

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - CAMPUS ARARAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

Maria Carolina Tamarozzi dos Santos

**Avaliação qualitativa da capacidade de biodegradação do tolueno por
bactérias isoladas**

ARARAS-SP

2023

Maria Carolina Tamarozzi dos Santos

**Avaliação qualitativa da capacidade de biodegradação do tolueno por
bactérias isoladas**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à disciplina Monografia 2 do
Curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas para obtenção do título de
Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Renato Nallin
Montagnolli

ARARAS-SP

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias – CCA

Folha de aprovação

Assinatura dos membros integrantes à banca examinadora para aprovação da monografia de Maria Carolina Tamarozzi dos Santos, na finalidade da obtenção do grau de licenciada em Ciências Biológicas na Universidade de São Carlos campus Centro de Ciências Agrárias Araras - SP.

Profº Dr. Renato Nallin Montagnoli

Universidade Federal de São Carlos - *campus* Araras

Profª. Drª. Márcia Maria Rosa Magri

Universidade Federal de São Carlos – *campus* Araras

Me. Elisa Pais Pellizzer

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – *campus* Rio Claro

Dedico este trabalho à minha família e amigos, os quais foram meu suporte durante toda a minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente aos meus pais, por todo o apoio desde o ingresso na graduação, por acreditarem em mim e, sobretudo, pelo amor incondicional durante todo esse processo, graças aos seus esforços fui capaz de alcançar a graduação. Agradeço imensamente aos meus tios, Alexandre e Joelma, por todo cuidado, carinho e amor durante todos esses anos, pelo apoio e o incentivo sempre. Sou grata aos meus irmãos, João Pedro e Giovanna, e às minhas primas, Giulia e Clara, por todas as conversas, risadas e amparo.

Agradeço ao meu orientador Renato, pela oportunidade de aprender muito no laboratório, por toda a colaboração e suporte.

Agradeço aos meus amigos de vida acadêmica Ana Flávia, Analía, Gabriela, Cybelle e Gabriel por estarem comigo em todos os momentos nesses últimos anos, sempre me apoiando, tornando os momentos mais difíceis em mais leves. Agradeço à minha amiga mais recente, Beatriz, por todo o apoio, suporte e incentivos para tornar possível o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas de longa data, Esther e Haydê pelo companheirismo, no qual estamos sempre dividindo umas com as outras cada momento da vida.

Ao meu companheiro Cesar e a sua família, por estarem sempre ao meu lado, por todo o apoio e incentivo.

Por fim, sou muito grata à Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade, assim como a todos os integrantes do campus de Ciências Agrárias.

RESUMO

A contaminação de águas superficiais por compostos poluentes pode causar diversos danos ambientais devido a interferência no ecossistema, afetando a biodiversidade local, a qualidade de rios e lagos, além de serem prejudiciais à saúde humana. O tolueno é um composto tóxico de importância comercial, usado geralmente como agente de diluição e como solvente, que pode estar presente em formulações de pesticidas. Em áreas destinadas à agricultura, o uso de pesticidas pode contaminar não somente o solo, mas também rios e lagos, através do escoamento superficial. Este trabalho buscou isolar linhagens bacterianas e selecionar, dentre estas, as bactérias com capacidade de biodegradar o tolueno e potencial para o uso em processos de biorremediação. As linhagens foram obtidas a partir de duas amostras de água proveniente de um lago que está sujeito a contaminação pela proximidade com uma grande área destinada ao cultivo agrícola. Foram isoladas 4 linhagens de bactérias para os ensaios e a biodegradabilidade foi verificada utilizando o método de colorimetria pela análise da coloração do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol, que possui a coloração azul quando está oxidado e é incolor quando está reduzido. Essa mudança de cor indica a atividade enzimática das bactérias e, dessa forma, a biodegradabilidade. Para analisar essa mudança de cor, foram tiradas fotografias dos ensaios e, com imagens obtidas, foi criada uma escala de descoloração, determinando indicadores qualitativos. Posteriormente, foram preparadas lâminas com cada uma das linhagens utilizando o método de coloração de Gram para a observação da morfologia no microscópio. A partir da análise das imagens obtidas, foi observado que os ensaios de sinérgicos da bactéria 3 com a bactéria 4 demonstraram potencial para biodegradação do tolueno. Dessa forma, o sinergismo desses microrganismos potencializou o efeito de biodegradação do composto. Isso indica que essas linhagens podem ser promissoras para biorremediação de locais contaminados.

Palavras-chave: biorremediação; pesticidas; colorimetria; microrganismos.

ABSTRACT

Contamination of surface water by polluting compounds can cause various environmental damages due to interference in the ecosystem, affecting local biodiversity. Toluene is an important commercial chemical commonly used as a diluting agent and solvent that can be present in pesticide formulations. In areas destined for agriculture, the use of pesticides can contaminate not only the soil, but also rivers and lakes, through surface runoff. This work sought to isolate bacterial strains and select, among these, bacteria with the ability to biodegrade toluene and potential for use in bioremediation processes. The strains were obtained from two samples of water from a lake that is subject to contamination due to its proximity to a large area intended for agricultural cultivation. For this, the colorimetry method was used by analyzing the color of the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol, which has a blue color when it is oxidized and is colorless when it is reduced. This color change indicates the enzymatic activity of the bacteria and thus biodegradability. To evaluate the images obtained from the tests, a discoloration scale was created, determining qualitative indicators. Subsequently, slides were prepared with each of the strains using the Gram staining method to observe the morphology under the microscope. From the analysis of the images obtained, it was observed that the synergistic tests of bacteria 3 with bacteria 4 showed potential for biodegradation of toluene. Thus, the synergism of these microorganisms potentiated the biodegradation effect of the compound. This indicates that these strains may be promising for bioremediation of contaminated sites.

Keywords: bioremediation; pesticides; colorimetry; microorganisms.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 12 |
| 2.1. GERAIS | 12 |
| 2.2. ESPECÍFICOS | 12 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 13 |
| 3.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS | 13 |
| 3.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS | 14 |
| 3.3. COLORIMETRIA (DCPIP) | 15 |
| 3.3.1. Preparo dos Reagentes | 16 |
| 3.3.1.1. Viabilidade do Método | 16 |
| 3.3.2. Montagem dos Ensaios Definitivos | 19 |
| 3.3.3. Acompanhamento da Biodegradação | 20 |
| 3.4. CRITÉRIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS | 21 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 21 |
| 4.1. INDICADOR QUALITATIVO | 21 |
| 4.1.1. Ensaios de Confirmação do Potencial de Biodegradação de B3 e B4 | 24 |
| 4.2. CARACTERIZAÇÃO MICRO E MACRO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS | 25 |
| 5. CONCLUSÕES | 29 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 30 |
| 7. APÊNDICE | 32 |
| 7.1. INDICADOR QUALITATIVO | 32 |

1. INTRODUÇÃO

Em campos agrícolas, pesticidas como fungicidas, inseticidas e herbicidas, são utilizados por agricultores para o controle de pragas durante a produção, colheita e armazenamento (SARAVANAN, A. et al. 2021). Muitos desses compostos são relativamente persistentes e podem deixar resíduos no solo ou na atmosfera e serem transferidos para sistemas aquáticos. Segundo Edwards (1977), sistemas aquáticos próximos a áreas destinadas para atividades agrícolas podem ser atingidos por pesticidas através da pulverização da área ou da deriva de pulverização, lavagem da atmosfera por precipitação, processos de erosão e escoamento.

Uma vez nos sistemas aquáticos, os pesticidas podem interferir na população microbiana, serem degradados ou permanecerem no local, o que afeta a produtividade dos sistemas aquáticos (EDWARDS, 1977). Um método de tratamento alternativo e promissor para a degradação de poluentes de locais contaminados é a biorremediação microbiana, que possui vantagens como o baixo custo, ser ecologicamente correta e apresentar riscos mínimos. O metabolismo microbiano, capaz de biotransformar ou biodegradar uma ampla gama de produtos químicos orgânicos, têm o potencial de torná-los menos perigosos (SARAVANAN, A. et al. 2021). A biorremediação engloba o potencial de degradação, somado a possibilidade de aplicação de microrganismos, visando a degradação bioquímica dos compostos (OTSUKA, 2015). A biodegradação é um campo muito importante para a microbiologia ambiental, pois é através desse processo que ocorre degradação de substâncias orgânicas por processos enzimáticos de microrganismos, sendo útil para a remoção de poluentes do meio ambiente (MONTAGNOLLI, 2010).

De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2021), o tolueno é um hidrocarboneto aromático cujo principal uso é na composição da gasolina como mistura formando BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos). Além disso, também pode ser usado como matéria prima na produção de solventes orgânicos. A contaminação por misturas contendo este composto tem sido alvo de muitos estudos para análise dos impactos causados no meio ambiente. De acordo

com a Resolução CONAMA Nº357, de 17 de março de 2005, na Seção II referente aos padrões de qualidade de águas doces, o valor máximo de tolueno é de 2,0 µg/L. Porém, em corpos d'água, já foram identificadas concentrações que variam de 1 a 5 µg/L de tolueno em água superficial e de 0,2 a 1,1 mg/L em água subterrânea (CETESB, 2021).

O tolueno pode ser utilizado como solvente para ajudar a dissolver outros ingredientes ativos em formulações de pesticidas. Segundo Cao et al. (2013), a grande quantidade de solvente orgânico presente na formulação de concentrado emulsificável de pesticidas, que é a mistura de ingrediente ativo, solvente e emulsificantes, pode ser prejudicial devido aos ingredientes inertes tóxicos como o tolueno e o benzeno. Apesar do tolueno ser menos tóxico que o benzeno, também apresenta risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente. A exposição humana a baixas concentrações pode causar fadiga, sonolência, náuseas e fraqueza (CETESB, 2021).

Os microrganismos presentes em ambientes contaminados podem realizar a degradação destes contaminantes. A biodegradação depende de fatores como a presença de populações microbianas com capacidade de metabolizar o composto, as condições adequadas de crescimento e níveis de nutrientes e contaminantes. Na maioria dos casos, as bactérias são os microrganismos mais escolhidos para serem utilizados como agentes de biorremediação (FAYEMIWO et al., 2017). De acordo com Fayemiwo et al. (2017, p. 5) “a biorremediação ocorre em condições variadas, dependendo das preferências dos microrganismos”.

Os microrganismos metabolizam compostos orgânicos através de processos de oxido-redução, nos quais a respiração é a principal via de obtenção de energia. Em processos aeróbicos, o acceptor final de elétrons é o oxigênio e, nos processos anaeróbios os aceptores de elétrons são outros elementos, como nitratos por exemplo. No método colorimétrico, esses aceptores de elétrons são substituídos pelo mediador sintético 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) que assume uma coloração azul na forma oxidada e é incolor na forma reduzida (DAWSON et al., 1986 apud QUITERIO, 2017, p. 18-19). O indicador DCPIP constitui um método rápido para a determinação de potenciais microrganismos para degradação de um composto em avaliações qualitativas e fazendo parte de quantitativas. Bactérias com

maior potencial de degradação tornam o meio incolor após aproximadamente 24 horas de incubação (HANSON et al., 1993).

Este estudo pretende avaliar de forma qualitativa a atividade de biodegradação do contaminante tolueno utilizando o indicador 2,6-diclorofenolindofenol em ensaios com microrganismos isolados, sendo estes bactérias de um lago localizado na Universidade Federal de São Carlos, campus da cidade de Araras. A região é próxima a Rodovia Anhanguera e possui uma grande área destinada à plantação de cana-de-açúcar, o que exige a presença de mecanização agrícola e o uso de pesticidas, portanto, pode haver contaminação.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Verificar a capacidade de microrganismos isolados de um lago potencialmente contaminado por agrotóxicos em biodegradar tolueno em meio aquoso.

2.2. ESPECÍFICOS

- Isolar linhagens bacterianas de uma amostra ambiental de um lago potencialmente contaminada por agrotóxicos;
- Selecionar, dentre os isolados, linhagens tolerantes a presença de tolueno em meio de cultura;
- Avaliar a atividade de biodegradação do tolueno por isolados bacterianos utilizando método colorimétrico;
- Analisar de forma inicial as células bacterianas através da coloração;
- Descrever os isolados pelas morfologias de colônia e microscopia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Os microrganismos foram obtidos através da coleta de amostra simples de água bruta de dois pontos específicos na superfície de um lago (primeiros 30 cm da lâmina d'água) localizado no Campus de Araras da Universidade Federal de São Carlos. Foram realizadas duas coletas em pontos distintos do lago. O ponto de coleta 1 (-22.305512, -47.381692) está indicado pelo marcador vermelho na **Figura 1**. O ponto de coleta 2 (22°18'27.8"S 47°22'59.6"W) está indicado pelo marcador vermelho na **Figura 2**.

O lago está localizado em uma área adjacente ao cultivo de cana de açúcar, o que indica que é possível que os defensivos agrícolas, utilizados para viabilizar a produtividade nesses cultivos, escoam para o lago e estejam em concentrações que interfiram na diversidade microbiana ali presente.

Figura 1 - Ponto de coleta 1. Área de coleta das amostras.



Fonte: Maxar Technologies, 2023.

Figura 2 - Ponto de coleta 2. Área de coleta das amostras.



Fonte: Maxar Technologies, 2023.

3.2. SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS

Um tratamento plausível para a água possivelmente contaminada por pesticidas, que normalmente contêm em sua formulação química moléculas policíclicas aromáticas ou monoaromáticos complexados a outras funções orgânicas, é o uso de agentes biológicos capazes de degradar o poluente alvo. Isso significa que microrganismos, no caso bactérias, que potencialmente metabolizam essas moléculas como substrato, podem biodegradar o tolueno, que é um contaminante monoaromático importante.

Para a seleção de bactérias de interesse, a partir das amostras de cada coleta do lago, foram acrescentados 50 μ L de uma solução preparada com 50 μ L de tolueno em 100 mL de água destilada e autoclavada, obtendo uma concentração de 0,05% de tolueno. Por se tratar de um composto forte, volátil e tóxico, optou-se por trabalhar com o mesmo de forma diluída em uma concentração mais baixa. Estas amostras foram colocadas em *shaker* sob agitação de 120 rpm e temperatura de 28°C, que é adequada para o acelerar o crescimento bacteriano, por um período de 24 horas. A partir dessas amostras foram realizadas as diluições decimais seriadas, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Após esse processo, foi realizado o *spread-plate* para cada diluição nas placas contendo ágar nutriente e, então, estas foram colocadas em uma estufa por um período de 72 horas para o crescimento bacteriano.

O isolamento foi realizado através da técnica de semeadura por esgotamento, a partir das placas obtidas de 10^{-1} , com a finalidade de isolar as culturas puras que

obtiveram maior crescimento nas placas, formando colônias isoladas e possibilitando a identificação dos microrganismos que cresceram no meio. Foram isoladas quatro colônias de bactérias. As placas obtidas do isolamento foram mantidas na estufa por um período de 48 horas e depois colocadas em geladeira.

O principal critério de escolha para as bactérias foi o tamanho das colônias, portanto as bactérias que cresceram de forma predominante nas placas e características morfológicas das colônias, estando fora do escopo do trabalho a identificação das linhagens selecionadas. As linhagens foram nomeadas como: B1 (bactéria 1); B2 (bactéria 2); B3 (bactéria 3) e B4 (bactéria 4). Houve também o interesse no potencial do efeito sinérgico dessas linhagens isoladas, foram testados os sinérgicos B1 + B2 e B3 + B4, correspondendo às coletas realizados, sendo B1 e B2 encontradas a partir da coleta 1 e B3 e B4 encontradas na coleta 2.

3.3. COLORIMETRIA (DCPIP)

A determinação da atividade microbiana associada à biodegradação do tolueno nos ensaios foi medida pelo indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol. Este indicador possui a coloração azul quando está oxidado e, quando é reduzido, fica incolor. Essa mudança de cor ocorre devido a mudança na estrutura da molécula de DCPIP. O átomo de nitrogênio presente nesta molécula funciona como um aceptor de elétrons e quando há mudança, por uma alteração na ligação dupla entre o nitrogênio e o carbono, ocorre a redução e mudança de cor (MONTAGNOLLI, 2010). Neste estudo, esse método foi adotado com a finalidade de estimar de forma qualitativa a atividade microbiana através da mudança de coloração, considerando um período de até 48 horas. O indicador foi adicionado ao caldo Bushnell Haas (BH), em tubos de ensaio, para o monitoramento da degradação do tolueno pelas bactérias isoladas.

3.3.1. Preparo dos Reagentes

3.3.1.1. Viabilidade do Método

Foram realizados ensaios pilotos que contribuíram para o aprimoramento dos parâmetros do método. O primeiro teste foi realizado utilizando 7,7 mL de caldo BH, conforme descrito na tabela 1, também em solução tampão e preparado em 1 L de água destilada e autoclavada. Os ensaios foram feitos em triplicata, com tubos para os controles de tolueno e DCPIP, e controles de cada uma das bactérias, B1, B2, B3 e B4. E, os tubos contendo o meio com as bactérias individualmente, a solução de tolueno e o DCPIP, com concentrações conforme a tabela 5. Não foram realizados ensaios com sinérgicos. Após um período de 48h, não havia sinais de descoloração em nenhum dos tubos.

Tabela 1 - Descrição dos componentes e concentrações do meio BH utilizado no primeiro ensaio piloto.

| Meio de cultura | Componentes e Concentração |
|--------------------------|--|
| BH (Bushnell Haas) caldo | 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,02 g.L ⁻¹ CaCl ₂ , 1 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,05 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ |

Fonte: Autoria própria.

Um segundo teste foi realizado também com o caldo BH, porém foram adicionados 2 mL de caldo nutriente, com composição e concentrações conforme a tabela 2. As soluções de tolueno e o DCPIP, com concentrações conforme a tabela 5. Após um período de 48h, não havia sinais de descoloração em nenhum dos tubos.

Tabela 2 - Descrição dos componentes e concentrações dos meios BH e caldo nutriente para o uso no segundo ensaio piloto.

| Meio de cultura | Componentes e Concentração |
|--------------------------|--|
| BH (Bushnell Haas) caldo | 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,02 g.L ⁻¹ CaCl ₂ , 1 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,05 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ |
| CN (Caldo nutriente) | 3 g.L ⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L ⁻¹ de peptona, 3g.L ⁻¹ de cloreto de sódio |

Fonte: Autoria própria.

O terceiro teste foi feito com meio completo, caldo nutriente, como descrito na tabela 3, em solução tampão, preparado em 1 litro de água destilada e autoclavada. Também em triplicata, com os tubos de controle de tolueno e DCPIP, controle de cada uma das bactérias assim como cada bactéria com a presença de tolueno e o DCPIP. As soluções de tolueno e o DCPIP, com concentrações conforme a tabela 5. Nestes ensaios, após o período de 24 horas, todos os tubos adquiriram a coloração roxa, conforme possível observar na figura 4, e não houve sinal de descoloração em nenhum dos tubos. A coloração roxa indicou um desvio do método que inviabilizou a análise. Esse desvio foi causado por uma mudança no estado redox por alterações de pH ou interações químicas não previstas que podem ser específicas do substrato utilizado, sendo a interação do DCPIP com o tolueno. Foi necessário fazer ajustes no meio de cultura utilizado para atingir os resultados obtidos.

Tabela 3 - Formulações dos meios de cultura para o uso nos ensaios de colorimetria. Descrição dos componentes e concentrações dos meios BH e caldo nutriente.

| Meio de cultura | Componentes e Concentração |
|----------------------|---|
| CN (Caldo nutriente) | 3 g.L ⁻¹ de extrato de carne, 5 g.L ⁻¹ de peptona |

Fonte: Autoria própria.

Figura 3. Controle DCPIP do terceiro ensaio piloto - início. Componentes: 400 µL de DCPIP em 7,7 mL de caldo nutriente com composição conforme a tabela 1.



Fonte: Autoria própria.

Figura 4. Controle DCPIP do terceiro ensaio piloto - 24h após o início. Componentes: 400 μ L de DCPIP em 7,7 mL de caldo nutriente com composição conforme a tabela 1.



Fonte: Autoria própria.

3.3.1.2. Ensaios Definitivos

Considerando os resultados obtidos a partir dos ensaios anteriores, no quarto teste, houve uma nova mudança de meio para o caldo BH, exatamente como descrito na tabela 4, com adição de 2 g de glicose, em solução tampão e preparado em 1 litro de água destilada e autoclavada. A partir dessa preparação de meio foram obtidos resultados de descoloração nos ensaios com o indicador DCPIP. Para o preparo da solução de DCPIP dissolveu-se 0,1 g em 100 mL de água destilada e autoclavada, e então homogeneizada e mantida em um frasco coberto por papel alumínio, protegido de luz.

Tabela 4 - Formulações dos meios de cultura para o uso nos ensaios definitivos de colorimetria. Descrição dos componentes e concentrações dos meios BH e caldo nutriente.

| Meio de cultura | Componentes e Concentração |
|--------------------------|--|
| BH (Bushnell Haas) caldo | 0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,02 g.L ⁻¹ CaCl ₂ , 1 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ , 1 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 2 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,05 g.L ⁻¹ de FeCl ₃ |

Fonte: Autoria própria.

Uma solução de tolueno foi preparada adicionando 50 μ L de tolueno em 100 mL de água destilada e autoclavada, obtendo uma concentração de 0,05% de tolueno. Foram utilizados 50 μ L desta solução nos ensaios com as bactérias.

3.3.2. Montagem dos Ensaio Definitivos

Os ensaios foram conduzidos em tubos tampados com algodão. A tabela 5 mostra o conteúdo e as concentrações de cada ensaio. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. Primeiro, adicionou-se o caldo BH preparado em solução tampão e com adição de glicose, posteriormente os outros componentes com a medida de uma alçada de cada bactéria, sendo o DCPIP o último a ser adicionado. Além dos testes com cada bactéria, B1, B2, B3 e B4, também foram realizados os sinérgicos de B1 + B2 e B3 + B4, de acordo com as coletas e placas em que foram isoladas. Os tubos foram tampados com algodão e o conteúdo foi agitado em vórtex por 30 segundos em alta rotação para homogeneização. Posteriormente, foram colocados em um recipiente de plástico preto e cobertos por papel alumínio para impedir a entrada de luz. Os ensaios foram colocados em um *shaker* com agitação de 180 rpm para a homogeneização e a garantia da dissolução de oxigênio por toda a coluna de líquido no tubo, com temperatura de 28°C.

Considerando a coleta e realização dos testes em laboratório e que o meio BH testado inicialmente para verificar a atividade microbiana nos ensaios de DCPIP não obteve sinais de descoloração, a adição de glicose no meio pode ser justificada com a finalidade de sustentar o crescimento microbiano.

Tabela 5 - Composição dos ensaios colorimétricos realizados do processo de biodegradação do tolueno.

| Ensaio | DCPIP | Caldo BH em solução tampão + Glicose | Bactérias | Tolueno (Solução de 50 µL em 100 mL) |
|----------------------------------|--------|--------------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| Controle DCPIP | 400 µL | 7,7 mL | - | - |
| Controle Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | - | 50 µl |
| Controle Bactéria 1 | 400 µL | 7,7 mL | B1 | - |
| Controle Bactéria 2 | 400 µL | 7,7 mL | B2 | - |
| Controle Bactéria 3 | 400 µL | 7,7 mL | B3 | - |
| Controle Bactéria 4 | 400 µL | 7,7 mL | B4 | - |
| Controle Sinérgico Bactérias 1+2 | 400 µL | 7,7 mL | B1 + B2 | - |
| Controle Sinérgico Bactérias 3+4 | 400 µL | 7,7 mL | B3 + B4 | - |
| Bactéria 1 + Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | B1 | 50 µL |
| Bactéria 2 + Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | B2 | 50 µL |
| Bactéria 3 + Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | B3 | 50 µL |
| Bactéria 4 + Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | B4 | 50 µL |
| Sinérgico Bactéria 1+2 + Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | B1 + B2 | 50 µL |
| Sinérgico Bactéria 3+4 + Tolueno | 400 µL | 7,7 mL | B3 + B4 | 50 µL |

Fonte: Autoria própria.

3.3.3. Acompanhamento da Biodegradação

O acompanhamento do processo de biodegradação foi caracterizado pela descoloração do indicador de DCPIP e a mesma foi monitorada durante 2 dias. Essa análise qualitativa foi feita através de fotografias, onde se seguiu padrão de iluminação e ordenação dos tubos. Conforme mostra a tabela 6, foram adotados os seguintes indicadores qualitativos de acordo com a descoloração dos tubos: (-) para os tubos onde não houve nenhuma descoloração; (+) nos tubos em que há descoloração leve; (++) nos tubos em que há descoloração média; (+++) em tubos em que houve descoloração total. O indicativo de (X) foi adotado para demonstrar os ensaios em que o DCPIP apresentou desvio do método, pois não houve descoloração, mas ocorreu uma mudança de cor do azul para o roxo.

Tabela 6 - Método de avaliação, indicador qualitativo. Na primeira linha, imagens dos níveis de descoloração, na segunda linha os indicadores qualitativos adotados para avaliar as imagens e, na terceira linha, a descrição de cada indicador correspondente.

| | | | | | |
|--------------------------------------|---|---|--|---|---|
| Nível de descoloração |  |  |  |  |  |
| Indicador qualitativo adotado | - | + | ++ | +++ | X |
| Descrição | Sem descoloração | Descoloração leve | Descoloração média | Descoloração Total | Desvio do método, alteração de cor para roxo |

Fonte: Autoria própria.

3.4. CRITÉRIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS DOS ISOLADOS

Através da técnica de esgotamento, foi possível conhecer melhor a morfologia das culturas puras. Por meio do método de coloração de Gram, foi possível caracterizar microscópicamente as bactérias e visualizar melhor no microscópio. Para a coloração de Gram, foram preparadas as lâminas de cada bactéria, fazendo a fixação da suspensão bacteriana. Pingou-se primeiramente a violeta genciana em cima das lâminas de forma a cobrir a suspensão, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e foram aguardados 2 minutos. Passando esse tempo, adicionou-se o segundo corante, o lugol que é fixador, e novamente mais 2 minutos para a fixação. Após esse tempo, as lâminas foram lavadas com a solução descorante (álcool) por 30 segundos e então lavadas com água para retirar o excesso. O último corante utilizado foi a safranina, deixada por 2 minutos em cima das lâminas também. Passado o tempo, as lâminas foram novamente lavadas com água e, enfim, secadas, para a observação no microscópio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. INDICADOR QUALITATIVO

Neste estudo, a presença da glicose e alteração do meio BH foram significativos para a obtenção dos resultados de degradação. Os ensaios em quadruplicata, com os componentes e quantidades conforme descrito na tabela 2, após 48 horas em agitação e temperatura constantes no *shaker*, apresentaram os resultados descritos na tabela 7:

Tabela 7 - Resultado do teste de DCPIP com os ensaios definitivos. Avaliação dos ensaios a partir dos indicadores qualitativos.

| Ensaio | Atividade |
|---------------------------|------------------|
| Controle DCPIP | - |
| Controle Tolueno | - |
| Controle B1 | - |
| Controle B2 | + |
| Controle B3 | + |
| Controle B4 | + |
| Controle Sinérgico B1+B2 | - |
| Controle Sinérgico B3+B4 | ++ |
| B1 + Tolueno | - |
| B2 + Tolueno | + |
| B3 + Tolueno | + |
| B4 + Tolueno | + |
| Sinérgico B1+B2 + Tolueno | - |
| Sinérgico B3+B4 + Tolueno | ++ |

Fonte: Autoria própria.

Conforme os indicativos e as imagens obtidas presentes na figura 13 do apêndice, é possível verificar que houve uma descoloração leve (+) nos seguintes tubos: controle B2; controle B3; controle B4; B2 + tolueno; B3 + tolueno; e B4 + tolueno. Nos tubos de controle sinérgico B3 + B4 e sinérgico B3 + B4 + tolueno a descoloração ocorreu de forma mais evidente, sendo classificada como descoloração média (++). Isso indica que essas bactérias, B3 e B4, tiveram a capacidade de biodegradação aumentada quando colocadas juntas em um mesmo ensaio. Os tubos de controle do DCPIP, controle de tolueno, controle B1, controle sinérgico B1 + B2, B1 + tolueno e sinérgico B1 + B2 + tolueno não apresentaram

nenhum nível de descoloração (-). Os ensaios que continham B1 não demonstraram sinais de atividade, mesmo quando colocada junto a B2 nos sinérgicos. Nenhum dos tubos apresentou descoloração total (+++).

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o sinérgico de B3 + B4 pode ser promissor, pois apresentou descoloração não somente nos tubos de controle, mas também nos tubos com a adição do tolueno. Os ensaios com sinérgicos são justificados pois os microrganismos, no caso as bactérias B3 e B4, estão presentes no mesmo ambiente e podem interagir entre si, e a ação sinérgica pode aumentar o potencial de degradação. Individualmente, as bactérias B3 e B4 também apresentaram descoloração, porém de forma mais leve do que quando combinadas.

De forma geral, a taxa de degradação do tolueno foi considerada baixa, é possível verificar o efeito tóxico aos microrganismos. Na literatura, é possível encontrar estudos que constataam também a ação inibidora desse hidrocarboneto para a atividade bacteriana. Souza (2013), através de ensaios conduzidos em agitador rotativo com a finalidade de selecionar a bactéria com maior tolerância ao tolueno em meios de cultura à base de tolueno e também na ausência deste composto, constatou que a presença do tolueno nos meios foi prejudicial para todos os microrganismos testados, inibindo o crescimento e reduzindo a concentração celular. Em outro estudo, realizado por Kerber (2020), o objetivo foi isolar bactérias a partir de amostras de água subterrânea, provenientes de uma área contaminada, e avaliar o crescimento em meio mínimo contendo BTX. Foram isoladas 10 linhagens bacterianas e ao final da triagem, foi identificado que apenas um isolado bacteriano sobreviveu a partir do enriquecimento utilizando o tolueno, em comparação com outros 4 por meio do enriquecimento com benzeno e 5 com enriquecimento com xileno.

4.1.1. Ensaios de Confirmação do Potencial de Biodegradação de B3 e B4

Um ensaio teste em triplicata foi realizado apenas com a B4 e o sinérgico B3 + B4, com componentes e quantidades conforme descrito na tabela 5. Os tubos foram armazenados em BOD a 30°C. Após um período de 24 horas, foi possível observar os seguintes resultados descritos na tabela 8:

Tabela 8. Resultado dos ensaios realizados para testar o potencial de biodegradação do sinérgico B3 + B4.

| Ensaios | Atividade |
|----------------------------|-----------|
| Controle DCPIP | - |
| Controle Tolueno | - |
| Controle B4 | - |
| Controle Sinérgicos B3+B4 | +++ |
| B4 + Tolueno | - |
| Sinérgico B3 + B4 +Tolueno | + |

*O resultado obtido não foi consistente entre as repetições, mas sim entre os ensaios.

Fonte: Autoria própria.

Os tubos destes ensaios não foram colocados em shaker, mas apesar de não serem mantidos em agitação, a temperatura foi mantida a 30°C. Após um dia, foi possível observar a descoloração completa (+++) em um dos tubos de ensaio do controle de B3 + B4, como consta na figura 14 presente no apêndice. Nos demais tubos, não houve nenhum sinal de descoloração (-). Após 48 horas, é possível observar, a partir da figura 15 presente no apêndice, sinais de descoloração em outro tubo da mesma triplicata do ensaio que houve a descoloração completa e também nos tubos que continham o sinérgico B3 + B4 com o tolueno (+). Este resultado reafirma o potencial promissor das linhagens de B3 e B4 quando combinadas, mas também demonstra que o tolueno é um agente inibidor de crescimento, visto que a descoloração completa somente ocorreu no tubo onde não havia o composto.

Foram realizados outros ensaios, em duplicata, com o objetivo de verificar se a alteração de recipiente poderia influenciar nos resultados apresentados pelo sinérgico de B3 + B4. Utilizaram-se frascos erlenmeyer ao invés de tubos de ensaio para verificar se a maior disponibilidade de oxigênio no frasco teria influência no processo. A composição desses ensaios e concentrações de componentes seguiram as informações estabelecidas na tabela 5. Além disso, foram colocados em agitação no *shaker* a 180 rpm e 28°C. Os resultados estão descritos na tabela 9 e são visíveis através da figura 16 contida no apêndice.

Tabela 9. Resultado dos ensaios realizados para testar o potencial de biodegradação do sinérgico B3 + B4 em frascos erlenmeyer.

| Ensaio | Atividade |
|------------------------------|------------------|
| Controle DCPIP | - |
| Controle Tolueno | - |
| B3 + Tolueno | - |
| Sinérgicos B3 + B4 + Tolueno | +++ |

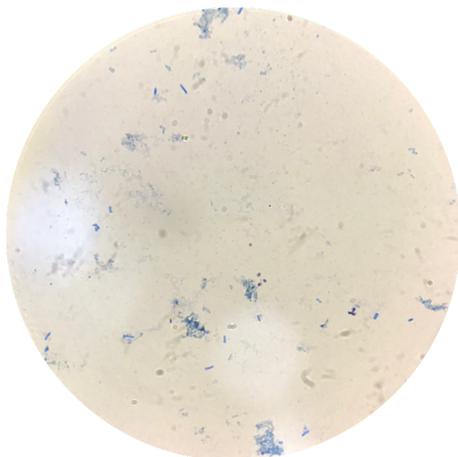
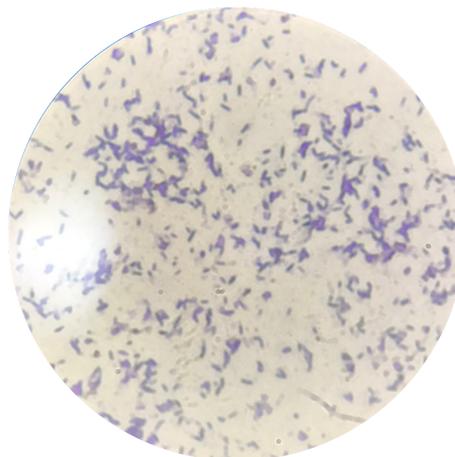
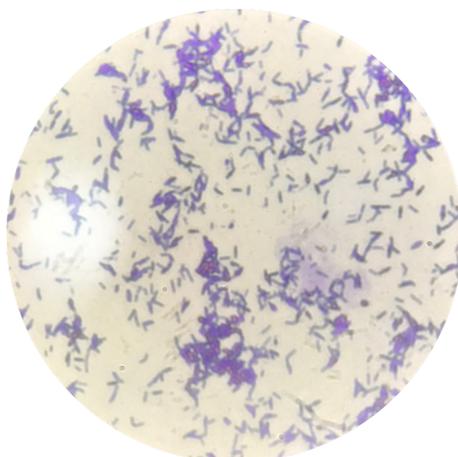
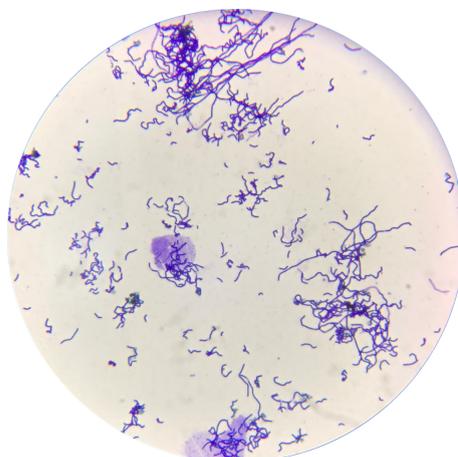
*O resultado obtido não foi consistente entre as repetições, mas sim entre os ensaios.

Fonte: Autoria própria.

Os controles de DCPIP, controle de tolueno, e controle de B3 + tolueno não apresentaram descoloração (-) após 48 horas. O sinérgico B3 + B4 + tolueno apresentou a descoloração completa após o mesmo período. Novamente, as bactérias B3 e B4 demonstraram potencial de degradação quando combinadas.

4.2. CARACTERIZAÇÃO MICRO E MACRO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS

Após o preparo das lâminas pelo método de Coloração de Gram, as bactérias foram observadas em microscópio e identificadas como Gram-positivas, conforme é possível verificar nas figuras 5, figura 6, figura 7 e figura 8.

Figura 5. B1 - aumento de 1000x**Figura 6.** B2 - aumento de 1000x**Figura 7.** B3 - aumento de 1000x**Figura 8.** B4 - aumento de 1000x

Fonte: Autoria própria.

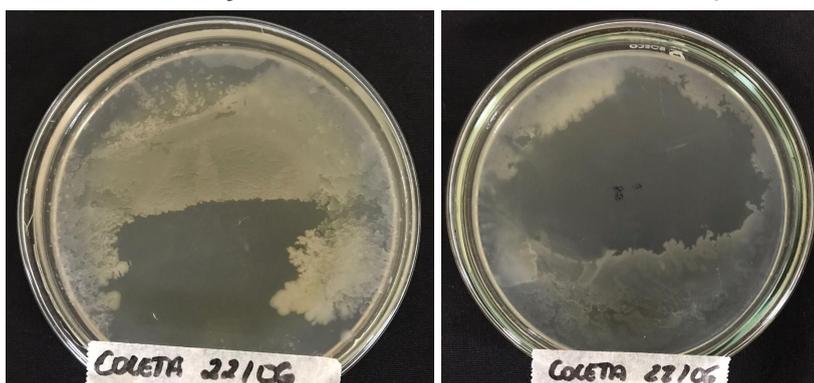
Referente a morfologia, nas imagens obtidas por microscópio da bactéria 1, foi possível identificar *coccus* através do aumento de 1000x sendo a maioria identificadas como *Diplococcus*. A partir das imagens obtidas da observação da lâmina que continha a bactéria 2, é possível identificar que as bactérias possuem a morfologia de *Bacillus*. As imagens obtidas a partir da lâmina da bactéria 3 também indicam ser *Bacillus*. Na lâmina obtida da bactéria 4, foi possível observar que se trata de bactérias filamentosas.

Compreender a morfologia das bactérias isoladas pode auxiliar na identificação de microrganismos capazes de degradar o tolueno. Além disso, para a execução de estudos futuros dedicados a seleção de bactérias com potencial para a bioprospecção. Em uma pesquisa realizada por Bielefeldt e Stensel (1999), bactérias

filamentosas já foram identificadas como capazes de degradar o tolueno como componente individual do BTEX.

Em termos de caracterização macro, na figura 9 e na figura 11 é possível observar as colônias de bactérias obtidas das placas de diluição da primeira e segunda coletas respectivamente e, nas figuras 10 e 12, as linhagens selecionadas e isoladas de cada placa.

Figura 9 - Placas da diluição de 10^{-1} com bactérias obtidas do ponto de coleta 1



Fonte: Autoria própria.

Figura 10 - Placas de isolamento contendo as bactérias B1 à esquerda e B2 à direita



Fonte: Autoria própria.

Figura 11 - Placa da diluição de 10^{-1} com bactérias obtidas do ponto de coleta 2



Fonte: Autoria própria.

Figura 12 - Placas de isolamento contendo as bactérias B3 à esquerda e B4 à direita



Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÕES

Considerando que as populações microbianas existentes no lago estão presentes em conjunto na natureza, os resultados obtidos dos tubos que continham as linhagens de bactérias 3 e 4 juntas são promissores pois, mesmo nos ensaios com tolueno, apresentaram certo grau de descoloração, que indica atividade microbiana de biodegradação ou metabolização do tolueno. Sendo assim, apresentam potencial para serem aplicadas na biodegradação do composto tolueno e eventualmente para a biorremediação. Os sinérgicos de B1 e B2 não apresentaram descoloração, enquanto B1 individualmente não apresentou descoloração e B2 apresentou uma descoloração leve, esses resultados foram semelhantes nos tubos de controle e nos que continham o tolueno.

Apesar das limitações, o método colorimétrico de ensaios com o DCPIP apresenta vantagens como a rápida detecção do metabolismo microbiano e o baixo custo. A biodegradação foi estimada de forma indireta pela mudança de cor do indicativo DCPIP e pela análise das imagens obtidas utilizando os indicadores qualitativos. Devido ao aumento da produção nos campos, estudos que analisem a interação de substâncias depositadas no meio ambiente são necessários. Existe uma grande quantidade de trabalhos publicados referentes a estudos sobre a contaminação de solos, onde a capacidade enzimática é maior do que em água, porém pesquisas sobre a contaminação em corpos d'água como lagos, também são importantes para avaliar os possíveis danos da interferência nesses ecossistemas, e indicar quais processos de remediação podem ser utilizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIELEFELDT, AR, STENSEL, HD. **Biodegradação de compostos aromáticos e TCE por um consórcio dominado por bactérias filamentosas**. Biodegradação 10, 1–13 (1999). Disponível em: <<https://doi-org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1023/A:1008327006308>> Acesso em: 15 mar. 2023.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conomia_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf> Acesso em: 15 mar. 2023.

CAO, L.; JIANG, H.; YANG, J.; FAN, L.; LI, F.; HUANG, Q. **Determinação Simultânea de Benzeno e Tolueno em Concentrado Emulsificável de Pesticida por Headspace GC-MS**. Journal of Analytical Methods in Chemistry, v. 2013, Artigo ID 121783, p. 1-5, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2013/121783>> Acesso em: 17 mar. 2023.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). **Tolueno**. São Paulo, 2021. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2021/05/Tolueno.pdf>> Acesso em: 15 mar. 2023.

DAWSON JJ, IROEGBU CO, MACIEL H, PATON GI. **Application of luminescent biosensors for monitoring the degradation and toxicity of BTEX compounds in soils**. J Appl Microbiol. 2008. 104, 141-151. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03552.x>> Acesso em: 3 abr. 2022

EDWARDS, CA (1977). **Natureza e Origens da Poluição dos Sistemas Aquáticos por Pesticidas**. Em: Khan, MAQ (eds) **pesticidas em ambientes aquáticos**. Pesquisa em Ciências Ambientais, vol 10. Springer, Boston, MA. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2868-1_2>. Acesso em: 15 mar. 2023.

FAYEMIWO, OM; DARAMOLA, MO, MOOTHI, K. **BTEX compounds in water - future trends and directions for water treatment**. Water SA. 2017, vol.43, n.4, p.602-613. Disponível em: <http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1816-7950201700040008> Acesso em: 9 abr. 2022

HANSON, K.G., DESAI, J.D., DESAI, A.J. **A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms**. Biotechnol Tech 7, 745–748

(1993). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00152624>>. Acesso em: 17 mar. 2023.

KERBER, S. S. **Prospecção de bactérias com potencial na biorremediação de áreas contaminadas com BTX (benzeno, tolueno e xileno)**. 2020. 76 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2020. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/216493>> Acesso em: 17 mar. 2023.

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis***. 2010. 122 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais e Ciências Ambientais) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/94963/montagnolli_rn_me_rcla.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 mar. 2023.

OTSUKA, A. A. **Avaliação da biodegradação de tolueno por fungos isolados de ambientes associados ao petróleo**. 2015. 83 f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/131710>>. Acesso em: 9 abr. 2022.

QUITERIO, G. M.. **Avaliação da biodegradação da mistura diesel/biodiesel**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 113p., 2018. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/152707>> Acesso em: 21 abr. 2022.

SARAVANAN, A. et al. **A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes**. Journal of Hazardous Materials, v. 419, p. 13. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126451>> Acesso em: 15 mar. 2023.

SOUZA, C. E. **Produção e ação de biossurfactante produzido por bactérias em meios salinos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos**. 2013. 172 p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-26032014-163942/publico/Ell_en_Cristina_Souza_ME_original.pdf> Acesso em: 15 mar. 2023.

7. APÊNDICE

Nos apêndices estão descritos as figuras registradas ao longo dos experimentos realizados neste trabalho.

7.1. INDICADOR QUALITATIVO

Imagens dos resultados obtidos dos ensaios realizados com o DCPIP e as bactérias de interesse.

Figura 13 - Resultado dos ensaios de DCPIP em quadruplicata após 48 horas. Na primeira linha, os controles de DCPIP, controles de tolueno, controle de B1 e B1 + tolueno. Na segunda linha, o controle de B2, B2 + tolueno, controle de B3 e B3 + tolueno. Terceira linha, o controle de B4, B4 + tolueno, controle do sinérgico B1 + B2, B1 + B2 + tolueno. Na última linha, controle sinérgico B3 + B4 e B3 + B4 + tolueno.

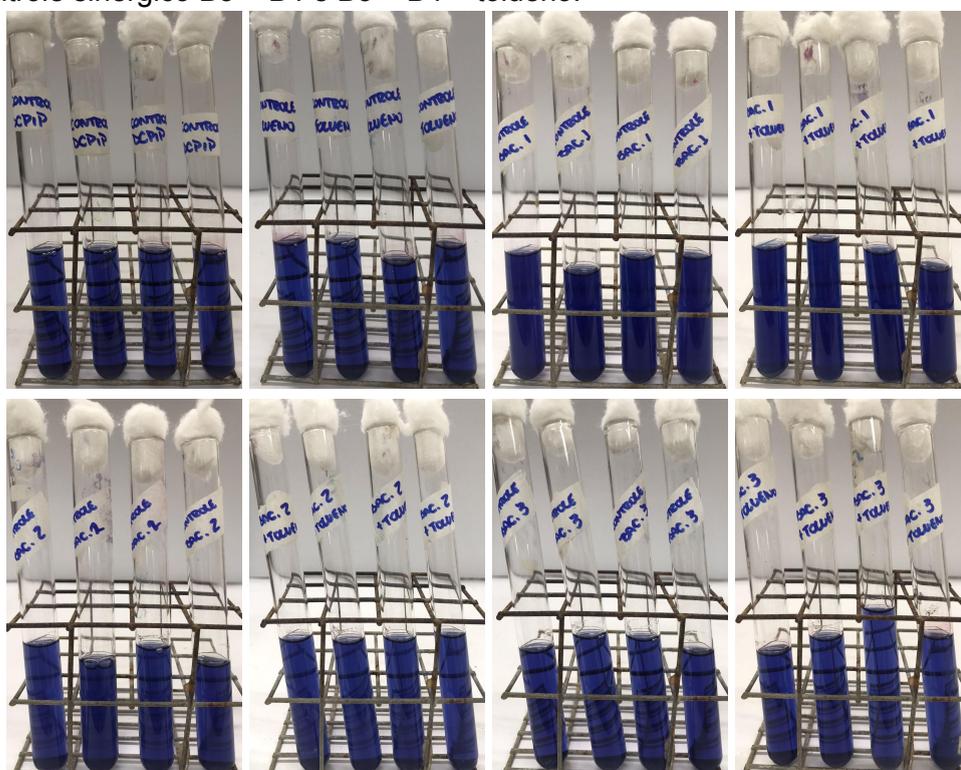




Figura 14. Resultado dos ensaios de confirmação do potencial de biodegradação de B3 e B4 após 24 horas. Da esquerda para a direita os seguintes ensaios: controle de DCPIP, controle de tolueno, controle de B4, B4 + tolueno, controle sinérgico B3 + B4 e sinérgico B3 + B4 + tolueno.

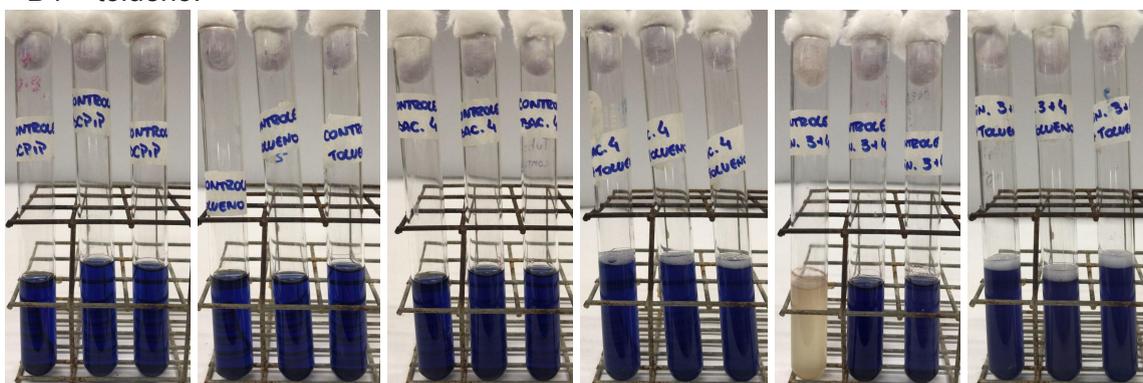


Figura 15. Resultado dos ensaios de confirmação do potencial de biodegradação de B3 e B4 após 48 horas. Imagem à esquerda sendo o controle do sinérgico B3 + B4 e a imagem a direita o sinérgico de B3 + B4 + tolueno.

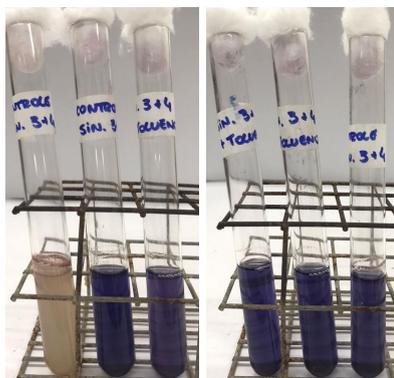
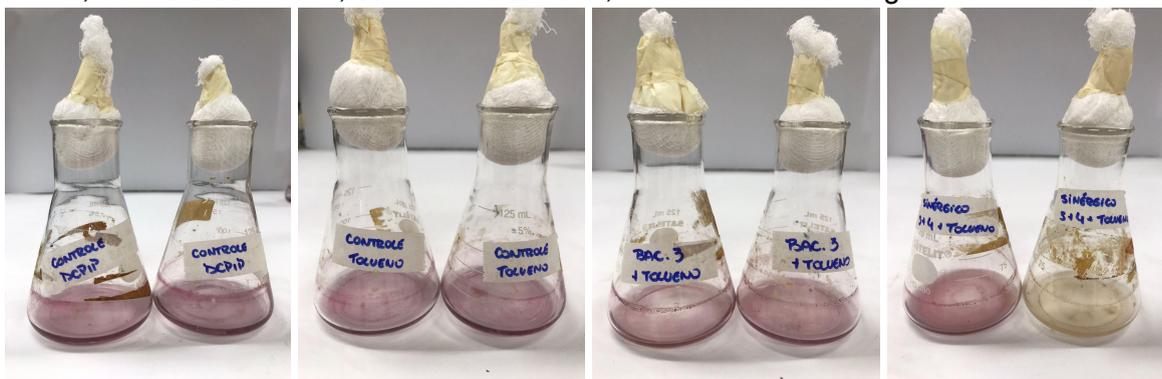


Figura 16. Resultado dos ensaios duplicata realizados em frascos erlenmeyer, com objetivo de confirmar o potencial de biodegradação de B3 e B4, após 48 horas. Da esquerda para a direita, controle de DCPIP, controle de tolueno, B3 + tolueno e sinérgico B3 + B4 + tolueno.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CNPJ: 45.358.058/0001-40

CCA – CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – Campus Araras

Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas



Rod. Anhanguera, km 174 – CP: 153 – Araras – SP – CEP: 13600-970 – Telefone: (19) 3543-2588 – E-mail: cblar@ufscar.br

ANEXO I

Ata de defesa da Monografia no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas UFSCar *campus* Araras

Nome do(a) estudante: Maria Carolina Tamarozzi dos Santos

Título do trabalho: Avaliação qualitativa da capacidade de biodegradação do tolueno por bactérias isoladas

Data e horário da defesa: 5 de abril de 2023, 9h00

AVALIADOR 1

É o orientador ou o coorientador? Orientador

Nome: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

Instituição de origem: Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras

Parecer: Recomendo a aprovação do trabalho de conclusão de curso apresentado pela aluna Maria, ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas. Durante a defesa, a aluna realizou uma apresentação e exposição satisfatórias à banca examinadora. Além disso, o trabalho foi bem escrito com objetivos de pesquisa cumpridos nas atividades experimentais desenvolvidas.

Nota da versão escrita, de 0 a 5 pontos: 4,0

Nota da apresentação oral e defesa, de 0 a 5 pontos: 3,5

AVALIADOR 2

Nome: Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri

Instituição de origem: Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras

Parecer: A aluna Maria Carolina apresentou o trabalho de forma satisfatória, e conseguiu responder aos questionamentos realizados pela banca. O trabalho escrito também atendeu à expectativa, porém, com algumas modificações necessárias, apontadas pela banca, e que serão realizadas pela aluna no prazo estipulado. Da minha parte atesto que a aluna atende aos requisitos para ser considerada aprovada.

Nota da versão escrita, de 0 a 5 pontos: 4,0

Nota da apresentação oral e defesa, de 0 a 5 pontos: 3,5



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CNPJ: 45.358.058/0001-40

CCA – CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – Campus Araras
Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas



Rod. Anhanguera, km 174 – CP: 153 – Araras – SP – CEP: 13600-970 – Telefone: (19) 3543-2588 – E-mail: cblar@ufscar.br

AVALIADOR 3

Nome: Me. Elisa Pais Pellizzer

Instituição de origem: Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’, campus Rio Claro

Parecer: A aluna Maria soube responder aos questionamentos acerca da pesquisa desenvolvida e apresentou os dados obtidos de forma satisfatória, de acordo com o trabalho escrito. Sugiro que sejam feitas alterações na monografia referentes as sugestões propostas pela banca examinadora, visando a melhora da parte escrita. Portanto, sou favorável à aprovação do trabalho de conclusão ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Nota da versão escrita, de 0 a 5 pontos: 4,0

Nota da apresentação oral e defesa, de 0 a 5 pontos: 3,5

RESULTADO

Aprovada sem ressalvas

Aprovada, com algumas modificações sugeridas, as quais devem ser incorporadas à Monografia para conferência pelo professor orientador, dentro do prazo de 15 dias

Necessita de reformulações e a aprovação ficará condicionada à efetuação das mesmas pelo estudante. As reformulações devem ser feitas dentro de um prazo acordado com o professor orientador e a nova versão da Monografia deve ser enviada para o orientador para conferência e nova avaliação

Reprovada, pois não atende às exigências estabelecidas para um Trabalho de Conclusão de Curso

ASSINATURAS DOS AVALIADORES

Orientador:

Documento assinado digitalmente
gov.br RENATO NALLIN MONTAGNOLLI
Data: 06/04/2023 19:12:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador 2:

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIA MARIA ROSA MAGRI
Data: 10/04/2023 09:34:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Avaliador 3:

Documento assinado digitalmente
gov.br ELISA PAIS PELLIZZER
Data: 10/04/2023 04:26:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

PARECER FINAL: Favorável à aprovação, com nota final 7,5

NOTA FINAL DA APRESENTAÇÃO ORAL E DEFESA (média das notas dos avaliadores, de 0 a 5 pontos): 3,5

NOTA FINAL DA VERSÃO ESCRITA (média das notas dos avaliadores, de 0 a 5 pontos): 4,0

NOTA FINAL ATRIBUÍDA PELA BANCA EXAMINADORA (somatória das duas médias acima, de 0 a 10 pontos): 7,5