on-line de identificação do fabricante resultou em um ID de 99,9% *Pseudomonas aeruginosa* e 0,1% *Pseudomonas fluorescens*. Estas divergências na identificação bioquímica podem ser explicadas devido ao fato do teste utilizado ser específico para identificação de bactérias não entéricas. Como veremos a seguir, a identificação molecular apontou para a identificação diferentes do teste bioquímico para as CEPAS 1, 2 e 3, apenas a CEPA 4 obteve o mesmo resultado do teste bioquímico.

4.2.2 Sequenciamento do 16S

A fim de comprovar a identificação previamente realizada pelos testes bioquímicos, foi realizada a identificação molecular (gene 16 S) das cepas isoladas. O sequenciamento do gene 16 S, utilizando os iniciadores universais para identificação de bactérias (27F e 1404R) resultaram nas seguintes sequências:

CEPA1:

TACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGG
ACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGT
ATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGA
CGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGG
CCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATTTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCC
GAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
TCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGATTTAA
CGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCTCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGT
TTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCA
CCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCAGGGGGCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAG
ATCTCTACGCATTTACCCGCTACACC

CEPA 2:

TTAGTCGACGCAGCTACCATGCAGTCGACGGTAGCAACAAGAGAGCTTGCTCTC
GGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAGACTGGGAACTGCCCCGATGGAGGGG
GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTAGG
TGAGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCA
GCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG
CCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTGAGGTTAATAACC
TTATTCAATTGTCGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTG
CATTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAG
TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
TTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT

AATTGATGCAACGCGAAGAACCTTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAG
CAGAGATGCTTTTGAGGTGCCCTTTCGGGAAACTCTTGAGAACCAGGTTGCTGC
ATGGCCTGTCCGTTCAAGCCTCG

CEPA 3:

TTAATACCAAACGCAGCTACCATGCAGTCGACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTG
CTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGAAAAGTCTGGGAAACTGCCCCGATGGA
GGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAA
GAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCTCTTCTGGGATTAGCTT
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAAGAT
GACCAGCCCCCTGGAAGTGAACACCGTCCTTTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGCGGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT
GTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTG
TGGTTAATAACCGCAACTAATTGTACGTTATCCCCCCCCAAAAAAGCAA
TTTCTTTTTTTTTGGGGGCGGGAAAAAGGAGGGGGAGGGTTAATCGAATTACTTG
GCGTAAGCGCACGCAGCGGTCTGGTCAGTCGGATGTAAATCCCCGGGCTCACCT
GGGAAGTGCATTCAAAGTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAAAGGGGGGAGAATTCCA
GGTGTAGCGTGAAATGCTAAAAAGTGGAGAATTCCGTGGCAAAGCGGCCCTGA
CGAAAGTGAAGTCAAGTGAACAAACCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTA
TCCAGCCGAACAATTCTTTTGGAGGTGTGCCTTGAGGTGGTTCGAGATAACCTT
AATAACCCCGGAACCGCCAAGGTAAAACTAAAAAATCCCCGGGCC

CEPA 4:

TTCCGATTACTATCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCG
GACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCTTTG
TACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTG
ACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCA
CCCGAGGTGCTGGTAAGTAAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCC
CGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCC
GTCAATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTA
TCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCG
TTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGC
ACCTCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC
TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACT

CTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGNTGAGCCNGGGGATTTACATC
NAACTTGCTGAACCNACTACGCGCGCTTTACGCCCAGTATTNCGATTAAACGCT
GCACCCCTTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACAAANTTAGCCGGTGCTTNATTCTG
TTGGTAACGTCAAACAGCCAGGTATAACTTACTGCC

Estas sequências obtidas para as linhagens isoladas foram comparadas com sequências conhecidas do banco de dados (BLAST, GenBank) e apresentaram os seguintes resultados: CEPA 1 apresentou 99% de similaridade com *Serratia marcescens*, CEPA 2 apresentou 97% de similaridade com *Klebsiella oxytoca*, CEPA 3 obteve apenas 90% de similaridade com *Salmonella typhi* (não obtendo um perfil de identificação aceitável) e a CEPA 4 apresentou 95% de similaridade com *Pseudomonas aeruginosa*.

Muitas das bactérias que possuem capacidade de degradar compostos aromáticos são gram-negativas, sendo que a melhor representante desta classe é da família Pseudomonadaceae. Diversas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e outros gêneros relacionados (*Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, etc.) têm sido identificadas como tendo ampla capacidade de degradação de compostos aromáticos (THAKUR et al., 2002). Estas bactérias gram-negativas são excepcionalmente versáteis e são conhecidas pelas suas atividades metabólicas que permitem que algumas delas cresçam em condições extremas de limitação de nutrientes. Além disso, são capazes de adquirir rapidamente a capacidade de degradar compostos xenobióticos quando expostas a estes compostos e na ausência de fontes de nutrientes mais facilmente degradáveis. Por isso, encontram-se frequentemente envolvidas em diversos processos de biorremediação (AVANZI et al., 2009).

4.2.3 Identificação de micro-organismos por espectrometria de massas MALDI-TOF

Primeiramente, perfis de espectrometria de massa foram comparados ao banco de dados usando o software Bruker Daltonics Biotyper. A Tabela 3 mostra os resultados encontrados por esta metodologia. Esta metodologia ainda não tem a mesma validade que testes moleculares porque os “perfis” são comparados em um banco de dados do software, composto aproximadamente de 4.000 inscrições apenas de origem clínica, portanto a

prospecção de micro-organismos encontrados em amostras ambientais está apenas no começo. Neste caso, foi utilizada apenas como método confirmatório das identificações realizadas por metodologia molecular clássica.

Tabela 3- Resultados de identificação instantânea das cepas isoladas através do equipamento LT Microflex espectrômetro de massa (Bruker Daltonics).

Amostra	Organismo	Resultado
CEPA 1	<i>Serratia marcescens</i>	2,274
CEPA 2	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,153
CEPA 3	Perfil não aceito	-
CEPA 4	Perfil não aceito	-

4.3 DEGRADAÇÃO DE BTEX E SEUS INTERMEDIÁRIOS

4.3.1 Biodegradação do BTE

A fim de comprovar a capacidade de biodegradação de BTE pelas cepas isoladas, ensaios de crescimento celular utilizando BTE como única fonte de carbono foram realizados. A principal dificuldade do experimento foi padronizar um controle, uma vez que os compostos são voláteis. Sendo assim, a perda de cada composto por volatilização teve seu valor descontado nas amostras controles.

Nos ensaios de biodegradação e crescimento em BTE como única fonte de carbono, demonstraram que a CEPA 1 obteve o melhor desempenho degradando cerca de 89% de Benzeno, 87% de Tolueno e 77% de Etil-benzeno em 177 horas, sem formar praticamente nenhum intermediário. Apenas em algumas amostras foi verificada a presença de fenol. As

outras cepas também se mostraram eficientes na degradação destes compostos, sendo que a CEPA 2 degradou cerca de 62% de benzeno, 75,5% de tolueno e 73,5% de etil-benzeno em 177 horas, a CEPA 3 degradou 63%, 75% e 73% e a CEPA 4 degradou 64%, 74% e 71% para os respectivos compostos (figura 8).

Figura 9- Biodegradação do BTE (50 ppm). Incubação foi feita em 10 dias, agitação controlada à 200 rpm, temperatura de 30°C e BTE como única fonte de carbono.

Os xilenos não foram utilizados no primeiro experimento devido a sua dificuldade de análise em cromatografia líquida, pois o composto apresenta o mesmo tempo de retenção do Etil-benzeno na metodologia de análise. Outros ensaios foram feitos utilizando BTEX como fonte de carbono e identificação de seus intermediários.

O crescimento celular das bactérias isoladas em BTE (50 ppm) pode ser verificado na figura 9. Observa-se que nesta concentração o BTE atua primariamente como inibidor do crescimento, portanto não observamos o crescimento exponencial típico nos primeiros dias de experimento.

Figura 10- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 50 ppm de BTE, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.

4.3.2 Biodegradação do BTEX

Ensaios de biodegradação e crescimento em BTEX (100 ppm) como única fonte de carbono demonstraram que os xilenos atuam como inibidores na biodegradação dos outros compostos aromáticos, havendo diminuição significativa na biodegradação dos compostos estudados pelas cepas isoladas, quando comparadas ao experimento controle (linha tracejada vermelha da figura 10).

O crescimento celular das bactérias isoladas em BTEX (100 ppm) pode ser verificado na figura 11, onde observa-se um crescimento exponencial típico nos primeiros dias (100 primeiras horas) de experimento, seguido de platô e morte celular (após as 500 horas de experimento), sendo o máximo crescimento verificado em *Pseudomonas* sp. (abs. 0.7) que foi a cepa mais eficiente ao metabolizar o benzeno (degradando cerca de 50%), também teve valores de degradação dos outros compostos maiores que o controle (30% de tolueno, 25% de etilbenzeno e 50% de xilenos), o crescimento celular também foi bom em *Serratia* sp. (abs. 0.65) que por sua vez, foi a melhor frente aos xilenos (mais de 52%) e também obteve valores

positivos frente aos outros compostos quando comparados com o controle sem bactéria (degradou cerca de 42% de benzeno, 25% de tolueno e etilbenzeno). Já as outras cepas estudadas obtiveram crescimento celular considerável, porém houve deficiência na degradação de algum dos compostos.

Figura 11- Biodegradação do BTEX (100 ppm). Incubação foi feita em 30 dias, agitação controlada à 200 rpm, temperatura de 30°C e BTEX como única fonte de carbono.

Figura 12- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 100 ppm de BTEX, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.

4.3.3 Biodegradação da gasolina comercial

A fim de verificar a eficiência das cepas bacterianas em biodegradar gasolina comercial, o que representaria uma contaminação real, foi realizado um experimento contendo este composto como única fonte de carbono. As cepas foram cultivadas em 10% de gasolina comercial em meio mínimo durante 21 dias a 30 °C com agitação de 200 rpm. A quantidade de gasolina remanescente no meio de cultura foi determinada através de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os cromatogramas correspondentes ao ensaio podem ser visualizados na figura 12, onde o gráfico (A) mostra o perfil cromatográfico do experimento controle após 21 dias, onde é possível identificar os principais compostos de interesse como benzeno (em cerca de 2 minutos), tolueno (em 3,5 minutos), xilenos (em 5 e 7 minutos), etil-benzeno (em 8 minutos) e fenol (em 10 minutos). Os cromatogramas B a E mostram a biodegradação da gasolina através da diminuição na intensidade dos picos dos contaminantes de interesse.

O crescimento celular durante os dias de experimentos foram determinados por aumento na densidade óptica a 600 nm (figura 13). O crescimento quando comparado com os outros ensaios (contendo BTE e BTEX) é considerado baixo. Ainda assim, nota-se um certo crescimento nas amostras contendo bactérias quando comparadas a amostra controle.

Neste experimento, é importante ressaltar que a CEPA 3 atingiu 100% de degradação dos principais compostos da gasolina comercial, sendo muito efetiva e abrindo possibilidades par seu uso em contaminações ambientais reais.

Cromatogramas - Ensaio de gasolina e meio mínimo (10%)

Figura 13 - Cromatogramas dos experimentos de gasolina comercial 10%, após 21 dias de incubação a 30°C e agitação a 200 rpm. (A) Controle; (B) *Serratia* sp.; e (C) C3. Verifica-se os compostos Benzeno (2.2 min), Tolueno (3.5min), Xileno (5 min), Etil-benzeno (8.3min) e Fenol (10.2min).

Figura 14 - Cromatogramas dos experimentos de gasolina comercial 10%, após 21 dias de incubação a 30°C e agitação a 200 rpm. (D) *Klebsiella* sp. e (E) *Pseudomonas* sp. Verifica-se os compostos Benzeno (2.2 min), Tolueno (3.5min), Xileno (5 min), Etil-benzeno (8.3min) e Fenol (10.2min).

Figura 15- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 10% de gasolina, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.

4.3.4 Identificação e biodegradação de intermediários

No experimento contendo BTE, foi verificada a formação de fenol como único intermediário (em pequenas concentrações). Este dado sugeriu que fosse testado um experimento contendo fenol e catecol (intermediário da via que degrada o fenol) para avaliar a capacidade de biodegradação destes intermediários e confirmar a possibilidade de mineralização destes compostos quando expostos aos micro-organismos. As quatro cepas isoladas se mostraram eficientes frente ao fenol, mineralizando o composto em 97 horas de incubação, e apenas as três primeiras cepas degradaram o catecol nas 97 horas de experimento (figura 14). A CEPA 4 degradou o fenol, porém sem a formação de catecol, portanto supõe-se que a enzima envolvida realiza uma *meta*-hidroxilação, fato bastante incomum na via degradativa de bactérias, que normalmente hidroxila, através da enzima fenol-hidroxilase (E.C. 1.14.13.7) na posição *orto*-, formando catecol como principal intermediário (FUTAMATA et al., 2001).

Figura 16- Biodegradação do fenol e catecol (100 ppm). Incubação foi feita em 7 dias, agitação controlada a 200 rpm, temperatura de 30°C e fenol/catecol como única fonte de carbono.

O crescimento celular das bactérias isoladas quando expostas ao fenol pode ser verificado na figura 15 e a figura 16 mostra o crescimento em catecol como única fonte de carbono. Em ambos gráficos nota-se o crescimento exponencial típico nos primeiros dias.

Figura 17- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 100 ppm de fenol, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.

Figura 18- Avaliação do crescimento celular das cepas isoladas quando expostas à 100 ppm de catecol, observado pela absorbância em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 600 nm.

4.3.5 Relação entre Absorbância e Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

O crescimento celular obtido em espectrofotômetro pode ser convertido em unidades formadoras de colônia, através de uma curva que indica valores de UFC para cada absorbância obtida. As equações da reta e o coeficiente de Pearson são mostrados nos gráficos a seguir (figuras 17, 18, 19 e 20):

Figura 19- Relação entre absorbância e UFC.

Figura 20- Relação entre absorbância e UFC.

Figura 21- Relação entre absorbância e UFC.

Figura 22- Relação entre absorbância e UFC.

Utilizando os dados de absorbância e UFC para calcular as equações das retas, é possível descobrir a velocidade de crescimento, ou seja, o μ máximo - μ (h^{-1}) de cada unidade formadora de colônia (UFC) quando exposta a determinado composto. A Tabela 4 resume os resultados das diferentes cepas isoladas frente aos compostos estudados.

Tabela 4- Comportamento das cepas isoladas frente aos diferentes compostos .

Fonte de carbono	Cepas	μ (h ⁻¹)	Biodegradação (%)
BTE	C1	0,0078	44,4
	C2	0,0071	41,2
	C3	0,0044	43,0
	C4	0,0012	42,6
Fenol	C1	0,0031	100,0
	C2	0,0057	94,8
	C3	0,0027	99,5
	C4	0,0096	100,0
Catecol	C1	0,0108	99,3
	C2	0,0152	100,0
	C3	0,0184	100,0
	C4	-	15,8 *

*não significativo (perda por foto-oxidação).

4.3.6 Determinação da via de clivagem do catecol

Com exceção da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (que apresentou coloração amarelada indicando a clivagem do catecol pela via meta), todas as cepas clivaram o catecol pela via *orto*, que se caracteriza pela coloração roxa após a reação de Rothera, a qual indica a presença de β -cetoadipato.

Na via *orto*, os hidrocarbonetos aromáticos são oxidados pelas dioxigenases à *cis,cis*-dihidrodiol e este é convertido para catecol. O anel aromático dihidroxilado é, então, aberto através de uma *orto*-clivagem oxidativa através da enzima catecol 1,2- hidroxilase, resultando em ácido *cis, cis*-mucônico (SMITH, 1990). Este é metabolizado por meio da enzima lactonizante do muconato- a muconolactona, e esta, oxidativamente a ácido β -cetoadipato, o qual é aberto oxidativamente para o ciclo tricarboxílico intermediário comum, a ácido succínico, e Acetil-CoA (figura 22).

Figura 23- Via orto de degradação do catecol a succinato + acetil-Co-A.

Paul et al. (2004) descreveram a utilização da via *orto* por duas linhagens de bactérias *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 e *Burkholderia cepacia* RKJ200 na degradação de um pesticida. Arenghi et al. (2001) registraram o mecanismo de regulação da meta clivagem por *Pseudomonas stutzeri* OX1. Kukor e Olsen (1991) também descreveram a regulação da *meta* clivagem do catecol por *Pseudomonas pickettii* PKO1. Em contrapartida, Murray & Williams (1974) registraram que *Pseudomonas putida* NCIB 10015 metaboliza fenóis e cresóis pela via *meta*, e o benzoato pela via *orto*, e dependendo do seu substrato de crescimento, a via *meta* ou *orto* é estimulada nesta linhagem bacteriana. Assim, observa-se que uma mesma linhagem bacteriana é capaz de realizar as duas vias metabólicas, dependendo do substrato disponível para o seu crescimento. O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO₂ na degradação total pode também oferecer caminhos alternativos. Eles podem ser armazenados, transformados em biomassa (BERTRAND et al., 1983; DUMENIL et al. 1988), ou convertidos em outros subprodutos. A longo prazo, a maioria dos hidrocarbonetos é convertida a CO₂, entretanto, os produtos parcialmente oxidados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o próprio hidrocarboneto e, portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento temporário na toxicidade e mutagenicidade durante o processo de biodegradação (WANG et al., 1990). Uma toxicidade residual pode ocorrer devido à presença de intermediários tóxicos ou produtos finais. Assim, a presença destes tipos de resíduos tóxicos pode levar à morte das células (SANTOS, 2004). Por estas razões, é muito importante que os intermediários de um processo de biodegradação sejam analisados.

4.3.7 Demanda Biológica de Oxigênio

A fim de quantificar o consumo de O₂ durante o processo de biodegradação de BTEX, foi montado um experimento nos padrões de DBO e o consumo de O₂ foi medido durante todo o procedimento experimental a fim de avaliar a biodegradação. Este processo, durou cerca de quinze dias consecutivos. Porém, sendo o tempo máximo de leitura do aparelho de DBO igual a cinco dias, foi necessário realizar três tratamentos consecutivos nas amostras

(figura 23). Com base no consumo de oxigênio, podemos inferir o consumo da matéria orgânica presente (BTEX) pelos micro-organismos. Através desta análise, foi possível estimar o instante em que o consumo de O_2 começa a declinar, indicando o momento de interrupção experimento. Os maiores índices de consumo de O_2 foram observados entre os dias 5 e 10 de experimento de degradação. Após este período, houve uma diminuição no consumo de oxigênio.

Figura 24- Consumo de O_2 pelas cepas isoladas durante a biodegradação.

A fim de comprovar o consumo de BTEX (50 ppm) como única fonte de carbono, estas amostras foram analisadas ao início e final do experimento através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Na figura 24 (gráfico A) observamos a amostra controle (sem micro-organismos) contendo os compostos de interesse em 2 minutos (benzeno), em 5 minutos (tolueno), em 6 minutos (etil-benzeno), e em 7 e 10 minutos (xilenos). Os demais gráficos (B ao E) demonstram 100% de degradação de tais compostos ao final do experimento. Através da análise dos resultados, podemos concluir que todo o BTEX foi consumido como fonte de carbono, promovendo o crescimento celular e confirmando os resultados de respiração celular, sendo que a maior velocidade de degradação ocorreu entre os dias 5 e 10 do experimento, pois neste intervalo houve maior consumo de oxigênio pelos micro-organismos.

Figura 25- Cromatogramas da DBO contendo 50 ppm de BTEX, após 18 dias de incubação.

4.4 DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Não há dúvida que no contexto atual, muitas atividades consideradas como sendo de divulgação científica ganhem amplitudes jamais vistas, seja no formato escrito, como em jornais, revistas e livros, seja no formato audiovisual, como em documentários e outros programas da televisão. No trabalho proposto, durante o curso na Semana do Meio Ambiente, foram utilizados recursos visuais, como animações de computador, apostilas e pôsteres (anexos E e F), além de uma discussão de temas ambientais com os alunos da ETEC através de debates de idéias. A atividade proposta teve como objetivo:

A promoção da informação inteligível sobre o avanço da ciência e tecnologia;

Despertar nos indivíduos, especialmente nos jovens, uma vocação nesses campos;

Educar, mas, no sentido da aquisição do espírito e da mentalidade científica;

Fazer com que os indivíduos não se sintam temerosos pela ciência e tecnologia, de modo a que eles possam compreender, avaliar e julgar seus diferentes usos na sociedade contemporânea.

Além da divulgação através da atividade com os alunos da ETEC, as pesquisas desenvolvidas no CEPEMA-POLI-USP são difundidas através do site <http://www.cepema.usp.br>, onde há diversas matérias de pesquisas que foram transpostas a uma linguagem mais simples para que a população em geral tenha acesso, tais como:

Bactérias em prol do meio ambiente (disponível em <http://www.cepema.usp.br/noticias/bacterias-em-prol-do-meio-ambiente/>)

Entrevista com Ingrid Avanzi (disponível em <http://www.cepema.usp.br/noticias/em-entrevista-a-mestranda-ingrid-regina-avanzi-nos-explica-seu-plano-de-pesquisa/>)

Linha de pesquisa desenvolvida no Cepema é matéria no Jornal A Tribuna (disponível em <http://www.cepema.usp.br/noticias/linha-de-pesquisa-desenvolvida-no-cepema-e-materia-no-jornal-a-tribuna/>)

Cepema participa da Semana do Meio Ambiente de Cubatão (disponível em <http://www.cepema.usp.br/acoes-educativas/cepema-usp-participa-da-semana-do-meio-ambiente-de-cubatao-2/>)

Capacitação de alunos da ETEC para monitoria da exposição na semana do meio-ambiente (Disponível em <http://www.cepema.usp.br/acoes-educativas/capitacao-de-alunos-da-etec-para-monitoria-da-exposicao-na-semana-do-meio-ambiente/>)

É importante lembrar que a pesquisa não foi apenas divulgada no site do CEPEMA. Os resultados da pesquisa atingiram outras mídias, nas quais uma matéria relacionada ao presente trabalho teve destaque na página inicial do site da USP (www.usp.br) no dia 29 de setembro de 2011 (anexo H) e também no jornal impresso de maior prestígio na Baixada Santista, o jornal “A TRIBUNA” do dia 29 de julho de 2011 (anexo I). Deste modo, consideramos que a proposta de divulgação científica acessível a todos cumpriu seu papel.

5 CONCLUSÕES

Por mais que houvesse evidências de contaminação do solo (ANEXO A), os resultados demonstraram que os níveis de contaminação de BTEX encontram-se abaixo dos valores de intervenção proposto pela CETESB, utilizados como indicativo da existência de contaminação do solo. Somente quando tal valor é excedido a área pode ser declarada contaminada, existindo risco potencial de efeito deletério sobre a saúde humana, devendo-se efetuar a investigação detalhada, incluindo modelagem de fluxo, avaliação de risco com objetivos de intervenção na área, executando-se medidas emergenciais de contenção da pluma, restrição de acesso a pessoas, restrição da utilização das águas locais e ações de remediação.

Independente da necessidade de intervenção na área, este trabalho se propôs a identificar a comunidade microbiana presente neste local onde houve vazamento de gasolina. Verificamos que estes micro-organismos são capazes de utilizar estes compostos como fonte de carbono e existe a possibilidade de uso destes mesmos micro-organismos para um futuro processo de biorremediação. Pôde-se concluir que o petróleo e o BTEX agiram como potentes selecionadores de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos. A metodologia utilizada para a quantificação dos BTEX mostrou ser satisfatória e permitiu alcançar os objetivos propostos, ou seja, todas as cepas isoladas da zona industrial de Cubatão-SP apresentaram alta tolerância à toxicidade do BTEX e conseqüentemente podem ter potencial aplicação no biotratamento de efluentes contendo altas concentrações de derivados de petróleo ou em biorremediação de solos *in situ*.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que o tempo de biodegradação testado (10 dias) foi insuficiente para a eliminação total do BTE presente. Apesar de ter havido uma considerável diminuição na concentração dos compostos, estes não foram completamente metabolizados, o que implicaria a necessidade de períodos superiores e/ou otimização do processo, a fim de melhorar a eficácia da biodegradação. Um fator importante a ser considerado no processo de biodegradação é a quantidade de oxigênio disponível na amostra, que deve ser correspondente às necessidades fisiológicas do micro-organismo degradante.

Nos experimentos de DBO (e BTEX como única fonte de carbono) foi verificado que no período entre o 5º e 10º dia, houve maior consumo de oxigênio, portanto maior taxa de respiração. Sendo assim, podemos afirmar que neste período houve maior atividade celular, pois os organismos já estavam adaptados e aptos a metabolizar os compostos. Após este período notou-se uma brusca queda do consumo de oxigênio, devido a sua indisponibilidade no sistema. A partir destes dados, podemos concluir que fontes externas de oxigênio acopladas ao processo, além de períodos maiores de degradação seriam boas opções a serem testadas futuramente.

Também obtivemos a identificação de três cepas bacterianas pelo método de amplificação da região do 16S, sendo: *Serratia* sp. (CEPA 1), *Klebsiella* sp. (CEPA 2) e *Pseudomonas* sp. (CEPA 4). Em relação a CEPA 3, nenhuma metodologia empregada resultou em uma identificação confiável, reforçando a hipótese de que para amostras ambientais é muito importante que realizem diferentes testes confirmatórios. Ainda, a região de Cubatão, pelo seu histórico de poluição ambiental, pode apresentar uma biodiversidade muito diferente da encontrada nos arredores. Este fato torna ainda mais interessante a busca por micro-organismos isolados do meio ambiente para a biorremediação de efluentes ou solo, pois novas espécies podem estar presentes nestas amostras. No entanto, as quatro cepas isoladas podem ser consideradas resistentes ao BTE e adequadas para a remediação de ambientes contaminados com estes compostos.

Verificou-se que todas as cepas isoladas 1, 2 e 3, formavam fenol como principal intermediário (ainda que em baixas concentrações). Por este motivo, verificou-se a capacidade de biodegradação do fenol e também do catecol (intermediário formado a partir da hidroxilação do fenol). Os experimentos de clivagem do catecol são de grande importância para a seleção de micro-organismos que participam da mineralização de matéria orgânica derivada de petróleo, pois este é um intermediário comum na degradação de vários compostos aromáticos. Neste trabalho, a maioria das bactérias selecionadas realizava a quebra do catecol através da *orto* clivagem, apenas a *Pseudomonas* sp. utilizou a via *meta*, corroborando sua ineficiência de degradação deste composto no experimento com catecol (100 ppm), como única fonte de carbono.

A divulgação científica teve como objetivo principal, atualizar e articular a sociedade em prol do meio ambiente. Pode-se dizer que se tratando de temas de saúde e ambiente há sempre lugar para um processo de divulgação e ensino de ciências dinâmico e transdisciplinar, estimulando a construção de novos conhecimentos, motivando novas atitudes e conseqüentemente, auxiliando em outro processo: o da prevenção de doenças, da promoção da saúde, da melhoria das condições de vida e preservação do ambiente.

Este trabalho representa um estudo inicial, que gerou dados que permitem a sua continuidade e aprofundamento, além de possibilitar a formação de recursos humanos nesta área de pesquisa. Além disso, o presente estudo possibilitou a seleção de micro-organismos com potencial biotecnológico para a degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

6 REFERÊNCIAS

- AGENDA 21. **Saneamento básico**. In: Como está Cubatão. 2005, Cubatão, disponível em <<http://www.novomilenio.inf.br/cubatao/ag2020g.htm>>. Acesso em 27 de outubro de 2011.
- AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology and Molecular Reviews**, v.59, p.143-169. 1995.
- AMARAL e SILVA, C.; TOMMASI, L. R.; BOLDRINI, C. V.; NAVAS PEREIRA, D. Níveis de mercúrio na Baixada Santista. **Ciência e Cultura**, v.35 n.6, p.771-773, 1982.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Ecletica Química**. v.35, n.3, 2010.
- ARAUJO, E. S. N.; CALUZI, J. J.; CALDEIRA, A. M. A. Divulgação e cultura científica. In: ARAUJO, E. S. N.; CALUZI, J. J.; CALDEIRA, A. M. A. **Divulgação científica e ensino de Ciências: estudos e experiências**. 1.ed. São Paulo: Escrituras, v. 1, p. 15-34, 2006.
- ARENGHI, F. L. G.; BERLANDA, D.; GALLI, E.; SELLO, G.; BARBIERI, P. Organization and Regulation of meta Cleavage Pathway Genes for Toluene and o-Xylene Derivative Degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p. 3304–3308, 2001.
- ATLAS, M. & BARTHA, R. **Microbial evolution and Biodiversity**. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p. 27-57. 1998.
- AUGUSTO FILHO, O.; MACEDO, E. S. ; CERRI, L. E. S. ; OGURA, A. T. Carta Geotécnica da Serra do Mar nas Folhas de Santos e Riacho Grande. In: SEMINÁRIO DE INTEGRAÇÃO TÉCNICA SOBRE A POLUIÇÃO E A SERRA DO MAR, 1988, São Paulo. **Anais**. São Paulo: CETESB, p.69-75, 1988.

AUGUSTO L. G. S.; NOVAES T. C. P. Ação médico-social no caso do benzenismo em Cubatão, São Paulo: uma abordagem interdisciplinar. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.15, n.4, p.729-738, 1999.

AVANZI, I. R.; GRACIOSO, L. H.; PERPETUO, E. A. Isolamento e identificação de bactéria degradadora de fenol da zona industrial de Cubatão-SP, através da técnica de amplificação do 16S. **Revista Ceciliana**, São Paulo. v.1, n.2, p.66-70, 2009.

BACELAR, R. **Uma introdução à psicologia**. Recife: Fasa, 1998.

BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NEBE J.; WICKHAM, G. S.; PARKS, C.; NIES, L. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate biodegradation during multi-phase extration at a gasoline-contaminated site. **Journal of Hazardous Materials**. v.2-3, n.163, p.524-530, 2008.

BARBOSA, E. M. **Exposição Ocupacional ao Benzeno: O Ácido Trans-Trans Mucônico como Indicador Biológico de Exposição na Indústria do Refino do Petróleo**. 1997, 102 fls. Dissertação de Mestrado - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997.

BENTO, R.A. **Simbioses radiculares e a fitorremediação de solo contaminado por resíduos oleosos de refinaria de petróleo**. 2008, 58 fls. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BERNETH, L.; FIRTH, I.; MCALLISTER, P.; RHODES, S. Biotechnologies for remediation and pollution control in the mining industry. **Minerals and Metallurgical Processing**, v.17, p.105-111, 2000.

BERTRAND, J. C.; RAMBELOARISOA, J. F.; RONTANI, G.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. **Biotechnology Letters**, v.5, p. 567-572, 1983.

BORGES, W. R.; BRAGA J. R., J. C.; TORRES, F. R.. **O que você precisa saber sobre Cubatão**. Cubatão: Design & Print (com apoio do Arquivo Histórico Municipal de Cubatão), 2002.

BORNEMAN, J.; SKROCK P. W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUNJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHEIS, J.; TRIPLETT E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n. 6, p. 935-43, 1996.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 7, p.2647-53, 1997.

CASTRO, C. F. O meio ambiente e a percepção dos problemas sócio-ambientais vistos pela comunidade escolar do engenho maranguape – município do Paulista – PE. In.: II Encontro de Meio Ambiente e Educação Ambiental. **Anais do II Encontro de Meio Ambiente e Educação Ambiental**. João Pessoa – PB, 2003.

CHEN, W. & KUO, T. A simple and rapid method for the preparation of Gram negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v.21, n.9, 1993.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Baixada Santista**: Carta de meio ambiente e de sua dinâmica. São Paulo, 1985.

CONSTANTINI, A.S.; BENVENUTI, A.; VINEIS, P.; KRIEBEL, D.; TUMINO R.; RAMAZZOTTI, V.; RODELLA, S.; STAGNARO, E.; CROSIGNANI, P.; AMADORI, D.; MIRABELLI, D.; SOMMANI, L.; BELLETTI, I.; TROSCHER, L.; ROMEO, L.; MICELI, G.; TOZZI, G.A.; MENDICO, I.; MALTONI, S.A.; MILIGI L. Risk of leukemia and multiple myeloma associated With Exposure to Benzene and Other Organic Solvents: Evidence From the Italian Multicenter Case-Control Study. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 51, n.11, p.803-811, 2008.

CULLEN, D.W. & HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extration of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter. v.30, n. 8-9, p.983-993, 1998.

DE LORENZO, V. Cleaning up behind us. **EMBO Reports**. V.2, p.357–359, 2001.

DOJKA, M. A. Microbial diversity in a Hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p.3869-77, 1998.

DOU, J.; LIU, X.; HU, Z.; DENG, D. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v.2-3 n.151, p.720-729, 2008.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; Hungria, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa/CPAC, p. 17 -66, 1997.

DUMENIL, G.; MATTEL, G.; SERGENT, M. BERTRAND, J. C.; LAGET, M; PHANTAN-LUU, R. Application of a Doehiert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 27, p. 405-409, 1988.

DURANT, J. O que é alfabetização científica? In: MASSARANI, L; TURNEY, J; MOREIRA, I. de C. **Terra Incógnita: a interface entre Ciência e público**. Rio de Janeiro: Vieira & Lent; UFRJ, Casa da Ciência; Fiocruz, p.14-26, 2005.

DUTTA, C.; SOM, D.; CHATTERJEE, A.; MUKHERJEE, A. K.; JANA, T. K.; SEN, S. Mixing ratios of carbonyls and BTEX in ambient air of Kolkata, India and their associated health risk. **Environmental Monitoring Assessment**, v.1-4, n.148, p.97-107, 2008.

FAHY, A.; BALL, A. S.; LETHBRIDGE, G.; TIMMIS, K. N.; MCGENITY, T. J. Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, n.47, p.60-66, 2008.

FISCHER, G. R. **Como encontrar provas e evidências de crimes ambientais**. Joinville: Editora Opção, 2006.

FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO (FUNDACENTRO). **Laudo Técnico de Avaliação de Áreas Insalubres da COSIPA** : Volume da Coqueria. São Paulo, 1981.

FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO (FUNDACENTRO). **Proposta para a organização de estruturas de controle**

de exposição ao benzeno: Competências e responsabilidade Atualidades em Prevenção de Acidentes. São Paulo, 1988.

FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO (FUNDACENTRO). **Benzeno:** Subsídios Técnicos à Secretaria e Segurança e Saúde no Trabalho. São Paulo, 1993.

FUNDAÇÃO JORGE DUPRAT FIGUEIREDO DE SEGURANÇA E MEDICINA DO TRABALHO (FUNDACENTRO). **Acordo e Legislação sobre Benzeno.** São Paulo, 1996.

FUTAMATA H.; Harayama S.; Watanabe K. Group-specific monitoring of phenol hydroxylase genes for a functional assessment of phenol-stimulated trichloroethylene bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.10, p.4671- 4677, 2001.

GRACIOSO, L.H. AVANZI, I. R.; PERPETUO, E. A.; Otimização do meio de cultivo do lodo biológico para a biodegradação do fenol. *Revista Ceciliana*, v.2, n.1, p.7-10, 2010.

HAMMANN, R.; KUTZNER, H. J. Key enzymes for the degradation of benzoate, m- and p-hydroxybenzoate by some members of the order Actinomycetales. **Journal of Basic Microbiology**, v.38, n.3, p.207-220, 1998.

HENDRICKX, B.; DEJONGHE, W.; BOËNNE, W.; BRENNEROVA, M.; MIROSLAV, C.; LEDERER, T.; BUCHELI-WITSCHER, M.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D. Dynamics of an Oligotrophic Bacterial Aquifer Community during Contact with a Groundwater Plume Contaminated with Benzene Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes: an *In Situ* Mesocosm Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v.7, n.71, p.3815-3825, 2005.

HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHLOVA, J.; LINDNER, A.; RÜEGG, I.; BUCHELI-WITSCHER, M.; FABER, F.; EGLI, T.; MAU, M.; SCHLÖMANN, M.; BRENNEROVA, M.; BRENNER V.; PIEPER, D. H.; TOP E. M.; DEJONDHE, W.; BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, v.2, n.64, p. 250-265, 2006.

HENTSCHEL, U.; HOPKE, J.; HORN, M., FRIEDRICH, A. B.; WAGNER, M.; HACKER, J.; MOORE, B. S. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington: v.68, n.9, p.4431-40, 2002.

HIGARASHI, M. M. **Processos oxidativos avançados aplicados a remediação de solos brasileiros contaminados com pesticidas**. 1999. 77 fls. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.8-12, 1999.

HOGAN, D.J. **Migrações, Meio-Ambiente e Adaptação da População**. Relatório submetido ao CNPq, 1990.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal Bacteriology**, Washington: v.180, p. 4765-4774, 1998.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (IPT). **Elaboração de subsídios técnicos para um plano de emergência para a área de Cubatão**. Estado de São Paulo. São Paulo, Relatório nº 22.797, 1985.

JACOBI, P. R. **Cidade e meio ambiente** : percepções e práticas em São Paulo. 1a. ed. São Paulo: Annablume, 191p, 1999.

JACOBI, P. R. **Educação ambiental, cidadania e sustentabilidade**. Cadernos de Pesquisa (Fundação Carlos Chagas), São Paulo, v. 118, p.189-205, 2003.

KAHNG, H.Y.; MALINVERNI, J.C.; MAJKO M.M.; KUKOR, J. J. Genetic and functional analysis of the tbc operons for catabolism of alkyl- and chloromatic compounds in *Burkholderia sp.* Strain JS150. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4805-4816, 2001.

KIM, D.; KIM, S. K.; KIM K. K.; KIM, S.W.; ZYLSTRA, G.J.; KIM, Y. M.; KIM, E. Monocyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Rhodococcus sp.* Strain DK17. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p.3270-3278, 2002.

KUKOR, J. J. & OLSEN, R. H. Genetic organization and regulation of a meta cleavage pathway for catechols produced from catabolism of toluene, benzene, phenol and cresols by *Pseudomonas picketti* PKO1. **Bacteriology**. v.173, p.4587-4594, 1991.

KUROSAWA, N.; ITOH, Y. H.; ITOH, T. *Thermus kawarayensis* sp. nov., a new member of the genus *Thermus*, isolated from Japanese hot springs". **Extremophiles**, v.1, n.9, p.81-84, 2005.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. D. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.9, p. 3614-3621,1997.

LOVLEY D.R. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. **Nature Reviews Microbiology**, v.1, p.35–44, 2003.

LOVLEY, D. R. Anaerobes to the Rescue. **Science**, v.5534, n.293, p.1444-1446, 2001.

LUDWIG W.; BAUER S. H.; BAUER M.; HELD I.; KIRCHHOF G.; SCHULZE R.; HUBER I.; SPRING S.; HARTMANN A.; SCHLEIFER K. H. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Letters**. Amsterdam: v.153, n.1, p.181-190, 1997.

MEDINA, N. M.; SANTOS, E. **Educação ambiental** - Uma metodologia participativa de formação. Petrópolis: Vozes, 1999.

MENDES, C. P. **Núcleos habitacionais de Cubatão**. Disponível em <<http://www.novomilenio.inf.br/cubatao/cbairnm.htm>>. Acesso em 18 de outubro de 2011.

MOISA, R. E. **Avaliação Qualitativa de Passivos Ambientais em Postos de Serviço Através do Método de Análise Hierárquica de Processo**. 2005. 157 fls. Dissertação (mestrado em Engenharia). Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MURRAY, K. & WILLIAMS P. A. Role of Catechol and the Methylcatechols as Inducers of Aromatic Metabolism in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, v. 117, nº 3, p. 1153-1157, 1974.

NOVAES, T. C. P. **Bases Metodológicas para Abordagem da Exposição ao Benzeno**. 1992. Dissertação (mestrado em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

PAUL, D.; CHAUHAN, A.; PANDEY, G.; JAIN, R. K. Degradation of phydroxybenzoate via protocatechuate in *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 and *Burkholderia cepacia* RKJ200. *Current Science*, v. 87, nº 9, 2004.

PHALE, P. S.; BASU, A.; MAJHI, P.D.; DEVERYSHETTY, J.; VAMSEE-KRISHNA, C.; SHRIVASTAVA, R. Metabolic Diversity in Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v.3, n.11, p.253-279, 2007.

PHILIPPI JR, A. ; PELICIONI, M. C. F . **Educação ambiental e sustentabilidade**. 1. ed. Barueri: Manole, v. 1, 878 p. 2005.

PHILIPPI JR., A.; MARTINS, G. Águas de Abastecimento. In: **Saneamento, Saúde e Ambiente**. Barueri: Editora Manole, 2005.

RONDON, M.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. J. GROSSMAN T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M.; CLARDY, J.; HANDESMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the soil metagenome: a strategy from accessing the genetic and funtional diversity of uncultured microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n. 6, p. 2541-47, 2000.

SAMBROOK R.; Fritsch E. F.; Maniatis, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. In: **Cold Spring Harbour** : Cold Spring Harbour Laboratory, 2ed., v.3, 1989.

SANDAA, R.A. & TORSVIK, V. E. Rapid methods for fluorometric quantification of DNA in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter: v. 30, n. 2, p. 265-268, 1998.

SANTOS, A. C. F. **Utilização do tolueno como única fonte de carbono por microrganismos Isolados de um Landfarming**. Trabalho de conclusão de curso – Graduação em Engenharia. Universidade Estadual de Santa Cruz, BA. 2004.

SANTOS, W. L. P. dos; MORTIMER, E. F. Tomada de decisão para ação social responsável no ensino de ciências. **Ciência & Educação**, v. 7, n. 1, p. 95-111, 2001.

SCHIANETZ, B. **Passivos Ambientais**. Curitiba: SENAI, 1999.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.3, n.14, p.303-310, 2003.

SCHNEIDER, R. P.; MORANO, S. C.; GIGENA, M. A. C.; MISSAWA, S. K.; ROCHA, R. C. S.; SILVA, L. R.; ELLERT, N.; KATAOKA, S.; KATSURAGI, C.; ROSA, S. C.; FILHO, L. C. O. Contamination levels and preliminary assessment of the technical feasibility of employing natural attenuation in 5 priority areas of Presidente Bernardes refinery in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.1-3, n.116, p.21-52, 2006.

SEBAT, J.L.; COLWELL, F.S.; CRAWFORD, R.L. Metagenomic Profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington: v.69, n.08, p. 4927-4934, 2003.

SENTCHILO, V.S., PEREBITUK, A. N. ZEHNDER, A. J.. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas strains* isolated from different contaminated sites in Belarus. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.2842-2852, 2000.

SHIANETZ, B. **Passivos Ambientais**. Curitiba: SENAI, 1999.

SILVA, R. L. B.; BARRA, M. C. MONTEIRO, T. C. N.; BRILHANTE, O. M. "Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil". **Caderno Saúde Pública**, v.6, n.18, 2002.

SINGH, O. V. Proteomics and metabolomics: the molecular make-up of toxic aromatic pollutant bioremediation. **Proteomics**, v.6, p.5481-5492, 2006.

SMITH, M.R. The biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria. **Biodegradation**, v.1, p. 191-206, 1990.

STALEY, J. T.; KONOPLA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto: n. 39, p. 321-346, 1985.

TÁNCICS, A.; SZOBOSZLAY, S.; KRISZT, B.; KUKOLYA, J.; BAKA, E.; MÁRIALIGETI, K.; RÉVÉSZ, S. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. **Journal of Applied Microbiology**, v.4, n.105, p.1026-1033, 2008.

THAKUR I. S.; VENNA P.; UPADHAYAYA K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.290, p. 770-774, 2002.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v.3, n.27, p.441-446, 2004.

TIMMIS, K.N.; PIEPER, D.H. Bacteria designed for bioremediation. **Trends of Biotechnology**, v. 17, p. 200–204, 1999.

TORRES, F. R.; BRAGA Jr, J. C.; BORGES, W. R. **O que você precisa saber sobre Cubatão**. São Paulo: Design & Print e Arquivo Histórico Municipal de Cubatão, 2002. Disponível em <<http://www.novomilenio.inf.br>>. Acesso em 20 de outubro de 2011.

VOGT, C.; POLINO, C. (Orgs). **Percepção Pública da Ciência: resultados da pesquisa em Argentina, Brasil, Espanha e Uruguai**. Campinas: Editora da Unicamp, p.187, 2003.

WANG, L.; QIAO, N.; SUN, F.; SHAO, Z. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. **Extremophiles**, v.3, n.12, p.335-342, 2008.

WANG, X.; YU, W.; BARTHA, R., Effect of Bioremediation on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Residues in Soil. **Environmental & Science Technology**, v. 24: pp.1086 – 1089, 1990.

WATTS, R.J.; HALLER, D.R.; JONES, A.P. & TEEL, A.L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. **Journal of Hazardous Materials**, v.76, p.73-89, 2000.

ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington: v. 62, p. 316-22, 1996.

ANEXOS

ANEXO A - Boletim de análise do solo

BOLETIM DE ANÁLISE Nº 60416/2011-0

Processo Comercial Nº 3727/2011-1

DADOS REFERENTES AO CLIENTE

Empresa solicitante:	Bruno Karolski
Endereço:	Rua do Matao, 277 - sala 153 Cidade Universitaria - São Paulo-SP - CEP: 05.508-090 .
Nome do Solicitante:	Bruno Karolski

DADOS REFERENTES A AMOSTRA

Identificação do Cliente:	Solo		
Amostra Rotulada como:	Solo		
Coletor:	Interessado	Data da coleta:	22/3/2011
Data da entrada no laboratório:	22/03/2011 14:03:00	Data de Elaboração do BA:	11/04/2011

RESULTADOS ANALÍTICOS DA AMOSTRA

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Porcentagem de Sólidos	% o/b	0,05	82,9
Índice de Fenóis	mg/ke	0,06	1,5
Prata	mg/ke	0,4	< 0,4
Alumínio	mg/ke	0,4	10600
Arsênio	mg/ke	0,4	< 0,4
Bário	mg/ke	0,4	37
Berílio	mg/ke	0,4	< 0,4
Bismuto	mg/ke	0,4	< 0,4
Cádmio	mg/ke	0,043	< 0,043
Cobalto	mg/ke	0,4	5,2
Cromo	mg/ke	0,4	24
Lítio	mg/ke	0,4	11
Molibdênio	mg/ke	0,4	< 0,4
Sódio	mg/ke	21	77
Níquel	mg/ke	0,4	6,7
Chumbo	mg/ke	0,4	46
Antimônio	mg/ke	0,4	< 0,4
Selênio	mg/ke	0,4	< 0,4
Estanho	mg/ke	0,4	< 0,4
Estrôncio	mg/ke	0,4	1,7
Titânio	mg/ke	0,4	560
Tálio	mg/ke	0,4	< 0,4
Urânio	mg/ke	0,4	< 0,4
Vanádio	mg/ke	0,4	26
Dureza Calculada	mg/ke	141,4	7776

BTEX

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Benzeno	mg/ke	0,006	< 0,006
Tolueno	mg/ke	0,006	< 0,006
Etilbenzeno	mg/ke	0,006	< 0,006
o-Xileno	mg/ke	0,006	< 0,006
m,p-Xilenos	mg/ke	0,012	< 0,012

PAH

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Benzo(a)pireno	mg/ke	0,24	< 0,24
Benzo(b)fluoranteno	mg/ke	0,24	< 0,24
Benzo(k)fluoranteno	mg/ke	0,24	< 0,24
Criseno	mg/ke	0,24	< 0,24
Acenaftileno	mg/ke	0,24	< 0,24
Fluoreno	mg/ke	0,24	< 0,24
Antraceno	mg/ke	0,24	< 0,24
Benzo(e,h,i)perileno	mg/ke	0,24	< 0,24
Fenantreno	mg/ke	0,24	< 0,24
Dibenzo(a,h)lantraceno	mg/ke	0,24	< 0,24
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/ke	0,24	< 0,24
Pireno	mg/ke	0,24	< 0,24

PAH

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Acenafeno	mg/ke	0.24	< 0.24
Fluoranteno	mg/ke	0.24	< 0.24
Naftaleno	mg/ke	0.24	< 0.24
Benzo(a)lantraceno	mg/ke	0.24	< 0.24

CTC - Capacidade de Troca Catiônica

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
pH em CaCl ₂		---	4,3
Matéria Orgânica	g/dm ³	---	8
Fósforo Resina	mg/dm ³	---	1
Potássio	mmol/dm ³		0.6
Cálcio	mmol/dm ³		16
Magnésio	mmol/dm ³		4
H+Al	mmol/dm ³	---	31
Al	mmol/dm ³	---	4
Soma de Bases	mmol/dm ³	---	21
CTC	mmol/dm ³	---	52
Saturação de Bases	V %	---	40
Saturação Al	m %	---	16

Micronutrientes

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Cobre	mg/ke	0.4	12
Ferro	mg/ke	0.4	8668
Zinco	mg/ke	0.4	24
Manganês	mg/ke	0.4	153
Boro	mg/ke	0.4	81

Granulometria

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Areia (< 0.002 mm)	g/kg	0.01	0
Silte (0.053 a 0.002 mm)	g/kg	0.01	305
Areia Total (2.00 a 0.053 mm)	g/kg	0.01	695
Areia Grossa (2.00 a 0.210 mm)	g/kg	0.01	460
Areia Fina (0.210 a 0.053 mm)	g/kg	0.01	235

Macronutrientes - Solo

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg/ke	2.7	271
Enxofre	mg/ke	60	78
Fósforo	mg/ke	0.4	60

CONTROLE DE QUALIDADE DO LABORATÓRIO

Controle de Qualidade - TPH Voláteis + BTEX - Solo

60738/2011-0 - Branco de Análise - TPH Voláteis + BTEX - Solo

Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos
Benzeno	mg/ke	0.005	< 0.005
Tolueno	mg/ke	0.005	< 0.005
Etilbenzeno	mg/ke	0.005	< 0.005
m,p-Xilenos	mg/ke	0.01	< 0.01
o-Xileno	mg/ke	0.005	< 0.005

Ensaios de Recuperação

Parâmetros	Quantidade Adicionada	Unidade	Resultado da Recuperação (%)	Faixa Aceitável de Recuperação (%)
60739/2011-0 - LCS - TPH Voláteis + BTEX - Solo				
Benzeno	0.05	mg/ke	70	60 - 140
Tolueno	0.05	mg/ke	73	60 - 140
Etilbenzeno	0.05	mg/ke	74	60 - 140
m,p-Xilenos	0.1	mg/ke	75	60 - 140
o-Xileno	0.05	mg/ke	72	60 - 140
Surrogates				
60738/2011-0 - Branco de Análise - TPH Voláteis + BTEX - Solo				
Tolueno-d8	0.05	%	75	60 - 140
p-Bromofluorbenzeno	0.05	%	83	60 - 140
60739/2011-0 - LCS - TPH Voláteis + BTEX - Solo				
Tolueno-d8	0.05	%	80	60 - 140
p-Bromofluorbenzeno	0.05	%	91	60 - 140
60416/2011-0 - Solo				
Tolueno-d8	0.05	%	81	60 - 140

p-Bromofluorbenzeno	0.05	%	89	60 - 140
Controle de Qualidade - PAH - Amostras Sólidas				
61573/2011-0 - Branco de Análise - PAH - Solo				
Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos	
Benzol(a)pireno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Benzol(b)fluoranteno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Benzol(k)fluoranteno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Criseno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Acenafileno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Fluoreno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Antraceno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Benzol(g,h,i)perileno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Perantreno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Dibenzol(a,h)antraceno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Indeno(1,2,3-cd)pireno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Pireno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Acenafieno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Fluoranteno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Naftaleno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Benzol(a)antraceno	mg/kg	0.01	< 0.01	
Ensaios de Recuperação				
Parâmetros	Quantidade Adicionada	Unidade	Resultado da Recuperação (%)	Faixa Aceitável de Recuperação (%)
61574/2011-0 - LCS - PAH - Solo				
Perantreno	0.2	mg/kg	57	40 - 120
Naftaleno	0.2	mg/kg	45	40 - 120
Fluoranteno	0.2	mg/kg	66	40 - 120
Criseno	0.2	mg/kg	49	40 - 120
Pireno	0.2	mg/kg	64	40 - 120
Surrogates				
61573/2011-0 - Branco de Análise - PAH - Solo				
2-Fluoribifenil	0.2	%	50	40 - 120
Terfenil d14	0.2	%	66	40 - 120
61574/2011-0 - LCS - PAH - Solo				
2-Fluoribifenil	0.2	%	51	40 - 120
Terfenil d14	0.2	%	72	40 - 120
60416/2011-0 - Solo				
Terfenil d14	0.24	%	Amostra Diluída	40 - 120
2-Fluoribifenil	0.24	%	Amostra Diluída	40 - 120
Controle de Qualidade - Metais - Solo				
57802/2011-0 - Branco de Análise - Metais - Solo				
Parâmetros	Unidade	LO	Resultados analíticos	
Prata	mg/kg	0.5	< 0.5	
Prata	mg/kg	0.5	< 0.5	
Alumínio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Alumínio	mg/kg	0.5	11	
Arsênio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Arsênio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Bário	mg/kg	0.5	< 0.5	
Bário	mg/kg	0.5	< 0.5	
Berílio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Berílio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Bismuto	mg/kg	0.5	< 0.5	
Bismuto	mg/kg	0.5	< 0.5	
Cálcio	mg/kg	25	< 25	
Cálcio	mg/kg	25	< 25	
Cádmio	mg/kg	0.05	< 0.05	
Cádmio	mg/kg	0.05	< 0.05	
Cobalto	mg/kg	0.5	< 0.5	
Cobalto	mg/kg	0.5	< 0.5	
Cromo	mg/kg	0.5	< 0.5	
Cromo	mg/kg	0.5	< 0.5	
Cobre	mg/kg	0.5	< 0.5	
Cobre	mg/kg	0.5	< 0.5	
Ferro	mg/kg	0.5	< 0.5	
Ferro	mg/kg	0.5	< 0.5	
Potássio	mg/kg	25	44	
Potássio	mg/kg	25	< 25	
Lítio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Lítio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Magnésio	mg/kg	25	< 25	
Magnésio	mg/kg	25	< 25	
Manganês	mg/kg	0.5	< 0.5	
Manganês	mg/kg	0.5	< 0.5	
Molibdênio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Molibdênio	mg/kg	0.5	< 0.5	
Sódio	mg/kg	25	< 25

PAH - Solo

RT: 0.00 - 14.77

Notas

LO = Limite de Quantificação.

Abrangência

O(s) resultado(s) se referem somente à(s) amostra(s) analisada(s).

Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Data de realização das análises

A Bioagri Ambiental garante que todas as análises foram executadas dentro do prazo de validade de cada parâmetro segundo o Guia de Coleta e Preservação de Amostra da Bioagri Ambiental, quando todo o trâmite analítico (coleta e análise) é de responsabilidade da Bioagri Ambiental. Quando a coleta é de responsabilidade do interessado, caso haja algum desvio, o cliente é previamente consultado sobre a disposição das amostras e a continuidade do processo analítico.

Todas estas datas constam nos dados brutos das análises e estão à disposição para serem solicitadas a qualquer momento pelo interessado.

Plano de Amostragem

Plano de amostragem de responsabilidade do interessado.

Trabalhos Subcontratados

As análises dos parâmetros pH em CaCl₂, Matéria Orgânica, Fósforo Resina, Potássio, Cálcio, Magnésio, H+Al, Al, Soma de Bases, CTC, Saturação de Bases, Saturação Al foram executadas em laboratório subcontratado autorizados pela GOL - Bioagri Ambiental.

Referências Metodológicas

Índice de Fenóis: USEPA SW 846 - 9065 - Phenolics (Spectrophotometric, Manual 4-AAP with Distillation)

Nitrogênio Total Kjeldahl: POP PA 113 / SMWW 4500

Granulometria: ISO 13320-1/1999 - Análise de Partícula por Difração a Laser

SVOC's: POP PA 076, 096 / USEPA SW 846 - 8270D e 3510C, SMWW 6410B

Metais (ICP-OES): POP PA 035 / SMWW 3120 B, USEPA 6010

VOC: POP PA 075 / USEPA SW 846 8260C, 5021A

Sólidos Totais: POP PA 009 / SMWW 2540B

Revisores

Débora Fernandes da Silva

Rodrigo Caldorin

Nereida Anarecida Bonagiamo

André Alex Colletti

Chave de Validação: a60e3300e0b263af44bbe58bedd7a97f

Juliana Bombasaro
Coordenadora de Projeto
CRQ 04469985 - 4ª Região

ANEXO B - DECRETO Nº 9.410

**DECRETO Nº 9.410
DE 15 DE SETEMBRO DE 2009**

**DECLARA COMO UNIDADES ESPACIAIS
DE PESQUISA E ESTATÍSTICA (UEPE'S) DO
MUNICÍPIO DE CUBATÃO, E DÁ OUTRAS
PROVIDÊNCIAS.**

MARCIA ROSA DE MENDONÇA SILVA, Prefeita Municipal de Cubatão, no uso de suas atribuições legais, de conformidade com o artigo 76, itens IX e XII da Lei Orgânica do Município; e

CONSIDERANDO, a dificuldade de identificação e organização espacial no apoio às ações administrativas no Município de Cubatão;

CONSIDERANDO, que várias áreas do Município sequer possuem identificação quanto à sua denominação e perímetro;

CONSIDERANDO, que a cartografia municipal não estabelece os perímetros sócio-espaciais administrativos na totalidade territorial do Município;

CONSIDERANDO, que as Secretarias Municipais e Comissões Permanentes, com o intuito de organizar sua atuação no espaço municipal, denominam e traçam diferentemente os limites de áreas, de forma subjetiva e,

portanto incompatíveis entre si, tornando caótico o entendimento do espaço municipal;

CONSIDERANDO, a importância de estabelecer perímetros administrativos internos no Município para dar clareza às ações do Poder Executivo no espaço municipal; e

CONSIDERANDO, a necessidade de promover a organização espacial municipal, a estatística sócio-espacial e o desenvolvimento social, econômico e ambiental;

DECRETA

Art. 1º Ficam declaradas como Unidades Espaciais de Pesquisa e Estatística (UEPE's) as Unidades Espaciais de Pesquisa e Estatística que abrangem a totalidade da área do Município.

Parágrafo único - Para fins deste Decreto, considera-se:

I - Unidades Espaciais Urbanas:

UEPE - 01 / Vila Elizabeth;

UEPE - 02 / Sítio Cafezal;

UEPE - 03 / Jardim Anchieta;

UEPE - 04 / Jardim São Francisco;

UEPE - 05 / Centro;

UEPE - 06 / Vila Couto;

UEPE - 07 / Santa Rosa;
UEPE - 08 / Vila Nova;
UEPE - 09 / Vila Natal;
UEPE - 10 / Vila São José;
UEPE - 11 / Jardim Nova República;
UEPE - 12 / Parque São Luís;
UEPE - 13 / Jardim Casqueiro;
UEPE - 14 / Ilha Caraguatá;
UEPE - 15 / Vale Verde;
UEPE - 16 / Vila Fabril;
UEPE - 17 / Vila Light.

II - Unidades Espaciais Transitórias:

UEPE - 18 / Pinhal do Miranda;
UEPE - 19 / Cota 200;
UEPE - 20 / Itutinga-Pilões
UEPE - 21 / Vila Esperança;
UEPE - 22 / Vila dos Pescadores;

III - Unidades Espaciais Ambientais:

UEPE - A / Serra Pilões-Zanzalá;
UEPE - B / Caminho do Mar;
UEPE - C / Parque Perequê;
UEPE - D / Serra do Poço do Meio;
UEPE - E / Serra do Mogi;
UEPE - F / Serra do Morrão;
UEPE - G / Areais;

UEPE - H / Guará-Vermelho;
UEPE - I / Ilha Pombeva;
UEPE - J / Ilha do Tatu;
UEPE - K / Volta do Santana;
UEPE - L / Ilha Nhapium;
UEPE - M / Cotia-Pará;
UEPE - N / Paranhos;
UEPE - O / Marzagão;
UEPE - P / Mãe Maria.

IV - Unidades Espaciais Industriais:

UEPE - IND1 / Cruzeiro Quinhentista;
UEPE - IND2 / Perequê;
UEPE - IND3 / Raiz da Serra;
UEPE - IND4 / Piaçagüera.

Art. 2º Para efeito deste decreto, considera-se:

- I - Unidades Espaciais Urbanas:** são áreas habitacionais e comerciais urbanizadas consolidadas e reconhecidas pelo Poder Público;
- II - Unidades Espaciais Transitórias:** são assentamentos habitacionais irregulares de grande extensão que aguardam definição do Poder Público quanto à sua regularização, seguida de urbanização ou remoção para outro local;
- III - Unidades Espaciais Ambientais:** são grandes vazios demográficos, com forte presença de vegetação nativa, ora degradada, ora preservada, campos antrópicos e áreas com solo exposto ou

movimentação de terra, com uso e ocupação futura, conforme anuência das leis ambientais e regras disciplinadoras do Plano Diretor vigente;

IV - Unidades Espaciais Industriais: são áreas onde está consolidado e consagrado o uso do espaço pelos meios de produção industrial e áreas adjacentes com perfil para expansão desta atividade, de acordo com as leis ambientais e regras disciplinadoras do Plano Diretor vigente;

Art. 3º A disposição das UEPE's no Município está gravada no Mapa de Unidades Espaciais de Pesquisa e Estatística constante no Anexo I e a descrição de seus respectivos perímetros é a prevista no Anexo II deste Decreto.

Parágrafo único - As eventuais alterações quanto à denominação, recuo ou expansão de perímetros, criação ou supressão de uma ou mais UEPE's, serão discutidas bienalmente pela Secretaria Municipal de Planejamento, através de sua Divisão de Desenvolvimento Econômico, com apoio cartográfico da Divisão de Planejamento Urbano.

Art. 4º Para a consecução da organização espacial no Município as UEPE's deverão ser adotadas em qualquer ação administrativa em que for necessária a localização, identificação e mensuração sócio-espacial, socioeconômica e socioambiental, para fins estatísticos no Município de Cubatão, bem como, para organizar espacialmente outras ações do poder público municipal, especialmente:

I - Nas propostas do Orçamento Participativo;

- II -** Nas diretrizes do Plano Plurianual;
- III -** Na Planta Genérica de Valores;
- IV -** No mapeamento epidemiológico;
- V -** Nas pesquisas socioeconômicas;
- VI -** Nos planos, programas e projetos habitacionais;
- VII -** Na identificação de áreas naturais ou impactadas ambientalmente;
- VIII -** Na otimização do transporte público e escolar;
- IX -** Na identificação de habitações, próprios públicos, patrimônios históricos, arquitetônicos e culturais, glebas e terrenos;
- X -** Na adequação dos setores censitários do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;
- XI -** Na contratação, execução e divulgação de pesquisas de qualquer natureza;
- XII -** Na contratação, execução de obras públicas e serviços;
- XIII -** Na sistematização de bancos de dados das secretarias municipais;
- XIV -** Nas publicações e notas oficiais do Poder Executivo.

Parágrafo único - As UEPE's visam identificar e organizar o território municipal em unidades sócio-espaciais, não tendo portanto, qualquer efeito condicionante, atenuante, permissivo ou proibitivo quanto ao uso e à ocupação do solo, tampouco concorrem ou alteram os princípios, dispositivos e as determinações do zoneamento municipal, que continuam sendo regidos PELA LEGISLAÇÃO ESPECÍFICA, bem como, não interferem e nem conflitam com a soberania das legislações ambientais vigentes.

Art. 5º As UEPE's passam ser a divisão administrativa oficial do Município de Cubatão para o efeito previsto no artigo 4º.

Art. 6º Os cognomes, pseudo-bairros, assentamentos irregulares, localidades, loteamentos, conjuntos habitacionais e outras formas subjetivas de toponímia, podem constar na documentação oficial do município, porém, a partir da data de publicação deste Decreto, se torna necessário constar também o registro da UEPE onde o objeto ou evento a ser tratado pelo Poder Público Municipal está localizado.

Art. 7º Este Decreto entra em vigor na data de sua publicação.

PREFEITURA MUNICIPAL DE CUBATÃO

EM 15 DE SETEMBRO DE 2009

**“476º da Fundação do Povoado
60º da Emancipação”**

MARCIA ROSA DE MENDONÇA SILVA

Prefeita Municipal

Dr. JOSÉ EDUARDO LIMONGI FRANÇA GUILHERME

Secretário Municipal de Negócios Jurídicos

BENITO SANTIAGO MARTINEZ GONZALEZ

Secretário Municipal de Indústria, Comércio, Porto e Desenvolvimento

Arqº ADALBERTO FERREIRA DA SILVA

Secretário Municipal de Planejamento

ANEXO C - LEI Nº 9.795

LEI Nº 9.795, DE 27 DE ABRIL DE 1999.

Dispõe sobre a educação ambiental, institui a Política Nacional de Educação Ambiental e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

CAPÍTULO I

DA EDUCAÇÃO AMBIENTAL

Art. 1º Entendem-se por educação ambiental os processos por meio dos quais o indivíduo e a coletividade constroem valores sociais, conhecimentos, habilidades, atitudes e competências voltadas para a conservação do meio ambiente, bem de uso comum do povo, essencial à sadia qualidade de vida e sua sustentabilidade.

Art. 2º A educação ambiental é um componente essencial e permanente da educação nacional, devendo estar presente, de forma articulada, em todos os níveis e modalidades do processo educativo, em caráter formal e não-formal.

Art. 3º Como parte do processo educativo mais amplo, todos têm direito à educação ambiental, incumbindo:

I - ao Poder Público, nos termos dos arts. 205 e 225 da Constituição Federal, definir políticas públicas que incorporem a dimensão ambiental, promover a educação ambiental em todos os níveis de ensino e o engajamento da sociedade na conservação, recuperação e melhoria do meio ambiente;

II - às instituições educativas, promover a educação ambiental de maneira integrada aos programas educacionais que desenvolvem;

III - aos órgãos integrantes do Sistema Nacional de Meio Ambiente - Sisnama, promover ações de educação ambiental integradas aos programas de conservação, recuperação e melhoria do meio ambiente;

IV - aos meios de comunicação de massa, colaborar de maneira ativa e permanente na disseminação de informações e práticas educativas sobre meio ambiente e incorporar a dimensão ambiental em sua programação;

V - às empresas, entidades de classe, instituições públicas e privadas, promover programas destinados à capacitação dos trabalhadores, visando à melhoria e ao controle efetivo sobre o ambiente de trabalho, bem como sobre as repercussões do processo produtivo no meio ambiente;

VI - à sociedade como um todo, manter atenção permanente à formação de valores, atitudes e habilidades que propiciem a atuação individual e coletiva voltada para a prevenção, a identificação e a solução de problemas ambientais.

Art. 4º São princípios básicos da educação ambiental:

I - o enfoque humanista, holístico, democrático e participativo;

II - a concepção do meio ambiente em sua totalidade, considerando a interdependência entre o meio natural, o sócio-econômico e o cultural, sob o enfoque da sustentabilidade;

III - o pluralismo de idéias e concepções pedagógicas, na perspectiva da inter, multi e transdisciplinaridade;

IV - a vinculação entre a ética, a educação, o trabalho e as práticas sociais;

V - a garantia de continuidade e permanência do processo educativo;

VI - a permanente avaliação crítica do processo educativo;

VII - a abordagem articulada das questões ambientais locais, regionais, nacionais e globais;

VIII - o reconhecimento e o respeito à pluralidade e à diversidade individual e cultural.

Art. 5º São objetivos fundamentais da educação ambiental:

I - o desenvolvimento de uma compreensão integrada do meio ambiente em suas múltiplas e complexas relações, envolvendo aspectos ecológicos, psicológicos, legais, políticos, sociais, econômicos, científicos, culturais e éticos;

II - a garantia de democratização das informações ambientais;

III - o estímulo e o fortalecimento de uma consciência crítica sobre a problemática ambiental e social;

IV - o incentivo à participação individual e coletiva, permanente e responsável, na preservação do equilíbrio do meio ambiente, entendendo-se a defesa da qualidade ambiental como um valor inseparável do exercício da cidadania;

V - o estímulo à cooperação entre as diversas regiões do País, em níveis micro e macrorregionais, com vistas à construção de uma sociedade ambientalmente equilibrada, fundada nos princípios da liberdade, igualdade, solidariedade, democracia, justiça social, responsabilidade e sustentabilidade;

VI - o fomento e o fortalecimento da integração com a ciência e a tecnologia;

VII - o fortalecimento da cidadania, autodeterminação dos povos e solidariedade como fundamentos para o futuro da humanidade.

CAPÍTULO II

DA POLÍTICA NACIONAL DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL

Seção I

Disposições Gerais

Art. 6º É instituída a Política Nacional de Educação Ambiental.

Art. 7º A Política Nacional de Educação Ambiental envolve em sua esfera de ação, além dos órgãos e entidades integrantes do Sistema Nacional de Meio Ambiente - Sisnama, instituições educacionais públicas e privadas dos sistemas de ensino, os órgãos públicos da União, dos Estados, do Distrito Federal e dos Municípios, e organizações não-governamentais com atuação em educação ambiental.

Art. 8º As atividades vinculadas à Política Nacional de Educação Ambiental devem ser desenvolvidas na educação em geral e na educação escolar, por meio das seguintes linhas de atuação inter-relacionadas:

- I - capacitação de recursos humanos;
- II - desenvolvimento de estudos, pesquisas e experimentações;
- III - produção e divulgação de material educativo;
- IV - acompanhamento e avaliação.

§ 1º Nas atividades vinculadas à Política Nacional de Educação Ambiental serão respeitados os princípios e objetivos fixados por esta Lei.

§ 2º A capacitação de recursos humanos voltar-se-á para:

- I - a incorporação da dimensão ambiental na formação, especialização e atualização dos educadores de todos os níveis e modalidades de ensino;

II - a incorporação da dimensão ambiental na formação, especialização e atualização dos profissionais de todas as áreas;

III - a preparação de profissionais orientados para as atividades de gestão ambiental;

IV - a formação, especialização e atualização de profissionais na área de meio ambiente;

V - o atendimento da demanda dos diversos segmentos da sociedade no que diz respeito à problemática ambiental.

§ 3º As ações de estudos, pesquisas e experimentações voltar-se-ão para:

I - o desenvolvimento de instrumentos e metodologias, visando à incorporação da dimensão ambiental, de forma interdisciplinar, nos diferentes níveis e modalidades de ensino;

II - a difusão de conhecimentos, tecnologias e informações sobre a questão ambiental;

III - o desenvolvimento de instrumentos e metodologias, visando à participação dos interessados na formulação e execução de pesquisas relacionadas à problemática ambiental;

IV - a busca de alternativas curriculares e metodológicas de capacitação na área ambiental;

V - o apoio a iniciativas e experiências locais e regionais, incluindo a produção de material educativo;

VI - a montagem de uma rede de banco de dados e imagens, para apoio às ações enumeradas nos incisos I a V.

Seção II

Da Educação Ambiental no Ensino Formal

Art. 9º Entende-se por educação ambiental na educação escolar a desenvolvida no âmbito dos currículos das instituições de ensino públicas e privadas, englobando:

I - educação básica:

a) educação infantil;

b) ensino fundamental e

c) ensino médio;

II - educação superior;

III - educação especial;

IV - educação profissional;

V - educação de jovens e adultos.

Art. 10. A educação ambiental será desenvolvida como uma prática educativa integrada, contínua e permanente em todos os níveis e modalidades do ensino formal.

§ 1º A educação ambiental não deve ser implantada como disciplina específica no currículo de ensino.

§ 2º Nos cursos de pós-graduação, extensão e nas áreas voltadas ao aspecto metodológico da educação ambiental, quando se fizer necessário, é facultada a criação de disciplina específica.

§ 3º Nos cursos de formação e especialização técnico-profissional, em todos os níveis, deve ser incorporado conteúdo que trate da ética ambiental das atividades profissionais a serem desenvolvidas.

Art. 11. A dimensão ambiental deve constar dos currículos de formação de professores, em todos os níveis e em todas as disciplinas.

Parágrafo único. Os professores em atividade devem receber formação complementar em suas áreas de atuação, com o propósito de atender adequadamente ao cumprimento dos princípios e objetivos da Política Nacional de Educação Ambiental.

Art. 12. A autorização e supervisão do funcionamento de instituições de ensino e de seus cursos, nas redes pública e privada, observarão o cumprimento do disposto nos arts. 10 e 11 desta Lei.

Seção III

Da Educação Ambiental Não-Formal

Art. 13. Entendem-se por educação ambiental não-formal as ações e práticas educativas voltadas à sensibilização da coletividade sobre as questões ambientais e à sua organização e participação na defesa da qualidade do meio ambiente.

Parágrafo único. O Poder Público, em níveis federal, estadual e municipal, incentivará:

I - a difusão, por intermédio dos meios de comunicação de massa, em espaços nobres, de programas e campanhas educativas, e de informações acerca de temas relacionados ao meio ambiente;

II - a ampla participação da escola, da universidade e de organizações não-governamentais na formulação e execução de programas e atividades vinculadas à educação ambiental não-formal;

III - a participação de empresas públicas e privadas no desenvolvimento de programas de educação ambiental em parceria com a escola, a universidade e as organizações não-governamentais;

IV - a sensibilização da sociedade para a importância das unidades de conservação;

V - a sensibilização ambiental das populações tradicionais ligadas às unidades de conservação;

VI - a sensibilização ambiental dos agricultores;

VII - o ecoturismo.

CAPÍTULO III

DA EXECUÇÃO DA POLÍTICA NACIONAL DE EDUCAÇÃO AMBIENTAL

Art. 14. A coordenação da Política Nacional de Educação Ambiental ficará a cargo de um órgão gestor, na forma definida pela regulamentação desta Lei.

Art. 15. São atribuições do órgão gestor:

I - definição de diretrizes para implementação em âmbito nacional;

II - articulação, coordenação e supervisão de planos, programas e projetos na área de educação ambiental, em âmbito nacional;

III - participação na negociação de financiamentos a planos, programas e projetos na área de educação ambiental.

Art. 16. Os Estados, o Distrito Federal e os Municípios, na esfera de sua competência e nas áreas de sua jurisdição, definirão diretrizes, normas e critérios para a educação ambiental, respeitados os princípios e objetivos da Política Nacional de Educação Ambiental.

Art. 17. A eleição de planos e programas, para fins de alocação de recursos públicos vinculados à Política Nacional de Educação Ambiental, deve ser realizada levando-se em conta os seguintes critérios:

I - conformidade com os princípios, objetivos e diretrizes da Política Nacional de Educação Ambiental;

II - prioridade dos órgãos integrantes do Sisnama e do Sistema Nacional de Educação;

III - economicidade, medida pela relação entre a magnitude dos recursos a alocar e o retorno social propiciado pelo plano ou programa proposto.

Parágrafo único. Na eleição a que se refere o *caput* deste artigo, devem ser contemplados, de forma eqüitativa, os planos, programas e projetos das diferentes regiões do País.

Art. 18. [\(VETADO\)](#)

Art. 19. Os programas de assistência técnica e financeira relativos a meio ambiente e educação, em níveis federal, estadual e municipal, devem alocar recursos às ações de educação ambiental.

CAPÍTULO IV

DISPOSIÇÕES FINAIS

Art. 20. O Poder Executivo regulamentará esta Lei no prazo de noventa dias de sua publicação, ouvidos o Conselho Nacional de Meio Ambiente e o Conselho Nacional de Educação.

Art. 21. Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Brasília, 27 de abril de 1999; 178^o da Independência e 111^o da República.

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

ANEXO D - LEI Nº 6.938

LEI Nº 6.938, DE 31 DE AGOSTO DE 1981.

Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA, faço saber que o CONGRESSO NACIONAL decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Art 1º - Esta Lei, com fundamento no art. 8º, item XVII, alíneas c, h e i, da Constituição Federal, estabelece a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, constitui o Sistema Nacional do Meio Ambiente, cria o Conselho Nacional do Meio Ambiente e institui o Cadastro Técnico Federal de Atividades e instrumentos de Defesa Ambiental.

DA POLÍTICA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE

Art 2º - A Política Nacional do Meio Ambiente tem por objetivo a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental propícia à vida, visando assegurar, no País, condições ao desenvolvimento sócio-econômico, aos interesses da segurança nacional e à proteção da dignidade da vida humana, atendidos os seguintes princípios:

I - ação governamental na manutenção do equilíbrio ecológico, considerando o meio ambiente como um patrimônio público a ser necessariamente assegurado e protegido, tendo em vista o uso coletivo;

II - racionalização do uso do solo, do subsolo, da água e do ar;

III - planejamento e fiscalização do uso dos recursos ambientais;

IV - proteção dos ecossistemas, com a preservação de áreas representativas;

V - controle e zoneamento das atividades potencial ou efetivamente poluidoras;

VI - incentivos ao estudo e à pesquisa de tecnologias orientadas para o uso racional e a proteção dos recursos ambientais;

VII - acompanhamento do estado da qualidade ambiental;

VIII - recuperação de áreas degradadas;

IX - proteção de áreas ameaçadas de degradação;

X - educação ambiental a todos os níveis de ensino, inclusive a educação da comunidade, objetivando capacitá-la para participação ativa na defesa do meio ambiente.

Art 3º - Para os fins previstos nesta Lei, entende-se por:

I - meio ambiente, o conjunto de condições, leis, influências e interações de ordem física, química e biológica, que permite, abriga e rege a vida em todas as suas formas;

II - degradação da qualidade ambiental, a alteração adversa das características do meio ambiente;

III - poluição, a degradação da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente:

a) prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população;

b) criem condições adversas às atividades sociais e econômicas;

c) afetem desfavoravelmente a biota;

d) afetem as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente;

e) lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos;

IV - poluidor, a pessoa física ou jurídica, de direito público ou privado, responsável, direta ou indiretamente, por atividade causadora de degradação ambiental;

V - recursos ambientais, a atmosfera, as águas interiores, superficiais e subterrâneas, os estuários, o mar territorial, o solo, o subsolo e os elementos da biosfera.

DOS OBJETIVOS DA POLÍTICA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE

Art 4º - A Política Nacional do Meio Ambiente visará:

I - à compatibilização do desenvolvimento econômico-social com a preservação da qualidade do meio ambiente e do equilíbrio ecológico;

II - à definição de áreas prioritárias de ação governamental relativa à qualidade e ao equilíbrio ecológico, atendendo aos interesses da União, dos Estados, do Distrito Federal, dos Territórios e dos Municípios;

III - ao estabelecimento de critérios e padrões de qualidade ambiental e de normas relativas ao uso e manejo de recursos ambientais;

IV - ao desenvolvimento de pesquisas e de tecnologias nacionais orientadas para o uso racional de recursos ambientais;

V - à difusão de tecnologias de manejo do meio ambiente, à divulgação de dados e informações ambientais e à formação de uma consciência pública sobre a necessidade de preservação da qualidade ambiental e do equilíbrio ecológico;

VI - à preservação e restauração dos recursos ambientais com vistas à sua utilização racional e disponibilidade permanente, concorrendo para a manutenção do equilíbrio ecológico propício à vida;

VII - à imposição, ao poluidor e ao predador, da obrigação de recuperar e/ou indenizar os danos causados e, ao usuário, da contribuição pela utilização de recursos ambientais com fins econômicos.

Art 5º - As diretrizes da Política Nacional do Meio Ambiente serão formuladas em normas e planos, destinados a orientar a ação dos Governos da União, dos Estados, do Distrito Federal, dos Territórios e dos Municípios no que se relaciona com a preservação da qualidade ambiental e manutenção do equilíbrio ecológico, observados os princípios estabelecidos no art. 2º desta Lei.

Parágrafo único - As atividades empresariais públicas ou privadas serão exercidas em consonância com as diretrizes da Política Nacional do Meio Ambiente.

DO SISTEMA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE

Art 6º - Os órgãos e entidades da União, dos Estados, do Distrito Federal, dos Territórios e dos Municípios, bem como as fundações instituídas pelo Poder Público, responsáveis pela proteção e melhoria da qualidade ambiental, constituirão o Sistema Nacional do Meio Ambiente - SISNAMA, assim estruturado:

I - Órgão Superior: o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, com a função de assistir o Presidente da República na formulação de diretrizes da Política Nacional do Meio Ambiente;

II - Órgão Central: a Secretaria Especial do Meio Ambiente - SEMA, do Ministério do Interior, à qual cabe promover, disciplinar e avaliar a implantação da Política Nacional do Meio Ambiente;

III - Órgãos Setoriais: os órgãos ou entidades integrantes da Administração Pública Federal, direta ou indireta, bem como as fundações instituídas pelo Poder Público, cujas entidades estejam, total ou parcialmente, associadas às de preservação da qualidade ambiental ou de disciplinamento do uso de recursos ambientais;

IV - Órgãos Seccionais: os órgãos ou entidades estaduais responsáveis pela execução de programas e projetos e de controle e fiscalização das atividades suscetíveis de degradarem a qualidade ambiental;

V - Órgãos Locais: os órgãos ou entidades municipais responsáveis pelo controle e fiscalização dessas atividades, nas suas respectivas áreas de jurisdição.

§ 1º - Os Estados, na esfera de suas competências e nas áreas de sua jurisdição, elaborarão normas supletivas e complementares e padrões relacionados com o meio ambiente, observados os que forem estabelecidos pelo CONAMA.

§ 2º - Os Municípios, observadas as normas e os padrões federais e estaduais, também poderão elaborar as normas mencionadas no parágrafo anterior.

§ 3º - Os órgãos central, setoriais, seccionais e locais mencionados neste artigo deverão fornecer os resultados das análises efetuadas e sua fundamentação, quando solicitados por pessoa legitimamente interessada.

§ 4º - De acordo com a legislação em vigor, é o Poder Executivo autorizado a criar uma Fundação de apoio técnico e científico às atividades da SEMA.

DO CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE

Art 7º - É criado o Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, cuja composição, organização, competência e funcionamento serão estabelecidos, em regulamento, pelo Poder Executivo.

Parágrafo único - Integrarão, também, o CONAMA:

- a) representantes dos Governos dos Estados, indicados de acordo com o estabelecido em regulamento, podendo ser adotado um critério de delegação por regiões, com indicação alternativa do representante comum, garantida sempre a participação de um representante dos Estados em cujo território haja área crítica de poluição, assim considerada por decreto federal;
- b) Presidentes das Confederações Nacionais da Indústria, da Agricultura e do Comércio, bem como das Confederações Nacionais dos Trabalhadores na Indústria, na Agricultura e no Comércio;
- c) Presidentes da Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e da Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza;
- d) dois representantes de Associações legalmente constituídas para a defesa dos recursos naturais e de combate à poluição, a serem nomeados pelo Presidente da República.

Art 8º Incluir-se-ão entre as competências do CONAMA:

I - estabelecer, mediante proposta da SEMA, normas e critérios para o licenciamento de atividades efetiva ou potencialmente poluidoras, a ser concedido pelos Estados e supervisionado pela SEMA;

II - determinar, quando julgar necessário, a realização de estudos das alternativas e das possíveis consequências ambientais de projetos públicos ou privados, requisitando aos órgãos federais, estaduais e municipais, bem como a entidades privadas, as informações indispensáveis ao exame da matéria;

III - decidir, como última instância administrativa em grau de recurso,

mediante depósito prévio, sobre as multas e outras penalidades impostas pela SEMA;

IV - homologar acordos visando à transformação de penalidades pecuniárias na obrigação de executar medidas de interesse para a proteção ambiental; (VETADO);

V - determinar, mediante representação da SEMA, a perda ou restrição de benefícios fiscais concedidos pelo Poder Público, em caráter geral ou condicional, e a perda ou suspensão de participação em linhas de financiamento em estabelecimentos oficiais de crédito;

VI - estabelecer, privativamente, normas e padrões nacionais de controle da poluição por veículos automotores, aeronaves e embarcações, mediante audiência dos Ministérios competentes;

VII - estabelecer normas, critérios e padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente com vistas ao uso racional dos recursos ambientais, principalmente os hídricos.

DOS INSTRUMENTOS DA POLÍTICA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE

Art 9º - São instrumentos da Política Nacional do Meio Ambiente:

I - o estabelecimento de padrões de qualidade ambiental;

II - o zoneamento ambiental;

III - a avaliação de impactos ambientais;

IV - o licenciamento e a revisão de atividades efetiva ou potencialmente poluidoras;

V - os incentivos à produção e instalação de equipamentos e a criação ou absorção de tecnologia, voltados para a melhoria da qualidade ambiental;

VI - a criação de reservas e estações ecológicas, áreas de proteção ambiental e as de relevante interesse ecológico, pelo Poder Público Federal, Estadual e Municipal;

VII - o sistema nacional de informações sobre o meio ambiente;

VIII - o Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa

Ambiental;

IX - as penalidades disciplinares ou compensatórias ao não cumprimento das medidas necessárias à preservação ou correção da degradação ambiental.

Art 10 - A construção, instalação, ampliação e funcionamento de estabelecimentos e atividades utilizadoras de recursos ambientais, considerados efetiva ou potencialmente poluidores, bem como os capazes, sob qualquer forma, de causar degradação ambiental, dependerão de prévio licenciamento por órgão estadual competente, integrante do SISNAMA, sem prejuízo de outras licenças exigíveis.

§ 1º - Os pedidos de licenciamento, sua renovação e a respectiva concessão serão publicados no jornal oficial do Estado, bem como em um periódico regional ou local de grande circulação.

§ 2º - Nos casos e prazos previstos em resolução do CONAMA, o licenciamento de que trata este artigo dependerá de homologação da SEMA.

§ 3º - O órgão estadual do meio ambiente e a SEMA, esta em caráter supletivo, poderão, se necessário e sem prejuízo das penalidades pecuniárias cabíveis, determinar a redução das atividades geradoras de poluição, para manter as emissões gasosas, os efluentes líquidos e os resíduos sólidos dentro das condições e limites estipulados no licenciamento concedido.

§ 4º - Caberá exclusivamente ao Poder Executivo Federal, ouvidos os Governos Estadual e Municipal interessados, o licenciamento previsto no "caput" deste artigo, quando relativo a pólos petroquímicos e cloroquímicos, bem como a instalações nucleares e outras definidas em lei.

Art 11 - Compete à SEMA propor ao CONAMA normas e padrões para implantação, acompanhamento e fiscalização do licenciamento previsto no artigo anterior, além das que forem oriundas do próprio CONAMA.

§ 1º - A fiscalização e o controle da aplicação de critérios, normas e padrões de qualidade ambiental serão exercidos pela SEMA, em caráter supletivo da atuação do órgão estadual e municipal competentes.

§ 2º - Inclui-se na competência da fiscalização e controle a análise de

projetos de entidades, públicas ou privadas, objetivando a preservação ou a recuperação de recursos ambientais, afetados por processos de exploração predatórios ou poluidores.

Art 12 - As entidades e órgãos de financiamento e incentivos governamentais condicionarão a aprovação de projetos habilitados a esses benefícios ao licenciamento, na forma desta Lei, e ao cumprimento das normas, dos critérios e dos padrões expedidos pelo CONAMA.

Parágrafo único - As entidades e órgãos referidos no " caput " deste artigo deverão fazer constar dos projetos a realização de obras e aquisição de equipamentos destinados ao controle de degradação ambiental e à melhoria da qualidade do meio ambiente.

Art 13 - O Poder Executivo incentivará as atividades voltadas ao meio ambiente, visando:

I - ao desenvolvimento, no País, de pesquisas e processos tecnológicos destinados a reduzir a degradação da qualidade ambiental;

II - à fabricação de equipamentos antipoluidores;

III - a outras iniciativas que propiciem a racionalização do uso de recursos ambientais.

Parágrafo único - Os órgãos, entidades, e programas do Poder Público, destinados ao incentivo das pesquisas científicas e tecnológicas, considerarão, entre as suas metas prioritárias, o apoio aos projetos que visem a adquirir e desenvolver conhecimentos básicos e aplicáveis na área ambiental e ecológica.

Art 14 - Sem prejuízo das penalidades definidas pela legislação federal, estadual e municipal, o não cumprimento das medidas necessárias à preservação ou correção dos inconvenientes e danos causados pela degradação da qualidade ambiental sujeitará os transgressores:

I - à multa simples ou diária, nos valores correspondentes, no mínimo, a 10 (dez) e, no máximo, a 1.000 (mil) Obrigações Reajustáveis do Tesouro Nacional - ORTNs, agravada em casos de reincidência específica, conforme dispuser o regulamento, vedada a sua cobrança pela União se já tiver sido aplicada pelo Estado, Distrito Federal, Territórios ou pelos Municípios.

II - à perda ou restrição de incentivos e benefícios fiscais concedidos pelo

Poder Público;

III - à perda ou suspensão de participação em linhas de financiamento em estabelecimentos oficiais de crédito;

IV - à suspensão de sua atividade.

§ 1º - Sem obstar a aplicação das penalidades previstas neste artigo, é o poluidor obrigado, independentemente da existência de culpa, a indenizar ou reparar os danos causados ao meio ambiente e a terceiros, afetados por sua atividade. O Ministério Público da União e dos Estados terá legitimidade para propor ação de responsabilidade civil e criminal, por danos causados ao meio ambiente.

§ 2º - No caso de omissão da autoridade estadual ou municipal, caberá ao Secretário do Meio Ambiente a aplicação das penalidades pecuniárias previstas neste artigo.

§ 3º - Nos casos previstos nos incisos II e III deste artigo, o ato declaratório da perda, restrição ou suspensão será atribuição da autoridade administrativa ou financeira que concedeu os benefícios, incentivos ou financiamento, cumprindo resolução do CONAMA.

§ 4º - Nos casos de poluição provocada pelo derramamento ou lançamento de detritos ou óleo em águas brasileiras, por embarcações e terminais marítimos ou fluviais, prevalecer o disposto na Lei nº 5.357, de 17 de novembro de 1967.

Art 15 - É da competência exclusiva do Presidente da República, a suspensão prevista no inciso IV do artigo anterior por prazo superior a 30 (trinta) dias.

§ 1º - O Ministro de Estado do Interior, mediante proposta do Secretário do Meio Ambiente e/ou por provocação dos governos locais, poderá suspender as atividades referidas neste artigo por prazo não excedente a 30 (trinta) dias.

§ 2º - Da decisão proferida com base no parágrafo anterior caberá recurso, com efeito suspensivo, no prazo de 5 (cinco) dias, para o Presidente da República.

Art 16 - Os Governadores dos Estados, do Distrito Federal e dos Territórios poderão adotar medidas de emergência, visando a reduzir, nos

limites necessários, ou paralisar, pelo prazo máximo de 15 (quinze) dias, as atividades poluidoras.

Parágrafo único - Da decisão proferida com base neste artigo, caberá recurso, sem efeito suspensivo, no prazo de 5 (cinco) dias, ao Ministro do Interior.

Art 17 - É instituído, sob a administração da SEMA, o Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental, para registro obrigatório de pessoas físicas ou jurídicas que se dediquem à consultoria técnica sobre problemas ecológicos ou ambientais e à indústria ou comércio de equipamentos, aparelhos e instrumentos destinados ao controle de atividades efetiva ou potencialmente poluidoras.

Art 18 - São transformadas em reservas ou estações ecológicas, sob a responsabilidade da SEMA, as florestas e as demais formas de vegetação natural de preservação permanente, relacionadas no art. 2º da Lei nº 4.771, de 15 de setembro de 1965 - Código Florestal, e os pousos das aves de arribação protegidas por convênios, acordos ou tratados assinados pelo Brasil com outras nações.

Parágrafo único - As pessoas físicas ou jurídicas que, de qualquer modo, degradarem reservas ou estações ecológicas, bem como outras áreas declaradas como de relevante interesse ecológico, estão sujeitas às penalidades previstas no art. 14 desta Lei.

Art 19 -(VETADO).

Art 20 - Esta Lei entrará em vigor na data de sua publicação.

Art 21 - Revogam-se as disposições em contrário.

Brasília, em 31 de agosto de 1981; 160º da Independência e 93º da República.

JOÃO FIGUEIREDO

Mário David Andreazza

ANEXO E - BANNER SEMANA DO MEIO AMBIENTE

Biodegradação de compostos aromáticos

O que é Biodegradação?

A biodegradação diz respeito ao processo de decomposição de materiais (sobretudo de origem orgânica) por ação de seres vivos. Este processo é extremamente importante, já que permite a existência do ciclo de materiais e de energia: os seres vivos absorvem determinadas moléculas simples do meio (sobretudo os produtores), como o CO_2 , envolvendo essas moléculas em reações de complexificação, conduzindo à produção de compostos orgânicos elaborados.

Aromáticos são nocivos a saúde humana

Em geral, os aromáticos causam os seguintes efeitos em humanos:

- RESPIRATÓRIO:** irritação, tosse crônica, bronquite e câncer broncogênico pode ocorrer com exposição crônica.
- GASTROINTESTINAL:** leucopenia e câncer dos lábios e da cavidade oral podem-se desenvolver com exposição crônica.
- HEPÁTICO:** hepatotoxicidade suavia tem sido demonstrada em animais de laboratório. Alguns indicam que hepato e nefrotoxicidade pode ocorrer a doses elevadas.
- GENITOURINÁRIO:** Hematúria, câncer de bexiga e rim devido à exposição crônica. Nefrotoxicidade suavia em ratos.
- HEMATOLÓGICO:** Agnucitose, anemia, leucopenia e pancitopenia desenvolvidas em ratos com exposição aguda.
- DERMATOLÓGICA:** Verrugas e lesões pré-cancerígenas, eritema, queimaduras, fotossensibilização e câncer podem-se desenvolver com exposição crônica.

As etapas do processo:

1. Microorganismos são selecionados e inseridos no efluente
2. Microorganismos específicos começam a agir
3. Pela ação das enzimas produzidas pelos microorganismos, as moléculas se dividem em substâncias específicas: i.e. gorduras, proteínas, carboidratos, etc...
4. As várias substâncias são degradadas em compostos simples e começam a ser absorvidas pelos microorganismos
5. As moléculas de hidrogênio e carbono são separadas
6. Completa-se o ciclo metabólico dos microorganismos, com a digestão total da matéria orgânica, restando água, gás carbônico e minerais.

O que é feito no CEPENIA - POLI - USP?

Seleção de bactérias do solo contaminado com BTEX

Identificação de proteínas envolvidas na biodegradação do fenol

ANEXO F - APOSTILA SEMANA DO MEIO AMBIENTE

Biodegradação de compostos aromáticos

Entendendo o que são os aromáticos:

Compostos aromáticos, também conhecidos como Hidrocarbonetos Aromáticos, possuem a cadeia carbônica fechada. O benzeno (C_6H_6) corresponde à estrutura mais simples dessa classe de compostos:

Fig.1- Benzeno

A estrutura acima corresponde a um anel benzênico. Um composto só é classificado como aromático se em sua estrutura molecular conter um anel benzênico.

Fig.2- Repare na presença de vários anéis benzênicos unidos entre si, este composto recebe o nome de Benzopireno e se faz presente nas carnes grelhadas.

O termo "aromático" foi aplicado pela primeira vez em 1860 a um grupo de substâncias isoladas a partir do carvão, caracterizadas pelo odor mais forte que o de outras substâncias químicas semelhantes.

Compostos aromáticos são hidrocarbonetos que apresentam um ou mais anéis planos de átomos, unidos por dois tipos de ligações covalentes. Esses compostos apresentam uma baixa reatividade química, derivada de sua estrutura eletrônica peculiar.

A grande maioria dos compostos aromáticos é derivada do benzeno (fig.1), composto orgânico que contém um anel de seis átomos de carbono, denominado anel benzênico. Além desses existem outros nos quais um ou mais dos átomos de carbono são substituídos por átomos de outros elementos, especialmente nitrogênio, enxofre e oxigênio. Cada átomo do anel partilha um par de elétrons com cada um de seus dois vizinhos.

Os compostos aromáticos são usados como matéria-prima para a obtenção de muitos produtos químicos, que encontram aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de tintas e corantes, entre outras.

O BTEX

Acrônimo formado a partir dos nomes das seguintes substâncias químicas: Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xilenos. Este é um grupo muito importante de compostos voláteis encontrados no petróleo e seus derivados, como a gasolina. Estes compostos, quando liberados no meio ambiente, são contaminantes perigosos, principalmente das águas superficiais e subterrâneas. Como são, em geral, encontrados juntos, utiliza-se expressão BTEX como uma referência genérica a eles.

Benzeno

Tolueno

Etil benzeno

m-Xileno

o-Xileno

p-Xileno

Fig.3- BTEX

No caso das águas subterrâneas, tem sido encontrado lençóis freáticos contaminados pelo vazamento da gasolina estocada em postos de serviço. Isto ocorre devido à corrosão dos tanques, colocados abaixo do nível do solo.

Enquanto pura, a gasolina é pouco miscível na água, ficando a poluição restrita às camadas mais superiores do aquífero. No entanto esta miscibilidade aumenta com a presença do etanol (álcool etílico) na gasolina e, apesar do etanol em si, não ser um poluente tão perigoso, sua presença na gasolina ou o contato dele com uma pluma com BTEX, potencializará a dispersão destes compostos voláteis na água subterrânea. Por outro lado, estudos têm indicado que apesar de inicialmente aumentar o teor em BTEX na pluma contaminante, o etanol, uma vez biodegradado, cria condições para a rápida degradação destes compostos.

Os compostos BTEX, em certas condições, são suscetíveis de se degradarem naturalmente. Nos Estados Unidos muitos pontos com poluição por BTEX vêm sendo remediados com sucesso através da técnica conhecida como atenuação natural monitorada.

O BTEX penetra no organismo principalmente por via respiratória, onde atua como irritante. Sua ação predominante é depressão do sistema nervoso central. Manifestações sistêmicas decorrentes da exposição cutânea a vapores de tolueno são pouco prováveis. O contato prolongado com a pele provoca ressecamento, fissuras e dermatites. A exposição crônica pode causar distúrbios psíquicos e doenças neurológicas. Na literatura também existem relatos de casos de anemias, que reverteram depois de cessada a exposição.

O fenol

Os fenóis ou benzenóis são compostos orgânicos que apresentam o grupo hidroxila (O - H) ligado de forma direta a um carbono do núcleo benzênico.

Fig.4-Fenol

O grupo OH também é denominado hidróxi, e devido à capacidade de reagirem com bases, recebem a denominação de ácidos fênicos.

O fenol é extraído da natureza. Os compostos fenólicos são pouco solúveis em água, sólidos, incolores, apresentam caráter ácido e são tóxicos. Os fenóis são muito usados na indústria, na fabricação de perfumes, resinas, vernizes, tintas, adesivos, cosméticos, corantes e explosivos. Eles possuem ação bactericida devido ao mecanismo de coagularem proteínas de microorganismos como as bactérias e fungos. Nas fazendas, usa-se uma mistura dos fenóis orto, meta e paracresol para a desinfecção do local de ordenha das vacas, para não haver contaminação do leite. Essa mistura de fenóis é conhecida popularmente como Creolina. Mas o uso do fenol para assepsia foi proibido após a descoberta que este composto causa queimaduras quando em contato com a pele, por ser corrosivo, e ainda é venenoso quando ingerido por via oral.

O fenol é facilmente absorvido através das mucosas e da pele. Como é corrosivo, pode causar severa ulceração e queimaduras de até terceiro grau. Após exposições repetidas, a pele pode apresentar uma despigmentação localizada. Os efeitos sistêmicos podem ocorrer como consequência de qualquer via de exposição e, em casos graves de intoxicação aguda e crônica, incluem transtornos digestivos, disfunção do sistema nervoso, palidez, sudorese, cefaléia, vertigens e fraqueza. Lesão renal tem sido igualmente descrita.

Biodegradação x Biorremediação

A biodegradação refere-se à transformação de moléculas xenobióticas por microrganismos, e a biorremediação refere-se ao uso de microrganismos para destoxificar áreas contaminadas. A degradabilidade é vista como um atributo desejável, pois a persistência prolongada leva à contaminação de outros ambientes e também de águas subterrâneas. Três técnicas básicas de biorremediação são geralmente usadas:

estimulação da atividade de microrganismos selvagens, pela adição de nutrientes, regulação das condições redox, entre outros;

inoculação de sítios contaminados com microrganismos específicos em transformar determinados poluentes;

aplicação de enzimas imobilizadas. As pesquisas sobre biodegradação priorizam os pesticidas mais tóxicos à vida selvagem em agroecossistemas suscetíveis à contaminação.

Os principais aspectos abordados nesta linha de pesquisa são:

- a) biodegradação de herbicidas e fungicidas;
- b) enzimas microbianas envolvidas no processo de biodegradação;
- c) tecnologia da rizosfera - uso de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas em biorremediação.

O que é feito no CEPEMA·POLI - USP?

Isolamento de microrganismos de áreas contaminadas por BTEX

O projeto sugere isolar e identificar microrganismos (principalmente bactérias) de uma área contaminada com benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX). Estes compostos são provenientes de indústrias petroquímicas e são tóxicos e comprovadamente cancerígenos a humanos, mesmo em concentrações muito baixas. Estes microrganismos já vivem em condições hostis e por isso são adaptados a estes compostos, utilizando-os muitas vezes como fonte de alimento. A idéia é que estes organismos contribuam posteriormente, para a biorremediação (tratamento) das áreas impactadas.

Por que isolar microrganismos de áreas contaminadas?

Através do isolamento de microrganismos naturalmente presentes em solo contaminado, o potencial de uso destes microrganismos para biorremediação aumenta muito. A biorremediação, é uma metodologia atrativa e confiável para o tratamento de solos e cursos d'água contaminados, considerando-se muito eficiente, além de econômica, versátil e principalmente por causar uma menor perturbação ao ambiente, já que é um sistema de estimulação de processos naturais de remediação. Enfim, é uma estratégia ou processo que emprega microrganismos ou suas enzimas para descontaminar o solo ou outros ambientes.

Isolar microrganismos de uma área previamente contaminada aumenta significativamente a chance de sucesso deste tipo de tratamento.

Metodologia

Fig.5- Atividades realizadas em laboratório da mestrandia Ingrid Regina Avanzi.

Análise da produção de proteínas de uma espécie de bactéria isolada de Cubatão-SP

Os compostos aromáticos pertencem a um grupo tóxico de poluentes ambientais descartados do processo de muitas indústrias tais como refinarias de óleo e indústrias químicas. Entre estes poluentes, destaca-se o fenol, por sua ampla utilização. Embora o fenol possua ação bactericida, alguns microrganismos adquirem a habilidade de se adaptar e utilizar este composto como fonte de carbono e energia. Para que estes microrganismos consigam utilizar substratos tóxicos como fonte de carbono, há um controle coordenado de vias metabólicas (catabólicas). A expressão destas vias pode ser regulada por mecanismos de controle globais ou (b) por uma via específica de resposta controlada, mas estes mecanismos

ainda não são bem compreendidos. O presente trabalho pretende analisar o padrão de proteínas citosólicas de uma cepa de *Pseudomonas* sp., a qual carrega os principais genes envolvidos no processo de hidroxilação do fenol e comparar o perfil de proteínas expressas em função de cada fonte de carbono (glicose ou fenol). Para isso, utilizaremos técnicas de eletroforese 2D e análise em espectrometria de massas (MALDI-TOF). Como a sequência genômica do gênero *Pseudomonas* é bem conhecida, é possível utilizar a técnica da proteômica em busca das proteínas envolvidas no processo de biodegradação do fenol e nos mecanismos regulatórios afetados pelas fontes de carbono.

Metodologia:

Fig.6- Atividades realizadas em laboratório da mestrandia Louise Hase Gracioso.

Glossário

Espectrometria de massas: é um método para identificar os diferentes átomos que compõe uma substância.

Proteômica: é uma ciência da área de biotecnologia que estuda o conjunto de proteínas e suas isoformas contidas em uma amostra biológica. É um método direto para identificar, quantificar e estudar as modificações das proteínas em uma célula.

Proteínas citosólicas: Proteínas citosólicas são aquelas que "residem" no citosol (líquido que preenche o citoplasma), isto é, atuam nas reações citosólicas, ao contrário de outras proteínas, que após serem sintetizadas migram para compartimentos celulares, tais como a mitocôndria, o núcleo ou os peroxissomos e os plastos.

Cepa: Colônias, um conjunto de uma mesma espécie de bactérias em um ambiente próprio.

Saiba mais sobre isso!

Veja alguns sites sugeridos:

<http://www.cnpma.embrapa.br>

<http://www.cepema.usp.br>

Referências Bibliográficas

FAHY, A, BALL, A. S.; LETHBRIDGE, G.; TIMMIS, K. N.; MCGENITY, T. J. Isolation of alkali-tolerant benzene-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Letters in Applied Microbiology*. 1 (47): 60-66, 2008.

FISCHER, G. R. Como encontrar provas e evidências de crimes ambientais. Joinville: Editora Opção, 2006.

SAMBROOK R.; Fritsch E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour: Editora Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001.

ANEXO G - RESULTADOS MALDI-TOF

Bruker Daltonics MALDI Biotyper Classification Results

Project Info

Project Name: Anita 4
 Project Description:
 Project Owner: Administrator@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2011-08-30 14:41:08.296
 Project Analyte Count: 12
 Project Type: RUO (Research Use Only)

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
(+)		Enterobacter cloacae	<u>1.858</u>	Enterobacter asburiae	<u>1.747</u>
(+)		Enterobacter cloacae	<u>1.952</u>	Enterobacter cloacae	<u>1.793</u>
(-)	C3	no peaks found	<u>< 0</u>	no peaks found	<u>< 0</u>
(-)	C4	no peaks found	<u>< 0</u>	no peaks found	<u>< 0</u>
(+)		Serratia marcescens	<u>1.758</u>	Klebsiella oxytoca	<u>1.733</u>
(+)		Serratia marcescens	<u>1.757</u>	not reliable identification	<u>1.676</u>
(++)		Serratia marcescens	<u>2.006</u>	Serratia marcescens	<u>1.867</u>
(++)		Serratia marcescens	<u>2.134</u>	Serratia marcescens	<u>2.119</u>
(++)	C1	Serratia marcescens	<u>2.274</u>	Serratia marcescens	<u>2.156</u>
(++)		Serratia marcescens	<u>2.199</u>	Serratia marcescens	<u>2.167</u>
(++)		Klebsiella oxytoca	<u>2.122</u>	Klebsiella oxytoca	<u>2.013</u>
(++)	C2	Klebsiella oxytoca	<u>2.153</u>	Klebsiella oxytoca	<u>2.132</u>

ANEXO H - NOTÍCIA NO SITE DA USP

MEIO AMBIENTE - 29.09.11

■ Pesquisadores do Cepema estudam a ação de bactérias na despoluição de efluentes

Lucas Rodrigues / USP Online
lucas.mariano.rodrigues@usp.br

Nos últimos anos, a preocupação ambiental tem levado os pesquisadores de diversas áreas a buscarem novos métodos para combater os efeitos da poluição. Nesse sentido, plantas e até fungos já foram utilizados em alguns ambientes para promover a descontaminação. Entretanto, em estudo conduzido no Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente (Cepema) da USP, são os micro-organismos das próprias regiões contaminadas que entram em ação para eliminar resíduos poluentes.

De acordo com Elen Aquino, pesquisadora que coordena o projeto, a ideia da pesquisa é identificar quais bactérias são mais eficientes para consumir os compostos aromáticos, que têm base orgânica, descartados junto com resíduos industriais. O processo, conhecido como biorremediação, acontece com a transformação dos compostos poluentes em substâncias inócuas, que são absorvidas pelos micro-organismos.

Elen explica que o primeiro passo do estudo foi fazer o isolamento de micro-organismos de áreas contaminadas. Depois disso, as bactérias foram enriquecidas em meio seletivo, para que se fosse verificado como se daria o seu desenvolvimento. Com essa etapa cumprida, os organismos são selecionados, inseridos no ambiente poluído, e já começam a agir.

Através da ação de enzimas produzidas pelas bactérias, as moléculas dos compostos se dividem em substâncias como ácidos graxos, proteínas e carboidratos, que são consumidas pelos próprios micro-organismos. No final desse ciclo metabólico, resta apenas água, gás carbônico e minerais.

Novos desafios

Segundo Elen, o trabalho do estudo não termina por aí. Ela conta que é preciso, também, descobrir "em qual velocidade e em qual concentração" esse processo é mais eficiente. Nos testes, a substância utilizada é o fenol, um poluente modelo, utilizado para a realização de experimentos científicos. O fenol é um poluente comum resultante de vários processos industriais, prejudicial ao meio ambiente e à saúde, e pode ser fatal se ingerido, inalado ou absorvido pela pele.

A pesquisadora afirma, ainda, que o estudo já está alcançando outro nível. O objetivo agora é "passar do laboratório para uma escala maior". Por esse motivo, os micro-organismos com maior potencial de

eliminação dos compostos estão sendo testados em um biorreator, que contém efluentes fenólicos reais.

Para Elen, esse fato garante que os resultados da pesquisa sejam otimizados, já que nesse aparelho é possível controlar variantes como o pH da água, por exemplo. "No biorreator os resultados são mais próximos de um processo real", diz. Entre as bactérias que se destacaram nos testes de laboratório estão as do gênero *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp. e *Serratia* sp.

Elen desenvolve esse projeto desde 2010, com a ajuda das mestrandas Ingrid Avanzi e Louise Gracioso, a técnica química Marcela Galluzzi, e o aluno Alan Santana, da iniciação científica. Sobre as contribuições desse trabalho, a pesquisadora espera que ele seja útil no processo de descontaminação de efluentes. Para ela, trazer benefícios para a população é, aliás, a principal vantagem de se realizar pesquisas aplicadas. "É muito justo que nós retornemos isso para a sociedade", afirma.

ANEXO I - NOTÍCIA NO JORNAL A TRIBUNA

[illegible]

ANEXO J - AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL MICROBIOLÓGICO

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SisBio

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 30524-1	Data da Emissão: 11/08/2011 18:03
Dados do titular	
Nome: Elen Aquino Perpetuo	CPF: 022.542.769-99

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .

Taxons registrados

Nível taxonômico	Taxon(s)
REINO	Bacteria

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 44836658

Página 1/1