

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Edital -2013

Desenvolvimento da Sustentabilidade na Universidade São Paulo

**COLETA, IDENTIFICAÇÃO, PRESERVAÇÃO DA MICROBIOTA DA ÁREA II DO CAMPUS DA USP
SÃO CARLOS E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS**

Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto
(Coordenador, Instituto de Química de São Carlos)

Profa. Dra. Marcia Nitschke
(Instituto de Química de São Carlos)

Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche Silva
(Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos)

Maria Cecília Henrique Tavares Cavalheiro
(Laboratório de Resíduos Químicos da Prefeitura do Campus USP de São Carlos)

São Carlos, 20 de junho de 2013

ÍNDICE

RESUMO	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 <i>Área II do Campus da USP São Carlos e a Bacia Hidrográfica do Córrego do Mineirinho</i>	5
1.2 <i>Formações vegetais na Área II do Campus da USP São Carlos</i>	6
1.3 <i>A importância da preservação da microbiota para o meio ambiente</i>	7
1.4 <i>Uso de micro-organismos em tratamento de resíduos</i>	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	13
3.1 <i>Metas a serem alcançadas</i>	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 <i>Coleta de micro-organismos</i>	14
4.2 <i>Isolamento dos micro-organismos</i>	14
4.3 <i>Identificação e preservação dos micro-organismos</i>	14
4.4 <i>Hidrólise de acetato de etila e acetonitrila por fungos e bactérias coletados</i>	15
<i>Área II do Campus da USP São Carlos</i>	
4.5 <i>Quantificação de ácido acético produzido</i>	15
4.6 <i>Reação em escala piloto</i>	15
4.7 <i>Análises de biologia molecular</i>	16
5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	17
6. EQUIPE	18
7. INSERÇÃO DO PROJETO NA CHAMADA DO EDITAL – DESENVOLVIMENTO DA SUSTENTABILIDADE NA USP	18
8. REFERÊNCIAS	20
9. ITENS FINANCIÁVEIS E SOLICITADOS	20

RESUMO

O objetivo do projeto é utilizar de forma sustentável a biodiversidade microbiana presente na reserva ambiental da *Área II do campus de São Carlos* visando o tratamento de solventes orgânicos, produzidos como resíduos por laboratórios de pesquisa atuantes na *Área II do Campus da USP de São Carlos*. As hidrólises de acetato de etila e acetonitrila, solventes altamente tóxicos à saúde humana e ao meio ambiente, serão catalisadas por enzimas hidrolíticas produzidas pelos sistemas metabólicos de micro-organismos (fungos e bactérias) isolados no solo, água e de plantas da área do campus. A pesquisa abrange a coleta, identificação, preservação de linhagens microbianas, permitindo um conhecimento científico da

microbiota endêmica, e sua aplicação em tratamentos de resíduos. Este projeto visa também incentivar o desenvolvimento de pesquisas voltadas à solução de questões de Gestão Ambiental identificada (tratamento de resíduos e conhecimento científico da microbiota da *Área II do Campus da USP de São Carlos*) e para as quais ainda não existem soluções adequadas (descarte de resíduos via incineração), visando a geração do conhecimento necessário à efetiva adequação dos *campi* (desenvolvimento de pesquisa voltada para o tratamento microbiológico de solventes orgânicos). Desta forma pretende-se aplicar os conhecimentos e as experiências das equipes dirigidas à sustentabilidade na USP.

1. INTRODUÇÃO

No final dos anos 90, o *campus da USP em São Carlos* começou a sentir os primeiros reflexos da falta de espaço físico. Localizado na região central da cidade, o *Campus (Área I)*, com 32 hectares, a área, a cada ano, foi ficando limitada a grandes construções. Em janeiro de 2002 a reitoria da USP criou duas comissões para atuarem junto à nova área do Campus de Campus de São Carlos (denominada de *Área II*) que seria criado: uma com o objetivo de cuidar do projeto acadêmico e a outra com a função de elaborar o Plano Diretor e desenvolver a estrutura administrativa da *Área II do Campus de São Carlos* [1].

Com uma significativa área de preservação ambiental, em torno de 30% do terreno, os investimentos também se voltaram para a recuperação da reserva legal. Em 2004, foi incorporada uma nova área, que passou para 102,4 hectares a área total da *Área II do Campus de São Carlos* [1].

Para nosso conhecimento existe apenas um trabalho científico que descreve as características ambientais da *Área II do Campus 2 de São Carlos*, como a vegetação e as espécies de plantas. Contudo, não há informações sobre a fauna, insetos, aves e micro-organismos que compõem esta área de preservação ambiental. A área da reserva é constituída por 4 fragmentos principais de vegetação, ou seja, não é uma área contínua, sendo que nesses fragmentos existem nascentes próprias, com recursos hídricos que destacam a importância de novos estudos.

Infelizmente, parte destes fragmentos de preservação ambiental, encontra-se extremamente poluídos e contaminados pela rede de esgoto do bairro residencial Santa Angelina, que faz vizinhança com a *Área II do Campus 2 de São Carlos*.

A cidade de São Carlos-SP sofreu grave processo de assoreamento, inclusive na Bacia do Mineirinho, onde estará situado a *Área II do Campus 2 de São Carlos*. Benine *et al.* [2] avaliaram o impacto da ocupação do solo e as consequências da erosão nos cursos d'água impactando áreas rurais e urbanas, aumentando a magnitude das inundações. Neste trabalho foram avaliados os riscos de enchentes à jusante desta micro-bacia, devido ao crescimento urbano e às taxas de impermeabilização pela implantação da *Área II do Campus 2 de São Carlos*. Além disso, foram realizados estudos sobre a demarcação do uso e a ocupação do solo, a caracterização vegetal e o início do monitoramento experimental das sub-bacias, compostas por vegetação natural representada por *florestas ribeirinhas, campo úmido e matas de brejo* [2].

1.1 *Área II do Campus da USP São Carlos e a Bacia Hidrográfica do Córrego do Mineirinho*

A área do *campus 2* abrange em seu terreno 1800m do Córrego do Mineirinho (pertencente à bacia do Rio Monjolinho), sendo seu percurso total de aproximadamente 4 Km, quando se encontra com o Rio Monjolinho. Sua principal nascente localiza-se fora da propriedade da *Área II do Campus 2 de São Carlos*, em bairro residencial próximo, Santa Angelina. Existem também, mais três nascentes que formam outros afluentes: uma localizada também nas imediações da *Área II do Campus 2 de São Carlos*, no Bairro Santa Angelina, e as outras duas localizadas no interior da área do *campus*, sendo uma delas intermitente [2].

A Bacia do Mineirinho apresenta urbanização em dois afluentes de cabeceira (nascentes), que drenam as suas águas para a *Área II do Campus 2 de São Carlos*. No seu entorno, encontram-se pastagens, monocultura de cana-de-açúcar, regiões sem cobertura vegetal e uma ferrovia circundando seu divisor de água. Acompanhando os cursos dos rios que formam esta bacia encontram-se regiões que ainda possuem mata ciliar, trechos com floresta paludosa e áreas alagadas com vegetação de pequeno porte (gramíneas) [2].

Estima-se que aproximadamente 16,8 ha (18,4 % da área total) serão destinados à construção de vias e edificações, constituindo, portanto, áreas impermeáveis na *Área II do Campus 2 de São Carlos*. A recuperação ambiental deve avaliar conflitos potenciais de assoreamento *versus* perenização, efemeridade dos corpos d'água *versus* enchentes à jusante, propondo uma visão sustentável, em longo prazo, na drenagem natural das sub-bacias da *Área II do Campus 2 de São Carlos* [2].

Atualmente, a *Área II do Campus 2 de São Carlos* está passando por um processo intenso de construção de prédios, cuja ocupação daqui a alguns anos será bastante densa.

Assim, é fundamental o levantamento de dados das bacias urbanas de São Carlos. No contexto da criação da *Área II do Campus 2 de São Carlos* na Bacia do Córrego do Mineirinho, tornou-se crucial a realização de pesquisas dos possíveis cenários ambientais constituindo uma excelente ferramenta para tomada de futuras decisões e escolha adequada de estratégias de recuperação ambiental visando mitigar os riscos de enchente à jusante devido ao crescimento urbano e às taxas de impermeabilização pela implantação do *campus* à montante [2].

Assim, este projeto que está sendo submetido para o *Desenvolvimento da Sustentabilidade na USP* vem contribuir para o conhecimento e preservação da microbiota que compõe a área de preservação ambiental nesta região urbana da cidade de São Carlos.

Formações vegetais na Área II do Campus da USP São Carlos

A seguir são apresentadas as descrições gerais das principais características das formações florestais que ocorrem na bacia do córrego Mineirinho [2].

a) Floresta paludosa (mata de brejo)

Na microbacia do córrego do Mineirinho, a *floresta paludosa* possui um dossel variando de 8 a 14 m de altura onde se encontram espécies como *Talauma ovata*, *Euterpe edulis*, *Protium cf. heptaphyllum*, *Tapirira guianensis*, *Styrax pohlii*, *Cecropia pachystachya*. O subdossel apresenta-se com uma altura de 6 a 8 m, apresentando espécies como, *Geonoma brevisphata*, *Hedychium coronarium*, *Dendropanax cuneatum*, *Guarea macrophylla*, *Clusia criuva* e *Piper arboreum*. Foram observadas ainda nesse estrato várias espécies de trepadeiras, poucas epífitas e samambaia açú (*Cyathea* sp.) [2].

De uma forma geral, as florestas paludosas apresentam diversidade menor quando comparadas com outras formações no mesmo estágio de preservação, mas representam um tipo de vegetação de grande relevância, dada a sua adaptação em ambiente com solo encharcado e sua função de proteção a estes ambientes [3].

As *florestas paludosas* desta microbacia possuem um sistema de drenagem do solo bem característico que quando alterado podem condenar a vegetação natural e sofrer mudanças drásticas na sua fisionomia, como passar de uma fisionomia florestal para uma fisionomia de campo úmido. Isso já pode ser observado em grandes trechos, onde a vegetação original foi substituída por lírio-do-brejo (*Hedychium coronarium*) e demais plantas higrófitas [2].

b) Floresta de galeria

Nesse tipo de formação florestal há um estrato superior geralmente com cerca de 10 a 15m de altura, constituído por espécies como *Enterolobium contortisiliquum*, *Tapirira*

guianensis, *Cecropia pachystachya*, *Endlicheria paniculata*, *Alchornea triplinervia*, *Copaifera langsdorfii*, *Nectandra megapotamica*, *Piper arboreum*, *Trichilia pallida*, *Matayba elaeagnoides*, *Ficus cf. guaranítica*, *Acacia polyphylla*, *Trema micrantha*, *Calophyllum brasiliense*, *Syagrus romanzofiana*, *Cedrela fissilis*, *Terminalia brasiliensis*, *Alibertia concolor*, *Cabralea canjerana*, e *Tibouchina* sp. entre outras [2].

c) Cerradão (área de savana florestada)

As espécies arbóreas de maior porte possuem cerca de 7 a 20 m de altura, de copa relativamente larga, tais como *Anadenanthera falcata*, *Hymenaea courbaril*, *Pterodon emarginatus*, *Xylopia aromática*, *Virola sebifera*, *Copaifera langsdorfi*, *Machaerium villosum*, *Stryphnodendron adstringens*, entre outras [2].

Devido a relevância do estudo realizado por Benine *et al.* sobre os recursos hídricos, a vegetação e o impacto causado pela ocupação urbana local no *campus 2*, torna-se relevante a continuidade de estudos ambientais frente ao desenvolvimento da sustentabilidade do *campus 2*, neste caso buscando o conhecimento científico de espécies de micro-organismos que vivem nas áreas de preservação ambiental e que ainda não foram identificadas e catalogadas [2].

1.3 A importância da preservação da microbiota para o meio ambiente

Micro-organismo compreende uma definição taxonômica que congrega grupos variados de organismos unicelulares de dimensões microscópicas, que vivem na natureza como células isoladas ou em agregados celulares, incluindo os grupos: bactérias, arqueas, fungos filamentosos e leveduras, protozoários e vírus [4].

Apesar de sua grande importância ecológica o número de espécies de micro-organismos conhecidos (diversidade de espécies), representado pelos organismos cultivados descritos na literatura, representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (entre <0,1 a 1%, dependendo do habitat estimada em estudos baseados na análise direta da diversidade através de métodos moleculares) [4].

Estima-se, em nível global, que a diversidade de micro-organismos exceda, em algumas ordens de magnitude, a diversidade de plantas e animais. Levantamentos estimativos da década

de 90 propuseram que apenas 5% da diversidade de fungos é atualmente conhecida, com aproximadamente 69.000 espécies descritas. Para procariotos, incluindo bactérias e arqueas, são conhecidas 4.314 espécies, alocadas em 849 gêneros, correspondendo entre 0,1 a 12% da diversidade do grupo. Protozoários e vírus apresentam cerca de 30.800 e 5.000 espécies descritas, correspondendo a 31% e 4% do número de espécies estimado, respectivamente [4].

Os micro-organismos são de extrema importância nos ciclos biogeoquímicos da natureza. A microbiota do solo, por exemplo, é responsável pela execução e controle de funções essenciais, como a decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes, fluxo de energia, fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de uma série de compostos essenciais, como o fósforo, produção de compostos complexos que causam agregação do solo, decomposição de xenobióticos e, também, controle biológico de pragas e doenças [5]. A sustentabilidade dos ecossistemas está diretamente relacionada a atividade microbiana e torna-se essencial o conhecimento dos micro-organismos selvagens presentes em determinado ambiente visando não apenas preservá-los mas também utilizá-los em tecnologias para recuperação de áreas esgotadas e na biodegradação de poluentes e no tratamento de resíduos.

A pesquisa em microbiologia ambiental tem ganhando força ao longo dos últimos anos, com a emergência de grupos de trabalho relativamente novos com estudos na região amazônica (Universidade do Amazonas), Cerrado Central (Universidade de Goiás) e Mata Atlântica (Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal do Rio de Janeiro e Universidade de São Paulo) [4].

Um ponto crítico citado como limitante ao desenvolvimento da microbiologia ambiental no Brasil refere-se à falta de apoio às coleções de referência de micro-organismos no país e também a falta de profissionais que atuam nesta área.

1.4 Uso de micro-organismos em tratamento de resíduos

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da

atividade industrial. Assim, os problemas devido à ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados por meio de alterações na qualidade do solo, do ar e da água [6-7].

É inquestionável a necessidade de se investir em métodos alternativos de tratamento de resíduos, bem como, de remediação de áreas contaminadas, não apenas com o desenvolvimento da tecnologia em si, mas, fundamentalmente, mediante o despertar da consciência humana e coletiva para a necessidade do desenvolvimento e da aplicação dessas tecnologias em prol do meio ambiente [6, 8].

Embora existam diversas tecnologias que utilizam processos físicos e/ou químicos para a descontaminação de ambientes poluídos, o processo biológico de biorremediação é uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação e metais tóxicos [6, 9].

Os estudos de degradação de compostos químicos têm mostrado vários micro-organismos extremamente versáteis em catabolizar moléculas recalcitrantes. Trabalhos atuais em biotecnologia indicam fungos e bactérias como principais micro-organismos eficientes na degradação de poluentes, possuindo alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados [10].

Vários organismos podem ser utilizados na degradação, como bactérias, fungos ou plantas (biodegradação), e a eficiência de um ou outro depende, em muitos casos, da estrutura da molécula e da presença de enzimas hábeis em degradar o produto, as quais apresentam especificidade para a maioria dos substratos [11].

A estrutura química dos poluentes orgânicos influencia a metabolização destes por micro-organismos, especialmente com respeito às taxas e à extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes (não biodegradáveis) [12]. Se as enzimas que catabolizam a degradação de compostos naturais apresentam baixa especificidade pelo seu substrato, os xenobióticos com estrutura química semelhante a estes compostos naturais podem ser reconhecidos pelo sistema ativo da enzima e, assim, aproveitados pelo micro-organismo como fonte de nutrientes e energia [9].

O uso dos micro-organismos como ferramenta biotecnológica para a remediação de áreas contaminadas ou de tratamento de resíduos, reforça a importância dos micro-organismos nativos do ambiente, como fungos, bactérias e leveduras, em ciclar toda e qualquer matéria orgânica natural ou xenobiótica que presente no meio ambiente, especialmente aquelas advindas por ações antropogênicas.

2. JUSTIFICATIVA

Em dezembro de 2012 foi instalado no *Prédio de Química Ambiental da Área II do Campus 2 de São Carlos* Laboratórios de Química Orgânica e Biocatálise e de Síntese Orgânica. Ambos os laboratórios, de acordo com as pesquisas que desenvolvem, utilizam uma significativa quantidade de solventes orgânicos, especialmente acetato de etila, utilizado em extrações e

purificações e acetonitrila, utilizada em cromatografia líquida de alta eficiência. Estima-se que são utilizados cerca de 10 a 15 litros de solventes /mês.

Estes solventes após serem utilizados são descartados adequadamente por processo de incineração. Entretanto, existem alternativas mais viáveis via tratamento microbiológico, que podem transformar estes solventes tóxicos em ácido acético, que é praticamente inócuo, através de reações de hidrólises enzimáticas promovidas por fungos e bactérias.

Assim, o que motivou nossos grupos em propor este projeto sobre *Desenvolvimento da Sustentabilidade na USP*, é promover um tratamento alternativo e ambientalmente sustentável de resíduos gerados pelos laboratórios de pesquisa da *Área II do Campus 2 de São Carlos* utilizando micro-organismos coletados na área de preservação ambiental.

Este projeto envolverá grupos de pesquisa com experiência no uso de micro-organismos em processos biotecnológicos e também conta com a participação do Laboratório de Resíduos Químicos da Prefeitura do Campus de São Carlos, que tem interesse no tratamento de resíduos de forma ambiental e economicamente mais adequadas.

Assim, este projeto visa integrar as propostas do edital:

1. Promover ações de conservação dos recursos naturais da Universidade.

Este projeto visa a coleta, a preservação e o uso da microbiota existente na área de preservação ambiental da *Área II do Campus 2 de São Carlos* e sua aplicação no tratamento de resíduos gerados por alguns laboratórios da *Área II do Campus 2 de São Carlos*.

2. Promover um ambiente saudável e a segurança ambiental dentro dos campi.

A implantação deste projeto na *Área II do Campus 2 de São Carlos* promoverá um ambiente saudável e de segurança a todos os envolvidos, uma vez que além da conscientização, o tratamento de resíduos produzirá ácido acético, uma substância não tóxica.

3. Promover o uso racional de recursos.

O uso de microbiota em processo biotecnológico é uma forma de preservar as espécies de organismos vivos, ou seja, o uso racional da biodiversidade local.

4. Educar visando à sustentabilidade.

Os estudantes envolvidos terão uma conscientização na temática de sustentabilidade e serão propagadores e formadores de opinião desta proposta de trabalho.

5. Construir, de forma participativa a Universidade sustentável.

A participação de alunos, funcionários e professores neste projeto destacarão o papel e a contribuição da Universidade de São Paulo no tratamento de resíduos (nestes casos, solventes orgânicos poluentes) e a preservação da biodiversidade dentro da USP e que também é de interesse social.

6. Conduzir a Universidade para torna-se um modelo de sustentabilidade para a sociedade

O conhecimento e a aprendizagem dos envolvidos contribuirão para a construção de um modelo sustentável que poderá contribuir para a sociedade, através de tratamento de resíduos e preservação do meio ambiente.

3. OBJETIVOS

A objetivo deste projeto é promover a sustentabilidade dentro da *Área II do Campus 2 de São Carlos*, através do tratamento de solventes orgânicos utilizando a microbiota presente na biodiversidade da *Área II do Campus 2 de São Carlos*.

3.1 Metas a serem alcançadas

- a) Coleta, isolamento e identificação de micro-organismos presentes em áreas de preservação ambiental da *Área II do Campus 2 de São Carlos*;
- b) Promover reações de hidrólise de acetato de etila e acetonitrila utilizando a microbiota coletada na *Área II do Campus 2 de São Carlos*;
- c) Otimizar as condições de reações em escala piloto para constatar a viabilidade do processo microbiológico no tratamento de resíduos orgânicos gerado na *Área II do Campus 2 de São Carlos*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de micro-organismos

A coleta será realizada pelos pesquisadores envolvidos no projeto em área de reserva ambiental da *Área II do Campus 2 de São Carlos*. Os micro-organismos poderão ser coletados do solo, das raízes, das águas, caules e folhas presentes na vegetação.

4.2 Isolamento dos micro-organismos

O isolamento dos micro-organismos será realizado de acordo com protocolos estabelecidos especificamente para fungos e bactérias [13].

4.3 Identificação e preservação dos micro-organismos

Algumas linhagens de micro-organismos isolados serão selecionadas para identificação e depósito em coleção de cultura.

A princípio pretende-se identificar no Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP), uma vez que existe um centro especializado com profissionais para identificação de fungos e bactérias.

O depósito das cepas será realizado na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI-UNICAMP).

Futuramente, pretende-se criar com apoio das agências de fomento e da Universidade de São Paulo um Laboratório especializado para depósito em Coleção de Cultura de Micro-organismos no *campus 2 da USP São Carlos*. Para nosso conhecimento não existe uma Coleção e Cultura na USP como o CBMAI (UNICAMP).

4.4 Hidrólise de acetato de etila e acetonitrila por fungos e bactérias coletados Área II do Campus da USP São Carlos

Inicialmente os micro-organismos isolados ou o consórcio de micro-organismos serão cultivados em frascos Erlenmeyer de 1 L. Após o controle da curva de crescimento dos micro-organismos em condições adequadas de cultivo (pH, temperatura, agitação, meio de cultura, tempo de cultivo) todo o sistema metabólico será empregado na hidrólise de acetato de etila e acetonitrila.

Volumes adequados de solventes orgânicos (acetato de etila e acetonitrila) serão adicionados em volumes também estimados de caldo enzimático. As reações serão agitadas vigorosamente em agitador mecânico por tempos determinados. Em seguida será avaliada a quantidade de solvente hidrolisado e a quantidade de ácido acético produzido.

4.5 Quantificação de ácido acético produzido

A quantificação de ácido acético produzida pela hidrólise enzimática será determinada por cromatografia líquida, após obtenção de curva analítica padrão.

4.6 Reação em escala piloto

Após seleção das melhores linhagens fúngicas e bacterianas ou consórcios microbianos para hidrólise dos solventes orgânicos, pretende-se realizar a otimização das reações em escala piloto, atingindo uma meta para promover a hidrólise enzimática utilizando-se de 1 a 5 litros de solventes orgânicos (AcOEt e MeCN).

4.7 Análises de biologia molecular

Para avaliação da comunidade microbiana isolada da *área II do Campus de São Carlos* o DNA amostral será extraído de acordo com Griffiths et al., (2000) modificado. O gene 16S será amplificado com primers específicos para o Domínio *Bacteria* com set de primers 27F (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') e 1100R (5' – AGGGTTGCGCTCGTTG -3') nas seguintes condições: pré desnaturação de 94°C por 5 minutos; com 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos; anelamento a 55°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 1 minuto e 45 segundos;

extensão final a 72°C por 7 minutos; resfriamento a 4°C. A reação será realizada em termociclador Eppendorf AG - 22331 Hamburg.

Os fragmentos amplificados serão purificados com o kit *Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification* (GE Healthcare) e separados por Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Para a construção da biblioteca de clones, será usado o pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega) e células competentes de *E. coli* (DH5α) para transformação, seguindo as instruções do fabricante.

O DNA clonado será amplificado por PCR com os iniciadores M13F – M13R nas seguintes condições: de pré desnaturação a 94°C por 2 minutos; com 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto; anelamento a 55°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 7 minutos; resfriamento a 4°C (termociclador “Eppendorf AG - 22331 Hamburg).

O sequenciamento dos nucleotídeos será feito no sequenciador automático com capilar ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O consenso das sequências obtidas serão realizadas no programa “SeqMan” do software DNASTAR (Lasergene sequence analysis), em seguida essas sequências serão comparadas no Banco de Dados NCBI-database para aproximação da identidade filogenética.

As árvores filogenéticas serão construídas no Mega 5 usando o algoritmo neighbor-joining com análise de bootstrap de 1000 repetições.

5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Coleta e isolamento de micro-organismos no <i>campus 2 da USP São Carlos</i> .	1 a 3 meses
Otimização das condições de cultivo dos micro-organismos (meio de cultura, pH, temperatura, tempo de cultivo).	2 a 6 meses
Curva analítica para quantificação do ácido acético por cromatografia líquida. Reação de hidrólise enzimática de acetato de etila e acetonitrila em escala pequena	1 mês
Otimização das reações de hidrólises enzimáticas em escala piloto	6 meses
Preservação das espécies de micro-organismos	2 a 3 meses

6. EQUIPE

Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

(Coordenador, Instituto de Química de São Carlos)

Profa. Dra. Marcia Nitschke

(Instituto de Química de São Carlos)

Profa. Dra. Maria Bernadete A. Varesche Silva

(Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos)

Maria Cecília Henrique Tavares Cavalheiro

(Laboratório de Resíduos Químicos da Prefeitura do Campus USP de São Carlos)

João Pedro de Freitas Lima

(Técnico de Nível Superior, Instituto de Química de São Carlos)

Marília Cardoso Milanetto Peret

(Técnica de Nível Médio, Instituto de Química de São Carlos)

Isabel Kimiko Sakamoto

(Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos)

Neste projeto pretende-se trabalhar com um ou dois estagiários.

7. INSERÇÃO DO PROJETO NA CHAMADA DO EDITAL – DESENVOLVIMENTO DA SUSTENTABILIDADE NA USP

O projeto proposto enquadra-se junto ao *Programa de Incentivo à Sustentabilidade na Universidade de São Paulo* uma vez que se trata de um projeto de pesquisa, pois envolve uma investigação baseada em metodologia científica, como a coleta, identificação, preservação e aplicação de micro-organismos em tratamento de resíduos (solventes orgânicos). É também um projeto de conscientização ambiental, onde os estudantes envolvidos serão formados com uma visão sobre a importância da sustentabilidade na vida em sociedade e para o meio ambiente.

Este projeto contempla vários itens da proposta, como:

a) Conscientizar o público interno sobre a importância e as alternativas para a conservação dos recursos naturais na Universidade, tais como: a vegetação e a fauna remanescentes, os corpos d'água, o solo e o subsolo.

Em nosso projeto acrescentamos a microbiota, o qual é tão importante quanto os demais formas de vida que integram a biodiversidade em um ecossistema.

b) Recuperar áreas degradadas, promovendo: a descontaminação do solo, a despoluição das águas e a restauração dos ecossistemas naturais dos *campi*.

Em nosso projeto visamos a importância de se preservar as áreas de reservas presentes dentro do campus 2 da USP, através dos micro-organismos e alertamos a necessidade de descontaminação de uma área de reserva do campus 2 por esgoto urbano de um bairro residencial.

c) Identificar, controlar, monitorar e reduzir emissões de efluentes e poluentes sólidos, líquidos e gasosos.

Nossa proposta visa o tratamento de solventes tóxicos (acetato de etila e acetonitrila) por hidrólise enzimática para obter ácido acético, o qual é inócuo à saúde humana.

d) Controlar o uso e o descarte de material químico e biológico.

Nossa proposta visa o tratamento de resíduos orgânicos por processo biológico sustentável.

e) Estimular pesquisas visando tecnologias inovadoras para ampliar a sustentabilidade da Universidade.

Nossa proposta faz o uso da biotecnologia em tratamento de resíduos, especificamente solventes orgânicos tóxicos.

f) Resgatar os conhecimentos e as experiências dirigidas à sustentabilidade existentes na Universidade, apoiando-os e ampliando sua abrangência.

Os grupos envolvidos já fazem o uso de recursos da biodiversidade com aplicações em pesquisa, vindo desta forma a colaborar com o desenvolvimento da sustentabilidade na USP frente aos resultados obtidos.

g) Divulgar amplamente as iniciativas adotadas para promover a sustentabilidade ambiental nos *campi* da USP.

Os resultados obtidos quanto ao tratamento de resíduos pode vir se tornar uma alternativa viável de ser aplicada em todo o campus da USP. Os micro-organismos isolados, identificados e preservados serão de domínio público onde qualquer cidadão poderá utilizar para fins de pesquisa científica.

8. REFERÊNCIAS

[1] http://www.coordenadoria.sc.usp.br/ins_campus2.htm, acesso em 05/05/2013.

[2] Benini, R. de M., Mediondo, E. M., Martioli, C., Botta, F. Cenários ambientais visando a mitigação de enchentes decorrentes da implantação do campus II – USP, São Carlos, SP.

http://www.eesc.usp.br/shs/downloads/technotes/emm/Beninietal_Curitiba_Abrh_2003.pdf, acesso em 05/05/2013.

[3] Nave, A. G. Comparação florística de remanescentes florestais de duas microbacias no município de Descalvado – SP. Relatório Técnico, Piracicaba- SP, 2001.

[4] Manfio, G. P. http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/microb1.pdf, acesso em 05/05/2013.

- [5] Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. Xenobióticos no Solo. In: Moreira, F. M. S., Soqueira, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 243-284
- [6] Prereira, A. R. B., De Freitas, D. A. F. Uso de micro-organismos para biorremediação de ambientes impactados. *Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v.6, n.6, p. 975-1006, 2012.
- [7] Freire, R. S. *et al.* Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.
- [8] Corrêa, L. B. *et al.* O saber resíduos sólidos de serviços de saúde na formação acadêmica: uma contribuição da educação ambiental. *Interface: comunicação, saúde, educação*, Rio Grande do Sul, v. 9, n. 18, p. 571-84, set./dez. 2005.
- [9] Gaylard, C. C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 8, n. 34, jan./jun. 2005. Disponível em:
<<http://www.biotecnologia.com.br/edicoes/ed34.php>>. Acesso em: 05/05/2013.
- [10] Balan, D. S. L.; Monteiro, R. T. R. Decolorization of textile índigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 89, n. 2-3, p. 141-145, Aug. 2001.
- [11] Meyer, U. Biodegradation of synthetic organic colorants. In: BROWN, A. W. A. *Ecology of pesticides*. New York: John Willey, 1978.
- [12] Atlas, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, Bethesda, v. 45, n. 1, p. 180-208, Mar. 1981.
- [13] REDDY, C. A. ; BEVERIDGE, T.J.; BREZNAK, J. A.; MARZLUF, G.; SCHMIDT, T.M.; SNYDER, L.R. *Methods for General and Molecular Microbiology*, 3ª Ed., 2007. New York: ASM Press, 1006p.

9. ITENS FINANCIÁVEIS E SOLICITADOS

Os recursos poderão ser utilizados em aquisição de materiais de consumo, serviços de terceiros, despesas com transporte e pagamentos de bolsas de estágio para estudantes de graduação da USP e de outras Instituições de Ensino Superior que tenham convênio de estágio com a Unidade onde o projeto será desenvolvido.

Itens solicitados	R\$
Materiais de consumo	10.000,00

Pagamentos de bolsas de estágio para estudantes de graduação da USP e de outras Instituições de Ensino Superior	10.000,00
Um liofilizador para fazer a preservação dos micro-organismos coletados na Área II do Campus 2 da USP São Carlos Caso não seja permitido a aquisição de material permanente (liofilizador) os recursos serão distribuídos para material de consumo (R\$ 20.0000) e mais um bolsista (R\$ 10.000,00)	30.000,00
Total solicitado	50.000,00