

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

ESTUDO DO METABOLISMO DE POLIETILENO: DESVENDANDO AS ESTRATÉGIAS METABÓLICAS  
MICROBIANAS ENVOLVIDAS NA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS

JULIANNA PEIXOTO TREPTOW

Orientador: Ricardo H. Krüger

Fevereiro/2018

*“Assim deixai a vossa luz resplandecer diante dos homens, para que vejam as vossas boas obras e glorifiquem o vosso Pai que está nos céus.” (Mateus 5:10)*

Em memória de meu amado irmão, Leonardo Peixoto

Grandes homens inspiram grandes vitórias

A ele dedico essa obra e todo o meu amor

Em primeiro lugar, sempre, agradeço a Deus por me conceder a honra de poder contemplar mais uma de suas grandes obras. Para mim, a ciência consiste em admirar os milagres que nos cercam a todo o tempo. Obrigada, meu Pai amado, por esse tão grande amor, graça e misericórdia que recebo todos os dias. Esse trabalho (bem como toda a minha vida) é inteiramente Seu, para que o Seu Santo nome seja sempre exaltado e glorificado. Obrigada por fazer de mim um instrumento da Tua graça.

Agradeço aos meus amados pais, que sempre lutaram para que seus filhos tivessem uma educação de excelência, sempre suprindo tudo o que fosse necessário para que alcançássemos nossos sonhos. Eles cunharam o nosso caráter e as nossas prioridades. O caminho que trilhei foi gerado por eles e, sem eles, nada seria possível. Com muita certeza eu afirmo que esse trabalho foi feito muito mais por eles do que por mim.

Agradeço ao meu querido marido, Werner, a quem eu tanto amo e admiro: companheiro de vida que Deus preparou para mim. Ele é meu grande exemplo acadêmico a ser seguido, sempre presente com conselhos, ajudas e sabedoria nos momentos que eu mais preciso. Espero que, um dia, eu possa traçar uma trajetória tão brilhante quanto a dele, mas, na realidade, o que importa é que sempre estejamos juntos em qualquer que seja a trajetória.

Agradeço ao meu orientador, professor Ricardo Krüger, quem tornou isso tudo possível. Por quase 10 anos ele me direcionou e me concedeu a grande alegria de poder trabalhar junto a ele. Eu não poderia ter tido uma melhor orientação, com toda a certeza. Ele não apenas “abraçou a causa”, como também sempre foi um exemplo de pesquisador para todos nós. Sempre teremos muito o que aprender com ele. Obrigada por acreditar no projeto e no meu trabalho, professor. Espero que este seja apenas o começo de uma longa trajetória acadêmica/científica.

Agradeço à minha linda e amada família, meu irmão Leandro, minhas sobrinhas maravilhosas Luíza e Lídia, minhas cunhadas Liliane e Shirley, minhas amadas avós e bisavó (que, por sinal, é o meu maior exemplo de vida, de mulher, de pesquisadora e de força), tias, primos... Vocês constituem a base da minha vida! Sou muito abençoada por ter sido colocada nessa família! Agradeço também ao meu eternamente amado e lembrado irmão Leonardo, que embora não esteja aqui para presenciar essa vitória, sempre me incentivou a percorrer essa trajetória. Eu creio que houve festa no céu para comemorar essa vitória!

Agradeço aos membros da banca, professores Etelvino Bechara (USP), Georgios Pappas (UnB), Robert Miller (UnB) e Fabiano Thompson (UFRI), por toda a paciência e atenção dedicados a esse trabalho, bem como pelas cruciais contribuições não apenas no sentido de abrihantar esse trabalho, como também no sentido aprimorar a minha vida acadêmica. Sou extremamente grata pela oportunidade de aprender com eles.

Agradeço aos grandes e amados amigos Bete e Soares, que sempre vibraram com minhas vitórias e sempre sofreram com meus lutos. Eles são verdadeiros pais em Cristo para mim. A eles a minha eterna gratidão!

Agradeço aos meus lindos amigos de laboratório (Carla, Raul, Thaís, Renata, Regina, Alê, Fabyano, Samuel e Paula) por sempre alegrarem minha vida, seja com contribuições científicas ou sociais, e por sempre me manterem acordada (muitas doses de café). Não importa aonde eu esteja, com certeza levarei cada um no coração.

Meu agradecimento especial ao Alê e à Renata (novamente!) pelas fundamentais contribuições no trabalho. A ajuda de vocês foi imprescindível para o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço aos colegas Waldeyr e Andrei por toda a ajuda com Linux e bioinformática. Espero poder retribuir a vocês sempre que precisarem!

Agradeço às minhas maravilhosas amigas, minhas irmãs que eu pude escolher (que também foram dadas por Deus!)! São muitos anos de amizade, de irmandade e de amor (mais anos do que gostaríamos de confessar...)! Vocês me levantaram sempre que eu caí, sorriram comigo, choraram comigo... (aqui aplica-se o famoso “mutualismo”) vocês são extensão da minha vida! Obrigada!!!

Agradeço ao dr. Luciano Paulino por imensa dedicação e receptividade, por aceitar colaborar com esse projeto e contribuir de maneira tão importante e exemplar para que este se concretizasse.

Agradeço ao Élvio Botelho, da Polícia Federal, por tão gentilmente ceder o espectroscópio de infravermelho para que eu analisasse todos os filmes de PE. Sem dúvida essa foi uma contribuição fundamental para esse trabalho.

Agradeço à profa. Sônia Bão por gentilmente permitir a utilização do MEV.

Agradeço à empresa Carmel Olefins (Israel) por gentilmente ceder os filmes de PE utilizados nesse estudo.

Agradeço ao CNPq pelo imenso e constante apoio financeiro durante toda a minha iniciação científica, mestrado e doutorado. Agradeço também por viabilizar esse projeto por meio do CNPq Universal, sem o qual esse trabalho não teria sido concretizado.

Agradeço ao programa de pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília por todo o auxílio e apoio que sempre recebi. Sinto muito orgulho de ser formada por esse programa e de ter o privilégio de conviver com tão qualificado corpo docente.

Agradeço à minha querida professora Cynthia Kiaw, a grande responsável pelo meu amor à microbiologia!

Agradeço à Gordon Research Conference (GRC – Applied and Environmental Microbiology) pelas premiações, oportunidades e contribuições científicas, as quais foram essenciais para minha formação. Foi um privilégio poder aprender com tantos trabalhos de fronteira que estão sendo realizados por todo o mundo.

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e reitero meu reconhecimento de que sozinha certamente eu não teria chegado até aqui.

PE – polietileno

MMM – meio mínimo mineral

UV – ultravioleta

IV – infravermelho

EPS – substância polimérica extracelular

FTIR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MFA – microscopia de força atômica

PET – polietileno tereftalato

PVA – poliacetato de vinila

PVC – policloreto de vinila

PU – poliuretano

PP – polipropileno

PS – poliestireno

MHET – ácido mono(2-hidroxietil) tereftálico

NO – óxido nítrico

ROS – espécies reativas de oxigênio

RNS – espécies reativas de nitrogênio

---



---

LISTA DE ABREVIACÕES.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
ÍNDICE DE TABELAS.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO .....	18
Polietileno: do desenvolvimento tecnológico ao impacto ambiental.....	18
Biodegradação e Biodegradabilidade.....	22
Caracterização físico-química do polietileno e sua recalcitrância .....	25
Mecanismo da biodegradação de PE.....	27
O papel da limitação de fontes de carbono na biodegradação de PE.....	30
Metabolismo de polímeros sintéticos .....	32
<i>Comamonas</i> sp., <i>Delftia</i> sp. e <i>Stenotrophomonas</i> sp.: o potencial microbiano encriptado nos solos do Cerrado no contexto da biodegradação de polietileno.....	34
JUSTIFICATIVA .....	38
OBJETIVO GERAL .....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
MATERIAIS E MÉTODOS.....	42

1.	Desinfecção dos filmes de PE.....	42
2.	Limpeza de vidrarias .....	42
3.	Cultivo dos potenciais biodegradadores de PE.....	43
4.	Viabilidade e adesão bacteriana aos filmes de PE.....	44
5.	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	45
6.	Espectroscopia Raman e cálculo do grau de cristalinidade dos polímeros .....	45
7.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	46
8.	Microscopia de Força Atômica (MFA): análise da topografia e caracterização da viscoelasticidade .....	47
9.	Purificação e sequenciamento do DNA total .....	48
10.	Montagem e anotação dos genomas de Comamonas sp., Delftia sp. e Stenotrophomonas sp.....	48
11.	Preparo de materiais e soluções RNase FREE.....	49
12.	Purificação dos RNAs totais e RNA-seq .....	49
13.	Mapeamento, montagem e análise dos transcritomas .....	50
15.	Teste da produção de biosurfactantes .....	52
16.	Quantificação de nitrito e nitrato.....	53
17.	Quantificação de óxido nítrico .....	54
18.	Oxidação abiótica de amônia mediada por espécies reativas de oxigênio .....	54
19.	Efeito da quimioidenitrificação nos filmes de PE.....	54
20.	Investigação da oxidação de amônia por catálise enzimática .....	55
21.	Efeito do nitrato, nitrito e L-arginina como fontes de nitrogênio na produção de nitrito e NO .....	55

22. Análises estatísticas dos dados quantitativos.....	56
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
Prospecção de microrganismos e caracterização físico-química dos filmes de PE biodegradados.....	57
Estudo das estratégias metabólicas envolvidas na biodegradação de PE.....	67
Caracterização genômica dos biodegradadores de PE .....	78
Caracterização transcritômica de Comamonas sp., Delftia sp. e Stenotrophomonas sp. no contexto da biodegradação de PE .....	86
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>117</b>
Prospecção de microrganismos e caracterização físico-química dos filmes de PE biodegradados.....	117
Estudo das estratégias metabólicas envolvidas na biodegradação de PE.....	126
Produção e efeito de espécies reativas de nitrogênio (RNS) no contexto da biodegradação de PE .....	127
Mecanismos de resposta à limitação de carbono.....	130
Mecanismo geral proposto para o metabolismo de PE.....	133
Mecanismos metabólicos induzidos por PE.....	155
Potenciais aplicações biotecnológicas relacionadas ao estudo do metabolismo de PE .....	159
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>161</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>162</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>164</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>185</b>
Artigos completos publicados em periódicos: .....	185



- 
- Figura 1.** Estrutura química dos principais polímeros sintéticos (adaptado de Wilkes & Aristilde, 2017). PE: polietileno, PP: polipropileno, PVC: policloreto de vinila, PS: poliestireno, PET: polietileno tereftalato, PU: poliuretano, PMMA: polimetacrilato de metila, PVDC: policloreto de vinilideno, PC: policarbonato, Nylon: poliamida, Teflon: politetrafluor etileno, EVA: polietilenovinila acetato..... 19
- Figura 2.** Ciclo de produção e reciclagem de plásticos (Clift, 1997; Perugini et al., 2005) .....21
- Figura 3.** Estrutura química de alguns poliésteres naturais (PHB, PHV, PHBV) e polímeros sintéticos biodegradáveis (PCL, PLA, PGA, PGLA). PHB: polihidroxibutirato, PHV: polihidroxivalerato, PHBV: poli(2-hidroxibutirato-co-valerato), PCL: policaprolactona, PLA: poli(ácido láctico), PGA: poli(ácido glicólico), PGLA: poli(ácido glicólico láctico) (Adaptado de Franchetti & Marconato, 2016).....22
- Figura 4.** Representação química do polietileno, sintetizado a partir da polimerização de  $n$  monômeros de etileno. (Em: <[http://www.coleparmer.com/assets/techinfo/images/Zeus\\_Chem\\_Resistance\\_img\\_2.jpg](http://www.coleparmer.com/assets/techinfo/images/Zeus_Chem_Resistance_img_2.jpg)>. Acesso em: 15 de outubro de 2013).....25
- Figura 5.** Estrutura química (B1) e morfologia (A) do PE. O longo e hidrofóbico esqueleto carbônico do PE desencadeia a ocorrência de dobras de cadeia (A2), acarretando padrões morfológicos específicos: regiões cristalizadas, amorfas e de interfase (A3, A4). (Direita) Resposta metabólica à presença de PE como única fonte de carbono e energia e os efeitos desta na estrutura e composição química do polímero: a alta massa molecular do PE impede que este seja assimilado (B2), o que induz a expressão de genes de limitação de carbono e de adesão (B3), permitindo também a atuação de enzimas (globulares ou proteínas de membrana) e outras moléculas auxiliares (B4) que irão modificar a estrutura química do PE gerando produtos oxidados e/ou de massa molecular reduzida (B5) que serão assimilados e completamente oxidados pela  $\omega$ -oxidação e  $\beta$ -oxidação (B6) no ambiente intracelular. ....27
- Figura 6.** Mecanismo da formação de radicais e carbocátions (carbocation formation) em n-alcanos, resultando na formação de espécies químicas susceptíveis a reações de oxidação (\*). A abstração de um átomo de H da cadeia polimérica resulta na formação de macroradicaís  $R\bullet$  (chain-reaction initiation), que tanto pode reagir com grupos funcionais oxidados (e.g.  $O_2$  e OH) como acarretar a formação de ligações cruzadas ou de insaturações. Esses macroradicaís reativos acarretam (chain-

reaction propagation) a quebra de cadeia (scission), isomerização (radical isomerization) ou a transferência do radical a outros segmentos moleculares (radical transfer). Essa reação em cadeia encadeada pela formação de radicais é finalizada (chain-reaction termination) mediante a estabilização destes após a formação de ligações covalentes entre estes e outras moléculas (chain-reaction termination) (Adaptado de Killops & Killops, 2013). .....28

**Figura 7.** Região de coleta dos debris plásticos colonizados por microrganismos provenientes da microbiota do solo do bioma Cerrado, caracterizada por sua grande biodiversidade.....35

**Figura 8.** Cladograma de similaridade da análise filogenética das sequências dos genes 16S rRNA dos isolados potencialmente degradadores de PE usando o método de máxima verossimilhança e sequências de referência do GenBank (Schloss et al., 2009). As sequências foram alinhadas e todas as posições contendo *gaps* foram eliminadas. O cladograma foi construído utilizando-se o programa MEGA6 com 100 réplicas de bootstrap. Ramificações correspondendo a partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas de bootstrap foram colapsadas. A estirpe “PE 187” não apresentou atividade biodegradativa de PE, mas foi incluída na análise filogenética por questões comparativas.....36

**Figura 9.** (a) Concentração global de debris plásticos em superfícies oceânicas. Círculos coloridos indicam a concentração em massa por área ( $g.Km^{-2}$ ) baseada na média entre 442 locais amostrados. Áreas em cinza indicam zonas de acumulação nas superfícies dos oceanos preditas por um modelo de circulação superficial global. (b) Representação em boxplot da distribuição da contaminação das superfícies marinhas por resíduos plásticos, incluindo regiões sem acumulação (azul), regiões externas à acumulação (verde) e regiões de acumulação (vermelho) (adaptado de Cózar *et al.*, 2017).....39

**Figura 10.** Consequências do acúmulo de plásticos em ambientes naturais. (Em: <<http://coastalcare.org/2009/11/plastic-pollution/>>. Acesso em: 20 de outubro de 2013).....40

**Figura 11.** Montagem do sistema de membranas para a investigação das modificações químicas decorrentes (i) do efeito global da atuação microbiana, (ii) de proteínas e pequenas moléculas secretadas, (iii) apenas de pequenas moléculas secretadas e (iv) apenas de proteínas secretadas.....52

**Figura 12.** Viabilidade celular de representantes dos gêneros de biodegradadores de PE *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* ao longo de 20 dias de cultivo em MMM contendo um filme de PE como única fonte de carbono (PE) em contraste a culturas sem fontes de carbono (Control). Nessas imagens de microscopia de fluorescência das células coradas com os fluoróforos

syto9<sup>®</sup> e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD baclight bacterial viability kit, Invitrogen, USA) estão representadas em verde as células vivas, em vermelho células mortas e em amarelo a sobreposição de células vivas e mortas. ....58

**Figura 13.** Viabilidade celular de representantes dos gêneros de biodegradadores de PE *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* ao longo de 90 dias de cultivo em MMM contendo um filme de PE como única fonte de carbono. Os resultados revelam a viabilidade das células aderidas aos filmes de PE por microscopia de fluorescência (acima: em verde, células vivas; em vermelho, células mortas) e por crescimento em meio nutriente após a transferência das células aderidas para este. ....59

**Figura 14.** (a) Espectro de infravermelho (ATR-FTIR) dos filmes de PE incubados por 90 dias com *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde). Como controle positivo empregou-se o filme de PE exposto a fatores ambientais por 90 dias (amarelo) e como controle negativo o filme não tratado (vermelho). Em destaque estão os picos de absorção referentes às principais modificações químicas inferidas por meio dessa técnica. (b) Comparação entre os índices de carbonilas (carbonyl index), duplas ligações internas (double bond index) e duplas ligações terminais (terminal double bond index) estimados a partir dos espectros das amostras biodegradadas e dos controles (média  $\pm$  EP, n = 3). (\*) Não há diferença estatística em relação ao filme não submetido a tratamentos ( $P > 0,05$ ). ....61

**Figura 15.** Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de PE (a) não tratado, (b) exposto a fatores ambientais por 90 dias ou (c) incubado com bactérias por 90 dias. Evidente deterioração superficial pode ser observada após a incubação com as bactérias, sugerindo a ocorrência de biodegradação. ....62

**Figura 16.** Topografia nanométrica dos filmes de PE incubados com (a) *Comamonas* sp., (b) *Delftia* sp. ou (c) *Stenotrophomonas* sp. por 90 dias. (d) Filmes expostos a fatores ambientais por 90 dias foram utilizados como controle positivo e (e) filmes não tratados foram considerados como controle negativo. Barras laterais correspondem à distribuição das amplitudes ao longo do material e à amplitude máxima em nm em uma superfície de  $100 \mu\text{m}^2$ . (f) Representação gráfica dos parâmetros de rugosidade (média  $\pm$  EP, n = 10) do controle negativo (vermelho), controle positivo (amarelo) e PE incubado com *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) ou *Stenotrophomonas* sp. (verde): rugosidade médias ( $R_a$ ), rugosidade média quadrática ( $R_q$ ), padrão industrial japonês de rugosidade média ( $R_z$ ), altura média ( $R_z$ ), altura máxima de pico ( $R_p$ ) e profundidade máxima de vale ( $R_v$ ). (\*) Não há diferença estatística em relação ao filme não submetido a tratamentos ( $P > 0,05$ ). ....63

**Figura 17.** Comportamento viscoelástico determinado pelas imagens de contraste de fase em microscopia de força atômica dos filmes de PE incubados com (a) *Comamonas* sp., (b) *Delftia* sp. ou (c) *Stenotrophomonas* sp. por 90 dias. (d) Filmes expostos a fatores ambientais por 90 dias foram utilizados como controle positivo e (e) filmes não tratados foram considerados como controle negativo. Áreas com tendências elásticas estão representadas por tons mais claros em escala de cinza e áreas com tendências viscosas por tons mais escuros. Barras laterais indicam a distribuição dos ângulos de fase da oscilação do *cantilever*. (f) Percentual da contribuição do componente viscoso nos filmes de PE submetidos por 90 dias a tratamentos bióticos (azul, magenta, verde) ou abiótico (amarelo) em contraste a filmes não tratados (vermelho). .....64

**Figura 18.** Massa relativa da fração da matéria nas fases isotrópica-amorfa ( $\alpha_a$ ), anisotrópica-desordenada ( $\alpha_b$ ) e ortorrômbica-cristalina ( $\alpha_c$ ) dos filmes de PE antes (vermelho) e depois dos tratamentos abiótico (amarelo) e bióticos (*Comamonas* sp.: verde, *Delftia* sp.: magenta, *Stenotrophomonas* sp.: azul). .....66

**Figura 19.** Quantificação pelo método de Griess de nitrito produzido por *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) ao longo de 30 dias de cultivo em MMM contendo PE (PE) ou glicose (glucose) como única fonte de carbono ou na ausência de fontes de carbono (carbon free). Não foram observadas concentrações significativas de nitrato em nenhuma das culturas. ....68

**Figura 20.** Quantificação pelo método de Griess de nitrito produzido por *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) ao longo de 5 dias de cultivo em MMM sem amônia contendo L-arginina (L-arginine), nitrato (Nitrate) ou nitrito (Nitrite) como fontes de nitrogênio. O cultivo contendo nitrito reflete o consumo deste durante a incubação. ....69

**Figura 21.** Quantificação de nitrito produzido a partir da oxidação abiótica de amônia em soluções de MMM contendo diferentes concentrações de 1 a 100 mM peróxido de hidrogênio ao longo de 12 dias .....70

**Figura 22.** Quantificação pelo método de Griess de nitrito produzido a partir de frações lisadas de células de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) após 5 dias de cultivo em MMM contendo PE (PE) ou glicose (glucose) como única fonte de carbono ou na ausência de fontes de carbono (*Carbon free*).....71

**Figura 23.** Produção de óxido nítrico mensurada em unidades relativas de fluorescência (RFU) (a) nos sobrenadantes e (b) intracelularmente em tempo real a partir de culturas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas*

sp. (verde) em MMM sem fontes de carbono (Carbon free) e contendo PE (PE) ou glicose (Glucose) como fonte de carbono mantidas por 30 dias (Days). Os valores de RFU estão representados na escala de  $RFU \cdot 10^{-3}$ .....72

**Figura 24.** Produção de óxido nítrico mensurada (a) nos sobrenadantes e (b) intracelularmente em tempo real a partir de culturas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) incubadas por 5 dias em MMM sem amônia contendo L-arginina (L-arginine), nitrato (Nitrate) e nitrito (Nitrite) como fontes de nitrogênio.....74

**Figura 25.** Comparação entre os espectros FTIR de filmes de PE expostos aos produtos da reação de desnitrificação com filmes de PE biodegradados. Espectro FTIR dos filmes de PE submetidos a tratamentos abióticos com soluções de nitrito de sódio (verde), sulfato de ferro e nitrito de sódio (amarelo) ou MMM suplementado com nitrito de sódio (azul) em contraste a filmes não tratados (vermelho) (acima). Espectro FTIR dos filmes biodegradados por *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) ou *Stenotrophomonas* sp. (verde) (abaixo).....75

**Figura 26.** (a) Espectro FTIR dos filmes de PE submetidos aos tratamentos bióticos com *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) por 60 dias por meio do sistema de membranas, revelando os efeitos da ação direta do microrganismo em contato com o filme (i; linha contínua), bem como os efeitos da ação de enzimas extracelulares e ROS/RNS (ii; linha tracejada), de ROS/RNS (iii; linha pontilhada) e de enzimas extracelulares (iv; linha tracejada e pontilhada) nos polímeros sintéticos. (b) Análise detalhada das regiões espectrais compreendidas entre  $600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$ , enfatizando a relevante fragmentação oxidativa induzida por ROS/RNS (retângulos cinza escuro) e pela ação acoplada entre enzimas extracelulares e ROS/RNS (retângulos cinza claro). As principais modificações químicas induzidas pelos microrganismos e pelo metabolismo destes no PE indicam a fragmentação e a oxidação deste inferidas a partir da formação de insaturações (C=C bending), insaturações em posição terminal (=CH<sup>2</sup> bending), grupos alcóxi (C–O stretching), grupos acil (C–O stretching), grupos metil (–CH bending), grupos nitro (N–O stretching) e grupos vinileno (C=C stretching).....76

**Figura 27.** Teste em microplaca da presença de biosurfactantes nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. em três réplicas biológicas (Rep1; Rep2; Rep3) em contraste ao controle negativo (MMM), revelando a presença dessas moléculas em todas as culturas investigadas.....77

**Figura 28.** Distribuição dos EC numbers relativos à classe das oxidoredutases anotados a partir dos genomas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde).....80

<b>Figura 29.</b> Genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio e síntese de óxido nítrico anotados a partir dos genomas de <i>Comamonas</i> sp. (azul), <i>Delftia</i> sp. (magenta) e <i>Stenotrophomonas</i> sp. (verde). .....	82
<b>Figura 30.</b> Contagem direta do número de sequências anotadas a partir dos genomas de <i>Comamonas</i> sp. (azul), <i>Delftia</i> sp. (magenta) e <i>Stenotrophomonas</i> sp. (verde) e as respectivas descrições dos processos biológicos (GO) a estas relacionadas. ....	84
<b>Figura 31.</b> Contagem direta do número de sequências anotadas a partir dos genomas de <i>Comamonas</i> sp. (azul), <i>Delftia</i> sp. (magenta) e <i>Stenotrophomonas</i> sp. (verde) e as respectivas descrições das funções moleculares (GO) a estas relacionadas. ....	86
<b>Figura 32.</b> Contagem direta do número de sequências anotadas a partir dos genomas de <i>Comamonas</i> sp. (azul), <i>Delftia</i> sp. (magenta) e <i>Stenotrophomonas</i> sp. (verde) e as respectivas descrições dos componentes celulares (GO) a estas relacionadas.....	86
<b>Figura 33.</b> MDS plot do logFC calculado a partir da análise de expressão diferencial das culturas de <i>Comamonas</i> sp. e as respectivas réplicas biológicas na presença de polietileno (azul) ou glicose (violeta) como única fonte de carbono, ou na ausência de fontes de carbono (vermelho). .....	90
<b>Figura 34.</b> MDS plot do logFC calculado a partir da análise de expressão diferencial das culturas de <i>Delftia</i> sp. e as respectivas réplicas biológicas na presença de polietileno (azul) ou glicose (violeta) como única fonte de carbono, ou na ausência de fontes de carbono (vermelho). .....	90
<b>Figura 35.</b> MDS plot do logFC calculado a partir da análise de expressão diferencial das culturas de <i>Stenotrophomonas</i> sp. e as respectivas réplicas biológicas na presença de polietileno (azul) ou glicose (violeta) como única fonte de carbono, ou na ausência de fontes de carbono (vermelho).....	91
<b>Figura 36.</b> Métricas gerais da análise de expressão diferencial par a par entre culturas de <i>Comamonas</i> sp. sem carbono ou contendo PE (CPE), culturas contendo glicose ou PE (GPE) e culturas sem carbono ou contendo glicose (CG). MA plot (à esquerda) do logCPM em função do logFC representando valores de FDR acima (grafite) ou abaixo (vermelho) do <i>cutoff</i> de 0,25 e volcano plot (à direita) do logFC em função do $-\log_{10}(\text{FDR})$ representando os valores de FDR < 0,25 acima (verde) e abaixo do <i>threshold</i> logFC > 0,01 (vermelho), além dos valores de FDR > 0,25 (grafite). Pontos vermelhos no MA plot representam	

genes cuja expressão foi considerada alterada em função do estímulo (fonte de carbono). No volcano plot, pontos vermelhos representam os genes considerados superexpressos nas culturas contendo PE (superior e centro) ou glicose (inferior) e pontos verdes os superexpressos em função da ausência de carbono (superior) ou da presença de glicose (centro e inferior).  
 .....92

**Figura 37.** Métricas gerais da análise de expressão diferencial par a par entre culturas de *Delftia sp.* sem carbono ou contendo PE (CPE), culturas contendo glicose ou PE (GPE) e culturas sem carbono ou contendo glicose (CG). MA plot (à esquerda) do logCPM em função do logFC representando valores de FDR acima (grafite) ou abaixo (vermelho) do *cutoff* de 0,25 e volcano plot (à direita) do logFC em função do  $-\log_{10}(\text{FDR})$  representando os valores de FDR < 0,25 acima (verde) e abaixo do *threshold* logFC > 0,01 (vermelho), além dos valores de FDR > 0,25 (grafite). Pontos vermelhos no MA plot representam genes cuja expressão foi considerada alterada em função do estímulo (fonte de carbono). No volcano plot, pontos vermelhos representam os genes considerados superexpressos nas culturas contendo PE (superior e centro) ou glicose (inferior) e pontos verdes os superexpressos em função da ausência de carbono (superior) ou da presença de glicose (centro e inferior).  
 .....93

**Figura 38.** Métricas gerais da análise de expressão diferencial par a par entre culturas de *Stenotrophomonas sp.* sem carbono ou contendo PE (CPE), culturas contendo glicose ou PE (GPE) e culturas sem carbono ou contendo glicose (CG). MA plot (à esquerda) do logCPM em função do logFC representando valores de FDR acima (grafite) ou abaixo (vermelho) do *cutoff* de 0,25 e volcano plot (à direita) do logFC em função do  $-\log_{10}(\text{FDR})$  representando os valores de FDR < 0,25 acima (verde) e abaixo do *threshold* logFC > 0,01 (vermelho), além dos valores de FDR > 0,25 (grafite). Pontos vermelhos no MA plot representam genes cuja expressão foi considerada alterada em função do estímulo (fonte de carbono). No volcano plot, pontos vermelhos representam os genes considerados superexpressos nas culturas contendo PE (superior e centro) ou glicose (inferior) e pontos verdes os superexpressos em função da ausência de carbono (superior) ou da presença de glicose (centro e inferior).  
 .....94

**Figura 39.** Heatmap da expressão de genes que codificam oxidoredutases extracelulares em *Comamonas sp.* (63), *Delftia sp.* (138) e *Stenotrophomonas sp.* (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).  
 .....96

- Figura 40.** Heatmap da expressão de genes envolvidos no equilíbrio redox em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE). .....98
- Figura 41.** (Esquerda) Heatmap da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em *Comamonas* sp. (63) e *Delftia* sp. (138). (Direita) Heatmap da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE). .....98
- Figura 42.** Heatmap da expressão de genes codificadores de hidrolases extracelulares em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE). .....99
- Figura 43.** Heatmap da expressão de alguns genes que codificam proteínas transmembrana em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE). ..... 100
- Figura 44.** Heatmap da expressão de alguns dos genes que codificam as principais proteínas transportadoras em *Comamonas* sp. (63). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE). ..... 101
- Figura 45.** Heatmap da expressão de alguns dos genes que codificam as principais proteínas transportadoras em *Delftia* sp. (138). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE). ..... 102



<b>Figura 46.</b> Heatmap da expressão de alguns dos genes que codificam as principais proteínas transportadoras em <i>Stenotrophomonas</i> sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).....	103
<b>Figura 47.</b> Heatmap da expressão de alguns genes que codificam oxidoredutases intracelulares em <i>Comamonas</i> sp. (63), <i>Delftia</i> sp. (138) e <i>Stenotrophomonas</i> sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).....	105
<b>Figura 48.</b> Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de <i>Comamonas</i> sp. contendo PE em contraste a culturas em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial. Não foram encontradas funções enriquecidas nas culturas de PE em relação às contendo glicose.	107
<b>Figura 49.</b> Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de <i>Delftia</i> sp. contendo PE em contraste a culturas em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial.....	110
<b>Figura 50.</b> Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de <i>Delftia</i> sp. contendo PE em contraste a culturas contendo glicose obtidas a partir da análise de expressão diferencial.....	110
<b>Figura 51.</b> Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de <i>Stenotrophomonas</i> sp. contendo PE em contraste a culturas em limitação de carbono.....	112
<b>Figura 52.</b> Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de <i>Stenotrophomonas</i> sp. contendo PE em contraste a culturas contendo glicose obtidas a partir da análise de expressão diferencial. ....	113
<b>Figura 53.</b> Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de <i>Comamonas</i> sp. em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial. ....	114

- Figura 54.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Delftia* sp. em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial..... 115
- Figura 55.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Stenotrophomonas* sp. em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial. .... 116
- Figura 56.** Efeitos dos tratamentos biótico e abiótico nas propriedades físico-químicas do PE. O mecanismo de degradação inicia-se a partir da (i) formação de radical decorrente de input de energia ou de complexos de transferência de carga (CTC), que acarretam a (ii) formação de ligações cruzadas ou a (ii') oxidação inicial da molécula. Ambos os fatores bióticos e abióticos reduzem a hidrofobicidade e a massa molecular do PE, aumentando, portanto, a cristalinidade e a fluidez (relacionada ao comportamento viscoelástico do polímero) do material. No entanto, a degradação abiótica decorrente da reação Norrish tipo I aparenta induzir a formação de radicais, contribuindo para as subseqüentes ligações cruzadas que são formadas ao longo da molécula, o que aumenta a massa molecular média e, conseqüentemente, reduz a cristalinidade e a fluidez do polímero. Em um primeiro momento, esses microrganismos reduzem a massa molecular e a hidrofobicidade do material devido à fragmentação oxidativa induzida pela maquinaria metabólica destas. Isso favorece a subseqüente assimilação dos fragmentos produzidos a fim de suprir suas demandas energéticas. Como resultado da mineralização desses fragmentos, observa-se o aumento da massa molecular média e a diminuição da cristalinidade e fluidez do PE devido à maior concentração de moléculas maiores ao longo do material. .... 125
- Figura 57.** Mecanismo sugerido para a formação biótica de grupos nitro na molécula de PE induzida pelo metabolismo microbiano. Primeiramente a amônia é assimilada assistida por transportadores presentes nas membranas externa e plasmática da célula gram negativa e, em seguida, oxidada a nitrito, o que consiste na primeira etapa da nitrificação. Na denitrificação, o nitrito formado é então reduzido a NO. Adicionalmente, o no pode ser sintetizado a partir da L-arginina. Ressalta-se que essas reações são mediadas por catálise enzimática. Mecanismos de redução abiótica de nitrito também contribuem para a produção de NO (quimiodenitrificação). No meio extracelular, o NO, que se difunde livremente pelas membranas microbianas, é oxidado ao radical NO<sub>2</sub>, que ataca o PE resultando na formação de grupos nitro..... 130
- Figura 58.** Mecanismo proposto para a modificação oxidativa extracelular de PE mediada por espécies reativas de nitrogênio (RNS). Cyt: citocromo, NR: nitrato redutase, Nir: nitrito redutase, AO: aldeído oxidase, XAO: xantina oxidase, NOS: óxido nítrico sintase. (\*) Reações mediadas por enzimas potenciais que não foram identificadas. Ressalta-se que *Delftia* sp. apresenta o maior

número de genes coficadores dessas enzimas expressos nas culturas com PE, seguida por *Comamonas* sp. Esses genes não foram observados no genoma anotado de *Stenotrophomonas* sp., com exceção de potenciais genes codificadores de enzimas contendo domínios funcionais similares. .... 141

**Figura 59.** Mapa metabólico do metabolismo de butanoato, obtido por meio do banco de dados KEGG, representando os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000). 144

**Figura 60.** Representação esquemática da assimilação microbiana de fragmentos derivados da oxidação extracelular do PE e das principais enzimas envolvidas na conversão intracelular destes a ácidos graxos (adaptado de Ji *et al*, 2013). .... 148

**Figura 61.** Mapa metabólico da degradação de ácidos graxos, obtido por meio do banco de dados KEGG *pathway maps*, representando-se em cores os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000). .... 149

**Figura 62.** Mapa metabólico do ciclo do citrato, obtido por meio do banco de dados KEGG *pathway maps*, representando-se em cores os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000). .... 150

**Figura 63.** Mapa metabólico da fosforilação oxidativa (cadeia respiratória), obtido por meio do banco de dados KEGG, representando os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000). .... 151

**Figura 64.** Mapa metabólico do metabolismo de nitrogênio, obtido por meio do banco de dados KEGG, representando os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE. Genes não confirmados porém potencialmente presentes e expressos estão destacados (\*) para cada organismo (*Comamonas* sp. em azul, *Delftia* sp. em magenta e *Stenotrophomonas* sp. em verde). *EC numbers* presentes apenas nas culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. estão preenchidos em cinza. O círculo vermelho representa a fonte de nitrogênio disponível nas culturas. Ademais, a produção de nitrito e óxido nítrico foi confirmada experimentalmente bem como a ausência da produção significativa de nitrato (Kanehisa & Goto, 2000). .... 153

**Figura 65.** Mecanismo proposto para o metabolismo de PE por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. O processo inicia-se pela fragmentação oxidativa extracelular do PE mediada por oxidoredutases secretadas (Oxi) e por espécies reativas

de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Adicionalmente, hidrolases (Hyd) extracelulares podem catalisar outras fragmentações nos alcanos previamente oxidados (R-Oxi). Alcanos de massa molecular reduzida e/ou oxidados são assimilados por meio de proteínas transportadoras e porinas. No meio intracelular, esses fragmentos são submetidos a sucessivas reações oxidativas resultando na síntese de ácidos graxos. Estes são oxidados por meio da  $\beta$ -oxidação produzindo acetil-CoA, intermediário do ciclo do citrato e do metabolismo de butanoato, o qual acarreta a síntese de poliésteres de reserva. O NADH produzido no ciclo do citrato intermediará a síntese de ATP a partir da fosforilação oxidativa catalisada pelas enzimas da cadeia respiratória. Estas, por sua vez, juntamente com as enzimas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, à síntese de NO e à atividade redox intracelular, acarretam a formação de diversas ROS e RNS, retroalimentando o processo degradativo. .... 154

**Figura 66.** Resumo geral das categorias de genes superexpressos nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. contendo PE como única fonte de carbono e energia. As análises da expressão diferencial nessas culturas revelaram evidências de viabilidade celular, replicação celular e atividade metabólica, bem como de adesão e formação de biofilmes, potencial reconhecimento do PE como substrato e produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS/RNS). Também observou-se a superexpressão dos genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, a transportadores, à síntese e degradação de ácidos graxos, à síntese e degradação de metabólitos secundários e à degradação de compostos aromáticos. .... 158

---

<b>Tabela 1.</b> Reagentes constituintes do meio de cultura mínimo mineral (MMM) e suas respectivas concentrações. ....	43
<b>Tabela 2.</b> Reagentes constituintes do meio Nutrient Broth (NB) e suas respectivas concentrações. ....	44
<b>Tabela 3.</b> Índices referentes às principais modificações químicas observadas nos filmes de PE submetidos ou não a tratamentos bióticos e abióticos. ....	60
<b>Tabela 4.</b> Relatório do sequenciamento dos DNAs totais de <i>Comamonas sp.</i> , <i>Delftia sp.</i> e <i>Stenotrophomonas sp.</i> pelo sistema Miseq (2 x 300 bp paired-end) da plataforma Illumina. ....	79
<b>Tabela 5.</b> Características gerais dos genomas de <i>Comamonas sp.</i> , <i>Delftia sp.</i> e <i>Stenotrophomonas sp.</i> após montagem dos reads e anotação das ORFs. ....	81
<b>Tabela 6.</b> Relatório do sequenciamento dos RNAs totais (RNA-seq) de <i>Comamonas sp.</i> (63), <i>Delftia sp.</i> (138) e <i>Stenotrophomonas sp.</i> (591) pelo sistema Hiseq 4000 (2 x 100 bp paired-end) da plataforma Illumina. ....	87

---

---

O polietileno (PE) é o polímero sintético mais amplamente utilizado, cuja produção mundial atinge cerca de 150 milhões de toneladas por ano. Como consequência de suas características físico-químicas, o PE é extremamente recalcitrante e resistente ao ataque microbiano, sendo necessários mais de 100 anos para que se decomponha em ambientes naturais. Em virtude da ausência de estratégias eficientes para a gestão dos plásticos pós-consumo, esses materiais inertes acumulam-se nos ecossistemas acarretando dramáticas consequências à sociedade e aos ambientes naturais. Diante do crescente problema imposto pela alta produção desses materiais, foram isoladas a partir de debrís plásticos descartados no solo do Cerrado 9 bactérias pertencentes aos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* capazes de degradar PE de altíssima massa molecular sem a necessidade de pré-tratamentos. Esses isolados apresentaram notáveis atividade metabólica e viabilidade celular após 90 dias de incubação na presença de PE como única fonte de carbono e energia, o que indica que estes são capazes de prosperar por longos períodos expostos a essa condição. As alterações das características físico-químicas e estruturais do PE induzidas pela biodegradação, como composição química, cristalinidade, viscoelasticidade, massa molecular e topografia, foram inferidas por meio do uso de diferentes técnicas espectroscópicas e microscópicas. O perfil químico do PE biodegradado aliado às análises em nível genômico e transcritômico indicam que esses isolados empregam na fragmentação oxidativa desse polímero estratégias metabólicas nunca antes descritas, além do potencial envolvimento de oxidoredutases extracelulares nesta. Uma dessas estratégias é a modificação oxidativa do polímero mediada pela produção biótica de óxido nítrico. Ademais, foram identificadas mais de 15 oxidases potencialmente participantes desse processo degradativo. Até o nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que caracteriza o metabolismo completo de PE em nível celular, o qual foi realizado a partir da integração de abordagens experimentais, genômicas e transcritômicas. O estudo detalhado do metabolismo de PE possibilita a compreensão dos mecanismos moleculares que atuam na biodegradação em nível celular, o que emerge como condição fundamental para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis com aplicações práticas na gestão dos resíduos plásticos e na descontaminação dos ambientes naturais, visando à proteção e restauração dos ecossistemas.

Palavras-chave: biodegradação, polietileno, plástico, *Comamonas*, *Delftia*, *Stenotrophomonas*

Polyethylene (PE) is the most utilized synthetic polymer with a global production that exceeds 150 million tons/year. As a consequence of its physicochemical properties, PE-based materials are extremely recalcitrant and inert requires over 100 years to decompose under natural conditions. In an attempt to address this important global issue, we have isolated from the Brazilian Cerrado soil nine novel bacterial strains of *Comamonas*, *Delftia* and *Stenotrophomonas* capable of degrading unpretreated PE of very high molecular weight (191.000). These bacterial strains showed metabolic activity and cellular viability after a 90-day incubation with PE as the sole carbon and energy source, indicating that they can thrive for long periods under such conditions. Changes in PE chemical composition, crystallinity, viscoelasticity, molecular weight and topography induced by these microbes were assessed by different spectroscopic and microscopic approaches. Intriguingly, the biodegraded PE chemical fingerprint, together with genomic and transcriptomic analysis, indicated not only the reported participation of extracellular oxidoreductases in the oxidative fragmentation of this polymer, but also the involvement of yet undescribed biochemical strategies to cope with this process. One such strategy is the oxidation of the polymer, triggered by the biotic production of nitric oxide. Furthermore, we have identified over 15 extracellular oxidases that potentially participate in the biodegradation process. To the best of our knowledge, this is the first study characterizing the metabolism of high molecular weight PE at a cellular level following an integrated experimental, genomic and transcriptomic approach. The detailed study of PE metabolism increases the understanding of the molecular mechanisms underlying its biodegradation, which is critical for the development of sustainable strategies to address the plastic disposal issue and the recovery of harmed natural environments in order to preserve both human and wild lives.

*Keywords:* biodegradation, polyethylene, plastic, *Comamonas*, *Delftia*, *Stenotrophomonas*

---

---

## Polietileno: do desenvolvimento tecnológico ao impacto ambiental

---

O desenvolvimento de polímeros sintéticos surgiu como consequência inerente ao intenso crescimento industrial vivenciado em nível global durante os séculos XIX e XX. Até então, a base do sistema industrial estava consolidada na exploração de polímeros naturais, como a borracha, a madeira, o algodão, o marfim e o amido (Sperling, 2005), e dependia do plantio e da exploração dessas matérias-primas intrinsecamente limitadas por fatores ambientais. No entanto, com a Revolução Industrial, os polímeros naturais não foram suficientes para suprir a alta demanda da sociedade, sendo necessário contornar os problemas relacionados à escassez, alto custo e limitação da produção inerente à dependência de fontes naturais. Diante desse panorama, os esforços concentraram-se no desenvolvimento de materiais sintéticos versáteis, independentes de matérias-primas naturais e facilmente manipuláveis, que pudessem ser produzidos em larga escala com maior celeridade e por um baixo custo de fabricação.

Durante a primeira metade do século XX, diversos polímeros sintéticos foram desenvolvidos (**Figura 1**), como o poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(metacrilato de metila) (PMMA), poliestireno (PS), polietileno de alta e baixa densidade (PEAD e PEBD), poli(cloreto de vinilideno) (PVDC), poliamida (Nylon), poliuretano (PU), poli(tetraflúor-etileno) (Teflon), poli(tereftalato de etileno) (PET), polipropileno (PP), policarbonato (PC), copolímero de etileno e acetato de vinila (EVA), além do desenvolvimento das técnicas de moldagem que viabilizaram o uso desses polímeros para as mais diversas finalidades (Lopes, 2007). Dentre essa vasta gama de polímeros sintéticos comercialmente disponíveis, o polietileno (PE) destaca-se por ser o mais amplamente produzido e utilizado, cuja produção atinge cerca de 150 milhões de toneladas/ano, representando 40% da produção total de plásticos, demandando, assim, mais de 8% do petróleo mundial (Thompson *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009; Sivan, 2011).

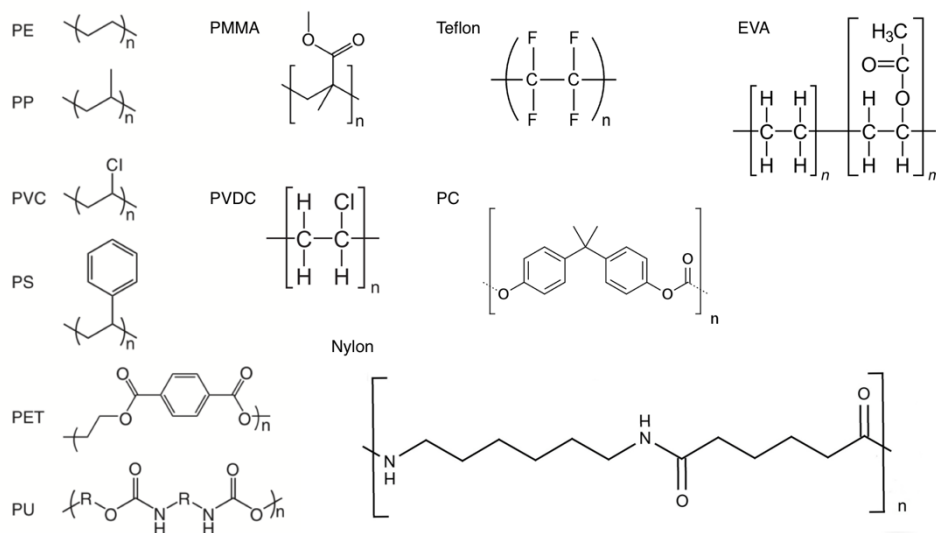
A expressiva predominância da utilização do PE em meio a tantos outros materiais poliméricos disponíveis decorre principalmente da grande versatilidade, resistência, durabilidade, estabilidade molecular e baixo custo a este associado, as quais

---

<sup>1</sup> Essa seção será publicada como artigo de revisão (*in preparation*).



constituem características fundamentais para possibilitar as mais diversas aplicações e uma intensa comercialização. Como consequência dessas características, virtualmente todos os produtos modernos são parcial ou integralmente constituídos por PE, a exemplo de embalagens de alimentos e de produtos de limpeza, sacolas plásticas, filmes plásticos, caixas d'água, brinquedos, equipamentos agroindustriais, equipamentos eletroeletrônicos, carros, tampas com lacre, baldes, peças com aplicações cirúrgicas/laboratoriais e plástico-bolha (Vona *et al.*, 1965).



**Figura 1.** Estrutura química dos principais polímeros sintéticos (adaptado de Wilkes & Aristilde, 2017). PE: polietileno, PP: polipropileno, PVC: policloreto de vinila, PS: poliestireno, PET: polietileno tereftalato, PU: poliuretano, PMMA: polimetacrilato de metila, PVDC: policloreto de vinilideno, PC: policarbonato, Nylon: poliamida, Teflon: politetrafluor etileno, EVA: polietilenovinila acetato.

Após seu desenvolvimento em 1933, o PE rapidamente consolidou-se como um dos materiais mais importantes nos âmbitos social, industrial e comercial, permitindo e favorecendo a grande e constante expansão tecnológica. Embora a importância do PE seja incontestável, as mesmas características que o tornam particularmente útil, como a resistência e a durabilidade, são também criticamente dicotômicas, acarretando consequências de proporções catastróficas. A alta persistência e recalcitrância do PE descartado resultam em problemas severos sob a perspectiva ambiental (Shimao, 2001), já que são necessários de 100 a 500 anos para sua decomposição em ambientes naturais. O problema é ainda potencializado pelo curto período de utilização da maioria

dos produtos à base de PE (e.g. embalagens e sacos plásticos), que são rapidamente descartados após cumprirem suas finalidades imediatas. Nesse contexto, as bilhões de toneladas de plásticos produzidos globalmente desde 1933 apresentam, atualmente, apenas quatro possíveis destinos: (i) deposição em aterros; (ii) incineração; (iii) reciclagem; ou (iv) descarte incorreto/indevido (Müller, 2005). No entanto, todas essas alternativas causam impacto ambiental em algum grau, gerando grande polêmica tanto na comunidade científica, como na sociedade em geral.

A principal estratégia de gestão dos plásticos pós-consumo é a (i) deposição em aterros, que se baseia na delimitação de áreas destinadas ao armazenamento permanente desses materiais. Sérias ameaças aos ecossistemas local e adjacentes emergem com o acúmulo desses materiais recalcitrantes nessas áreas, tendo em vista que estes podem preservar-se por mais de 100 anos. Como consequência, frequentemente são reportados múltiplos casos de bloqueio do sistema digestivo de diversos animais, como aves, peixes e mamíferos marinhos, pela ingestão de partículas plásticas (Spear *et al.*, 1995; Secchi *et al.*, 1999; Barnes *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009). Além disso, os aditivos utilizados na confecção desses materiais, a exemplo de corantes e antioxidantes, geram resíduos tóxicos e persistentes, sendo importantes contaminantes de solos e/ou águas da região e podendo, ainda, ser transportados a outras localidades por meio das águas pluviais (Kamal *et al.*, 1992; Williams, 1999; Perugini *et al.*, 2005; Teuten *et al.*, 2009). Sob uma perspectiva prática, o enfoque na sustentabilidade está aliado ao esgotamento de espaços físicos que suportem a exorbitante quantidade de plásticos pós-consumo, sendo imprescindível o desenvolvimento de métodos sustentáveis e efetivos na eliminação desses materiais.

Por sua vez, a técnica de (ii) incineração é empregada com a finalidade de promover a efetiva eliminação dos debrís plásticos, evitando, assim, a inutilização de grandes áreas para o armazenamento desses rejeitos, já que essa estratégia é capaz de reduzir cerca de 90-95% do volume do material. No entanto, em nível ecológico, esta consiste na estratégia mais nociva, acarretando graves consequências em escala local e global. Inúmeras substâncias tóxicas e carcinogênicas são liberadas a partir dos processos de incineração e combustão de plásticos, incluindo compostos aromáticos (benzeno, tolueno, xileno, estireno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), metais pesados, radicais livres, compostos de cloro, monóxido e dióxido de carbono, aldeídos, ácidos, cetonas, lactonas, hidrocarbonetos saturados, éteres cíclicos, ésteres cíclicos, alcenos e dienos (Hoff *et al.*, 1981; Hawley-Fedder *et al.*, 1984; Kaminsky *et al.*, 1996; Aracil *et al.*, 2005; Siddiqui *et al.*, 2009).

Visando à redução do impacto ambiental, a (iii) reciclagem consiste em um processo de grande complexidade que pode abranger tanto o simples processamento mecânico do material, como a recuperação da matéria-prima ou mesmo da energia contida

nos compostos das etapas iniciais (Figura 2). Apesar de, em teoria, ser uma opção viável, a reciclagem apresenta inúmeras desvantagens. A maioria dos materiais são constituídos por mais de um tipo de plástico, além de possuir resíduos, corantes, estabilizantes e outros aditivos, o que impede o seu simples reprocessamento mecânico. Por sua vez, a recuperação da matéria-prima consiste em um processo de alto custo que contrasta com o baixo custo da matéria-prima, sendo economicamente inviável e energeticamente custoso e redundante, já que a molécula é submetida ao processo de despolimerização para que seja novamente polimerizada (Hopewell *et al.*, 2009). Paralelamente, a recuperação energética demanda instalações de elevados custos, além de mão-de-obra altamente especializada para a operação dos equipamentos. Caso isso não seja respeitado, seus efeitos são os mesmos da incineração de plásticos. Esses fatos favorecem o uso de aterros e incineração em detrimento da reciclagem para a gestão dos plásticos pós-consumo, sendo esta o destino de apenas 7% do total dos materiais descartados.

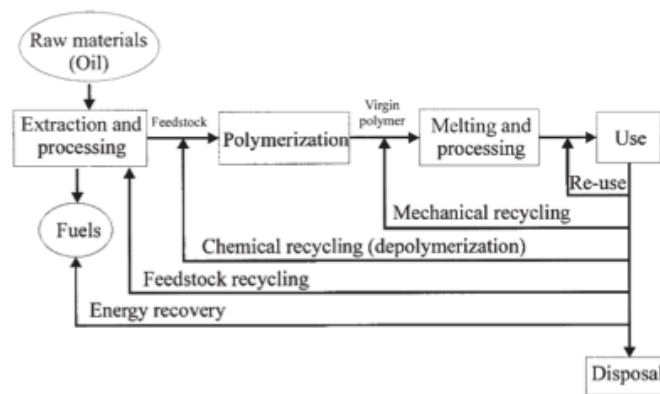
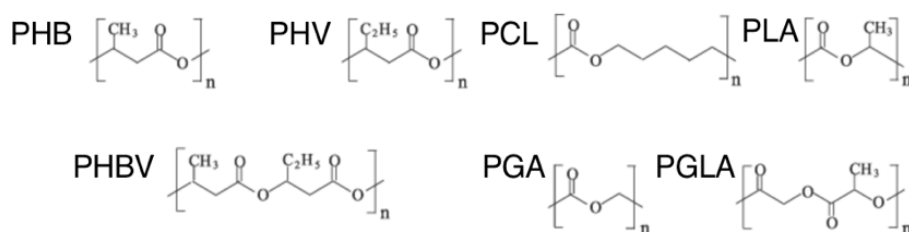


Figura 2. Ciclo de produção e reciclagem de plásticos (Clift, 1997; Perugini *et al.*, 2005)

No entanto, a grande maioria dos plásticos pós-consumo não chega a ser submetida a nenhuma dessas estratégias de gestão, sendo (iv) descartada indevidamente e acarretando sérias adversidades aos ambientes naturais (Zettler *et al.*, 2013). Tendo em vista que o PE foi desenvolvido em 1933 e que a decomposição deste demanda no mínimo 100 anos, em teoria, o primeiro material constituído desse polímero ainda permanece na biosfera. A questão é intensificada pela descontrolada produção e utilização desses materiais, que resulta em bilhões de toneladas de plásticos pós-consumo acumuladas nos ambientes. O acúmulo de plásticos nos ecossistemas terrestres e aquáticos é um problema dramático e adimensional que se mostra progressivamente mais frequente, sendo responsável por consequências irreversíveis e catastróficas aos solos, às águas e à vida silvestre e humana (Barnes *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2015). O descarte sem planejamento não apenas deve ser combatido, como também demandar projetos práticos voltados para a despoluição desses ambientes e para a restauração e recuperação das áreas afetadas.

Para mitigar as consequências prejudiciais aos ambientes decorrentes das estratégias de descarte dos plásticos, é imperativa a utilização de materiais biodegradáveis, cujas moléculas constituintes sejam passíveis da entrada direta nos ciclos biológicos (Chandra *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009; Ammala *et al.*, 2011). Alguns polímeros sintéticos, a exemplo do poliuretano e do poliéster, são constituídos por moléculas cujas cadeias carbônicas são fortemente hidrolisáveis, sendo, portanto, naturalmente biodegradáveis. Com base na susceptibilidade química molecular para sofrer quebras ou modificações em suas cadeias, uma vasta gama de polímeros sintéticos foi desenhada a fim de facilitar e promover os processos degradativos bióticos ou abióticos (Albertsson *et al.*, 1990; Augusta *et al.*, 1993; Kawai, 1995; Witt *et al.*, 1997). Esses polímeros incluem polilactídeos, policaprolactonas (PCL), poliésteres alifáticos ou polihidroxialcanoatos (PHA), polissacarídeos e copolímeros (e.g. polietileno intercalado por amido); além dos PHAs naturais sintetizados por plantas ou microrganismos, tais como poli(3-hidroxibutirato) (PHB), poli(2-hidroxivalerato) (PHV) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV) (**Figura 3**) (Griffin, 1973; Kanesawa *et al.*, 1989; Steinbuchel, 1992; Lee, 1996; Chandra *et al.*, 1998; Sudesh *et al.*, 2000; Ojumu *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2008). Outra proposta para o desenvolvimento de polímeros biodegradáveis é a introdução de grupos químicos reativos em sua composição, como grupos cromofóricos, polares ou compostos que promovam rearranjos estruturais. Estes contribuirão para a modificação das propriedades físico-químicas e estruturais do material no sentido de favorecer a degradação deste, quer seja por fatores bióticos, quer seja por abióticos (Albertsson *et al.*, 1990; Albertsson *et al.*, 1993).



**Figura 3.** Estrutura química de alguns poliésteres naturais (PHB, PHV, PHBV) e polímeros sintéticos biodegradáveis (PCL, PLA, PGA, PGLA). PHB: polihidroxibutirato, PHV: polihidroxivalerato, PHBV: poli(2-hidroxibutirato-co-valerato), PCL: policaprolactona, PLA: poli(ácido láctico), PGA: poli(ácido glicólico), PGLA: poli(ácido glicólico láctico) (Adaptado de Franchetti & Marconato, 2016).

Todavia, a substituição dos polímeros inertes e recalcitrantes atualmente utilizados por versões de polímeros sustentáveis não é suficiente para contornar os problemas já estabelecidos pelo uso desregrado desses materiais persistentes. Assim, o desenvolvimento de processos eficientes e de baixo custo que viabilizem a degradação sustentável dos polímeros inertes é imprescindível e fundamental. Nesse contexto de intenso impacto ambiental, a biodegradação emerge como alternativa sustentável e economicamente viável para reverter esse cenário atualmente vivenciado. Esse processo consiste no emprego do metabolismo microbiano para a decomposição desses compostos poliméricos, o que resulta na ciclagem do carbono por meio da oxidação completa dos compostos orgânicos e na produção de nova biomassa (mineralização) (Dommergues *et al.*, 1970).

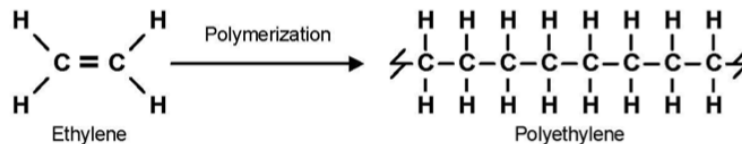
Entretanto, a biodegradação consiste em um complexo processo multifatorial composto por diversas etapas, sendo controverso conceituá-la de maneira resumida (Lucas *et al.*, 2008). Apesar disso, pode-se inferir a ocorrência de três grandes etapas interdependentes e consecutivas no processo biodegradativo. A (i) biodeterioração inicia esse processo, consistindo na fragmentação mecânica do material em decorrência do crescimento microbiano (Eggins H. O. W., 2001). Essa deterioração inicial aumenta a superfície de contato do material, desencadeando a (ii) biofragmentação em resposta ao maior acesso dos radicais livres e das enzimas oxidativas secretados pela comunidade microbiada e promovendo a oxidação e despolimerização da molécula em fragmentos de menor massa molecular. Estes, então, podem ser assimilados, ou seja, internalizados pela célula microbiana, a fim de que sejam metabolizados gerando energia, biomassa e uma vasta gama de produtos metabólicos. A (iii) mineralização consiste na oxidação total das moléculas assimiladas, tendo como principais produtos metabólicos o CO<sub>2</sub>, o N<sub>2</sub>, o CH<sub>4</sub> e a H<sub>2</sub>O (Lucas *et al.*, 2008).

A triagem de microrganismos biodegradadores é uma etapa central do processo de biodegradação de plásticos possibilitando a seleção de maquinarias metabólicas capazes de mineralizar esses compostos recalcitrantes. Até o momento, um número limitado de microrganismos capazes de biodegradar polímeros sintéticos foi descrito, o que inclui *Brevibacillus borstelensis* (Hadad *et al.*, 2005), *Rhodococcus ruber* (Orr *et al.*, 2004), *Rhodococcus rhodochrous* (Bonhomme *et al.*, 2003), *Actinomyces sp.*, *Phanerochaete chrysosporium* (Orhan *et al.*, 2000), *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces badius*, *Streptomyces setonii* (Pometto *et al.*, 1992), *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus halodenitrificans* (Roy *et al.*, 2008), *Bacillus sphaericus* (Sudhakar *et al.*, 2008), *Bacillus brevis*, *Shewanella putrefaciens*, *Ralstonia basilensis*, *Delftia acidovorans* (Yoon *et al.*, 2012), *Kocuria palustris*, *Bacillus subtilis* (Harshvardhan *et al.*, 2013), *Enterobacter asburiae* (Yang *et al.*, 2014), *Pseudomonas fluorescens*, *Paenibacillus macerans*, *Rhanella aquatilis*, *Acinetobacter baumannii* (Nowak *et al.*, 2011), *Rhodococcus erythropolis* (Koutny *et al.*, 2009), *Microbacterium paraoxydans* (Rajandas *et al.*, 2012), *Penicillium simplicissimum* (Yamada-Onodera *et al.*, 2001),

*Penicillium funiculosum* (Nowak *et al.*, 2011), *Aspergillus glaucus* (Shimao, 2001; Usha *et al.*, 2011), além de alguns candidatos dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Saccharomonospora*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Moxarella*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Chelatococcus*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, *Mucor*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Orhan *et al.*, 2000; Shimao, 2001; Hadad *et al.*, 2005; Sudhakar *et al.*, 2008; Koutny *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2010; Nowak *et al.*, 2011; Harshvardhan *et al.*, 2013; Jeon *et al.*, 2013; Tribedi *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Abraham *et al.*, 2017; Pramila & Ramesh, 2017; Ojha *et al.*, 2017). Alguns consórcios microbianos foram descritos por estarem envolvidos na biodegradação de PE acarretando a redução da massa e a modificação química deste (Skariyachan *et al.*, 2017; Skariyachan *et al.*, 2018). Recentemente, também foram descritas microalgas classificadas como *Anabaena spiroides* colonizadoras de debris plásticos relacionadas à indução da deterioração e da redução da massa do PE (Kumar *et al.*, 2017). Entretanto, mesmo após décadas de pesquisa, apenas dois microrganismos – *Enterobacter asburiae* YT1 e *Bacillus* sp. YP1 – foram capazes de degradar PE de 88.200 g.mol<sup>-1</sup> sem aditivos ou pré-tratamentos (Yang *et al.*, 2014). Dentre os pré-tratamentos mais utilizados estão a degradação mecânica, a fotodegradação (e.g. UV ou gama), a termodegradação e a quimiodegradação (Lucas *et al.*, 2008).

Os processos degradativos são desencadeados mediante a adesão microbiana à superfície do material. Tendo em vista a elevada hidrofobicidade dos polímeros inertes, em especial a do PE, as células microbianas podem, até mesmo, modular sua hidrofobicidade superficial a fim de favorecer a adesão ao substrato (Sakharovskii *et al.*, 1999; Sanin *et al.*, 2003). Uma vez aderidos, os microrganismos biodegradadores secretam uma vasta gama de enzimas e moléculas auxiliares que efetivamente atuarão nesses processos. O objetivo de vários estudos incorre, justamente, na identificação e caracterização de enzimas capazes de catalisar a modificação química e estrutural do PE, a exemplo de peroxidases (Iiyoshi *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2004; Wei & Zimmermann, 2017), lacases (Santo *et al.*, 2013; Wei & Zimmermann, 2017), alceno hidroxilases (Belhaj *et al.*, 2002; Saadoun *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2012; Wei & Zimmermann, 2017), além de outras classes de oxidoredutases e despolimerases (Shah *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2016).

O PE é um alcano sintetizado a partir da polimerização por adição de  $n$  monômeros de etileno (Figura 4), sendo, então, categorizado como polímero termoplástico (Alauddin *et al.*, 1995). Os termoplásticos apresentam longas cadeias carbônicas apolares linearmente estruturadas, nas quais segmentos de cadeia adjacentes interagem por meio de interações fracas do tipo van der Waals (Figura 5). Com isso, considerando-se também a ausência de ligações cruzadas no esqueleto carbônico do PE, esse polímero é dotado de maior maleabilidade, podendo ser repetidamente aquecido e resfriado sem que haja perda significativa das suas propriedades fundamentais, apenas alterando sua viscosidade pela desestabilização da sua estrutura tridimensional por meio da ação do calor (Alauddin *et al.*, 1995).



**Figura 4.** Representação química do polietileno, sintetizado a partir da polimerização de  $n$  monômeros de etileno. (Em: <[http://www.coleparmer.com/assets/techinfo/images/Zeus\\_Chem\\_Resistance\\_img\\_2.jpg](http://www.coleparmer.com/assets/techinfo/images/Zeus_Chem_Resistance_img_2.jpg)>. Acesso em: 15 de outubro de 2013).

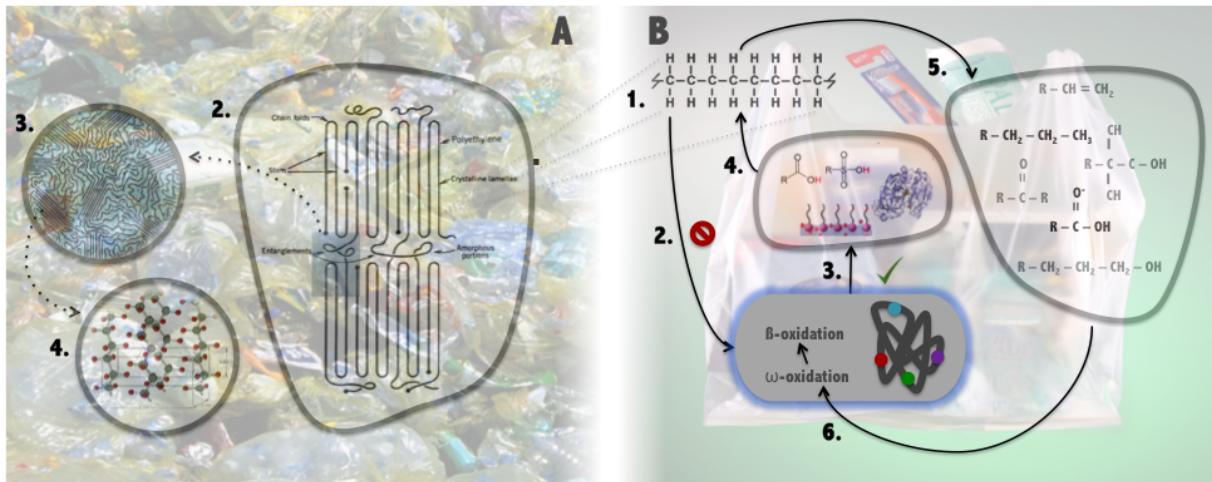
A resistência do PE ao ataque microbiano é justificada pelas características físico-químicas deste (Hueck, 1974; Albertsson *et al.*, 1990; Ohtake *et al.*, 1998). O PE apresenta altíssima massa molecular, que varia de 28.000 a 280.000 g.mol<sup>-1</sup>, distribuída entre as 1.000–10.000 repetições monoméricas constituintes de sua cadeia carbônica (New Zeland Institute of Chemistry, em: <<http://nzic.org.nz/ChemProcesses/polymers/10J.pdf>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2016). Desse modo, essa molécula excede o limite para assimilação de compostos por parte da célula microbiana, que é de apenas 500 g.mol<sup>-1</sup>, impondo uma importante barreira física para a ocorrência da biodegradação (Potts *et al.*, 1972). Ademais, o PE, cuja cadeia carbônica é totalmente reduzida, apresenta elevada hidrofobicidade, que, além de contribuir para a maior compactação da molécula, contrasta com a hidroflicidade superficial das enzimas sintetizadas pelos microrganismos, impedindo a formação do complexo enzima-substrato. Moléculas que apresentam esse conjunto de características físico-químicas e estruturais são extremamente incomuns na natureza e, em adição a

isso, ressalta-se a introdução recente do PE nos ambientes naturais. Como consequência, ainda não existem enzimas de ocorrência natural especializadas na degradação desses polímeros, sendo necessária a prospecção de enzimas que também apresentem afinidade por estes e sejam capazes de catalisar reações que envolvam quebras de ligações ou oxidações dessas moléculas de tão baixa reatividade (Andrady, 1994; Koutny et al., 2006; Mueller, 2006).

Adicionalmente, a estrutura tridimensional do longo esqueleto carbônico do PE é estabilizada por interações fracas de mesmo comprimento entre os segmentos de cadeia constituintes desse homopolímero, as quais são decorrentes da presença de grupos laterais de pequeno volume (H) ao longo de toda a sua estrutura. A consequência estrutural dessas interações de van der Waals é a formação de dobras de cadeia, que permitem a interação entre diferentes porções do material e resultam na ocorrência de arranjos estruturais bem definidos caracterizando a ocorrência de regiões cristalizadas (altamente ordenadas), regiões de interfase e regiões amorfas (desordenadas) (**Figura 5A**), o que configurando o PE como um polímero semicristalino (Sperling, 2005). Estruturas cristalizadas (fase cristalina ortorrômbica) são particularmente estáveis e compactadas, sendo, portanto, significativamente inacessíveis às enzimas microbianas em escala atômica, e, por outro lado, as regiões amorfas (fase desordenada anisotrópica) são constituídas por segmentos moleculares relativamente inflexíveis, dificultando a adequação destes aos sítios ativos das enzimas. Em contraste, as regiões de interfase (fase amorfa isotrópica) congregam características que as fazem mais susceptíveis ao ataque enzimático, sediando, assim, o início da biodegradação (Rull *et al.*, 1993).

Microrganismos e/ou moléculas que consigam transpor tantas barreiras moleculares para concretizar esses fenômenos degradativos aparentam ser profundamente raros. Entretanto, os microrganismos compreendem mais de 60% da biomassa mundial (Fraser *et al.*, 2000), sendo probabilisticamente razoável assumir que o fenótipo de biodegradação de plásticos possa ser mais frequente do que o esperado. De fato, o número, embora ainda limitado, de microrganismos descritos para esse processo gradativamente agrega mais candidatos, embora a eficiência degradativa destes varie drasticamente. Quanto maior e mais abrangente a complexidade de fatores bióticos e abióticos que module a microbiota de ambientes colonizados por microrganismos, espera-se uma maior diversidade de genes e de reações a estes relacionadas em função dos múltiplos fatores de seleção atuantes sobre essa comunidade microbiana. Assim, acredita-se que ambientes dotados de grande riqueza e diversidade microbianas se classifiquem como promissoras fontes de microrganismos biodegradadores de uma vasta gama de substratos. Ademais, análises de *clusters* de genes envolvidos no fenótipo de biodegradação de plásticos sugerem que ambientes enriquecidos com esses materiais favorecem a seleção de bactérias que possam ter obtido os genes necessários ao processo por transferência lateral (Yoshida *et al.*, 2016).





**Figura 5.** Estrutura química (B1) e morfologia (A) do PE. O longo e hidrofóbico esqueleto carbônico do PE desencadeia a ocorrência de dobras de cadeia (A2), acarretando padrões morfológicos específicos: regiões cristalizadas, amorfas e de interfase (A3, A4). (Direita) Resposta metabólica à presença de PE como única fonte de carbono e energia e os efeitos desta na estrutura e composição química do polímero: a alta massa molecular do PE impede que este seja assimilado (B2), o que induz a expressão de genes de limitação de carbono e de adesão (B3), permitindo também a atuação de enzimas (globulares ou proteínas de membrana) e outras moléculas auxiliares (B4) que irão modificar a estrutura química do PE gerando produtos oxidados e/ou de massa molecular reduzida (B5) que serão assimilados e completamente oxidados pela  $\omega$ -oxidação e  $\beta$ -oxidação (B6) no ambiente intracelular.

### Mecanismo da biodegradação de PE

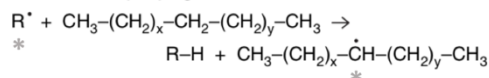
Em decorrência da alta massa molecular e hidrofobicidade do PE, a fragmentação e a oxidação deste emergem como etapas limitantes para a ocorrência da biodegradação (Albertsson *et al.*, 1987; Albertsson *et al.*, 1990; Kamal *et al.*, 1992; Shah *et al.*, 2008). Essas reações geram produtos de hidrofobicidade e massa molecular reduzidas, menos compactados e mais flexíveis, que finalmente possam ser assimilados e mineralizados no meio intracelular por meio da  $\omega$  ou  $\beta$ -oxidação (Figura 5B) (Albertsson *et al.*, 1987; Albertsson *et al.*, 1988). O rompimento de uma ligação covalente pode caracterizar-se como uma quebra homolítica, a qual resulta em radicais livres, ou uma quebra heterolítica, gerando um cátion (e.g. carbocátion) e um ânion (e.g. carbânion). Ligações entre átomos de carbono (C) em um ambiente molecular homogêneo (e.g. alcanos) que carece de grupos indutores (i.e. grupos que atraem ou repelem elétrons) tendem a serem rompidas pelo mecanismo de quebra homolítica. Esse mecanismo,

denominado ativação, engatilha o processo de degradação do PE e é crucial para a ocorrência deste (Figura 6) (Killops & Killops, 2013).

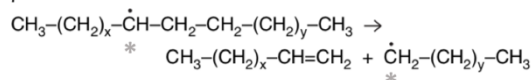
*chain-reaction initiation*



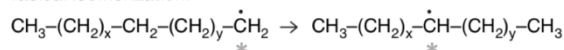
*chain-reaction propagation*



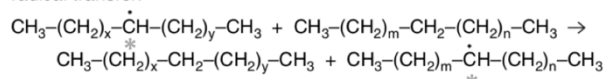
$\beta$ -scission:



radical isomerization:

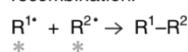


radical transfer:

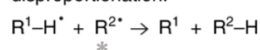


*chain-reaction termination*

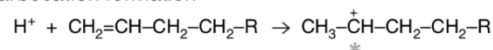
recombination:



disproportionation:



*carbocation formation*



**Figura 6.** Mecanismo da formação de radicais e carbocátions (carbocation formation) em n-alcanos, resultando na formação de espécies químicas susceptíveis a reações de oxidação (\*). A abstração de um átomo de H da cadeia polimérica resulta na formação de macroradicaís R• (chain-reaction initiation), que tanto pode reagir com grupos funcionais oxidados (e.g. O<sub>2</sub> e OH) como acarretar a formação de ligações cruzadas ou de insaturações. Esses macroradicaís reativos acarretam (chain-reaction propagation) a quebra de cadeia (scission), isomerização (radical isomerization) ou a transferência do radical a outros segmentos moleculares (radical transfer). Essa reação em cadeia encadeada pela formação de radicais é finalizada (chain-reaction termination) mediante a estabilização destes após a formação de ligações covalentes entre estes e outras moléculas (chain-reaction termination) (Adaptado de Killops & Killops, 2013).

A degradação desse polímero inicia-se a partir (i) da ativação desse polímero mediante a abstração de H• após a absorção de energia ou a formação de complexos de transferência de carga (CTC), apresentando como produtos macroradicaís (R•) e radicais de hidrogênio (H•) (Ogihara, 1963; Corrales *et al.*, 2002; Gugumus, 2002; Massey *et al.*, 2007; Gardette *et al.*, 2013). Essas espécies químicas são extremamente reativas, e sua formação inicial desencadeia tanto a (ii) ocorrência de ligações-cruzadas

ao longo da molécula polimérica, como a (ii') oxidação desta em resposta à subsequente exposição a agentes oxidantes ( $O_2$  atmosférico, água,  $NO_2$ ,  $O_3$ , etc). A oxidação pode resultar na formação de outras moléculas reativas que induzam a formação de novos radicais que possam (iii) reiniciar esse processo ou (iii') estabilizar-se, por exemplo, na forma de hidroxilas ( $-OH$ ), carbonilas ( $C=O$ ), vinilas ( $C=C$ ) ou nitrocompostos ( $-NO$ ) na molécula de PE (Ogihara, 1963; Albertsson *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1996; Szép *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Peixoto *et al.*, 2017). Essas modificações químicas e estruturais reduzem sistematicamente a massa molecular e a hidrofobicidade, possibilitando que a molécula se torne progressivamente susceptível ao metabolismo microbiano.

A adesão dos microrganismos ao polímero está relacionada às primeiras etapas da biodegradação, promovendo, inclusive, a degradação mecânica inicial do material por meio do crescimento microbiano em sua superfície, o que gradualmente expõe as porções mais internas do material ao posterior efeito de outros fatores degradativos (Kamal *et al.*, 1992; Orr *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2008). A formação de biofilmes consiste em uma etapa fundamental para o metabolismo de plásticos (Sivan, 2011) não apenas por propiciar o contato direto do microrganismos com o substrato, como também por concentrar na superfície polimérica moléculas com potencial degradativo, garantindo que os microrganismos aderidos acessem eficientemente os produtos formados a fim de satisfazer suas demandas energéticas e anabólicas (Peixoto *et al.*, 2017).

A biodegradação da parafina, alcano assimilável de baixa massa molecular com cerca de 10-20 carbonos (i.e. quimicamente semelhante ao PE), alavancou a investigação dos mecanismos microbianos que promovem esse processo na molécula de PE. Primeiramente, a parafina é oxidada a ácido carboxílico, que é submetido à  $\beta$ -oxidação. A cada ciclo desta, dois átomos de carbono são removidos do alcano oxidado e direcionados ao ciclo do ácido cítrico, gerando  $H_2O$  e  $CO_2$  como produtos finais (Albertsson *et al.*, 1987). Desse modo, acredita-se que o PE seja submetido a esse mesmo processo uma vez que este tenha sido reduzido a fragmentos passíveis de sofrer assimilação. No entanto, ainda não há mecanismos descritos para a biodegradação das diversas funções orgânicas possivelmente assumidas pelo PE nas etapas iniciais, sendo necessário desvendá-los individualmente para entender o modo pelo qual esses microrganismos diferenciados são capazes de utilizar uma fonte de carbono tão inerte. Até então, mecanismos descritos na literatura decorrem de estudos sobre a biodegradação de PE previamente submetido a pré-tratamentos abióticos, como a irradiação por UV, que favorecem a degradação por acarretarem a redução da massa molecular e da hidrofobicidade, e muito pouco se conhece acerca do processo de biodegradação dos materiais não tratados e que não contenham aditivos e dos mecanismos metabólicos nesta empregados. Portanto, o metabolismo de plásticos é uma das questões ainda não compreendidas, dotado de potencial para encadear transformações práticas drásticas nos ambientes urbanos e naturais, impactando diretamente a qualidade de vida humana e silvestre.

A indução do microrganismo à utilização de fontes de carbono e energia inertes, que demandam tempo e estratégias metabólicas complexas, fundamentalmente exige a ausência de fontes de carbono ótimas e de fácil assimilação (e.g. glicose). Nesse sentido, os efeitos da limitação de carbono (i.e. *carbon starvation*) são centrais e limitantes para a biodegradação de PE, atuando não apenas na indução do processo, como também no favorecimento deste (Kolter *et al.*, 1993). Os efeitos da limitação de carbono diferem drasticamente entre bactérias gram positivas e gram negativas. Diante dessa condição, gram positivas tendem a interromper seu metabolismo por meio da ativação de um estado de dormência – esporulação – que é regulado principalmente pelo fator de transcrição Spo0A, que afeta a transcrição de mais de 500 genes. Em termos gerais, a limitação de fontes de carbono em gram positivas influencia tanto a transcrição e tradução de genes e proteínas envolvidos na resposta direta a esse estado, o que inclui o transporte e utilização de fontes de carbono alternativas, como também a transcrição de genes relacionados a condições sub-ótimas de crescimento, o que permite a implementação de estratégias microbianas de sobrevivência (e.g. motilidade e esporulação) (Jong *et al.*, 2012).

Em bactérias gram negativas, as quais não são esporulantes, a ausência de nutrientes centrais para o crescimento microbiano acarreta a interrupção da fase exponencial de crescimento e a subsequente entrada compulsória das células em fase estacionária. Apesar de não disporem de estratégias relativas a processos de esporulação, a limitação de carbono também acarreta nessas bactérias significativas alterações morfológicas e reduções da atividade metabólica. Embora não haja aumento de biomassa microbiana durante a ausência de carbono, as bactérias continuam a dividir-se a fim de tornar a célula mais compacta diante dessa limitação nutricional (Kolter *et al.*, 1993). Essa redução do volume celular acarreta o aumento da razão área/volume, maximizando o potencial microbiano para o transporte de eventuais nutrientes disponíveis e reduzindo o consumo energético intracelular (Sanin *et al.*, 2003).

No interior celular, o citoplasma torna-se condensado e o volume do periplasma aumenta, enquanto o envoltório celular responde ao estresse por meio da implementação de estratégias que visem à proteção e sobrevivência celular durante períodos de depleção nutricional. A fim de favorecer a adesão e agregação, que aumentarão as chances de sobrevivência bacteriana além de acarretarem economia de ATP gasto durante a atividade flagelar, ocorre o aumento da hidrofobicidade superficial em resposta à maior presença de moléculas de adesão à parede celular mais hidrofóbicas e da alteração na composição de ácidos graxos da

membrana plasmática, diminuindo a fluidez e flexibilidade estruturais da membrana (Kolter *et al.*, 1993). Além disso, observa-se o aumento da produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), o que indica maior formação de biofilmes nos períodos de limitação de carbono (Putthividhya *et al.*, 2016). Ainda, a limitação em glicose resulta em maior hidrofobicidade superficial e, conseqüentemente, maior ocorrência de adesão celular e formação de biofilmes (Wilkes & Aristildes, 2017). No entanto, observa-se a manutenção do total de proteínas relacionadas ao metabolismo central de carbono (e.g. glicólise) durante a limitação de carbono, confirmando o caráter constitutivo da expressão de genes a estas relacionados (Handtke *et al.*, 2018). A compactação do DNA genômico e plasmidial aumenta significativamente após a superexpressão de eventos que levam à síntese de proteínas *histonas-like*, com o objetivo de reduzir a taxa de transcrição celular e economizar a pouca energia disponível para aumentar a sobrevivência microbiana. Embora a viabilidade celular seja relativamente mantida em uma população de células em limitação de carbono, os genes envolvidos nas maquinarias de transcrição, tradução, divisão celular e metabolismo energético são fortemente reprimidos nessa condição (Ercan *et al.*, 2015). No geral, bactérias em limitações nutricionais tornam-se mais resistentes a estresses (e.g. choque térmico, osmótico ou oxidativo) do que quando em fase exponencial de crescimento, já que o objetivo desta é o crescimento microbiano e não a sobrevivência como no caso daquela (Kolter *et al.*, 1993).

Durante os estágios iniciais da limitação de carbono, os rRNAs (RNAs ribossomais) e grande parte das proteínas consideradas não-essenciais para a viabilidade microbiana são degradados com a finalidade de prover aminoácidos e energia para a maquinaria celular (Matin *et al.*, 1989). A proteólise fornece os aminoácidos para a biossíntese das proteínas necessárias para suprir os mecanismos de sobrevivência do microrganismo durante esse estímulo (Matin *et al.*, 1989; Handtke *et al.*, 2018). Após períodos prolongados de exposição a essa condição de estresse, a célula gram negativa se mantém em constante variação fisiológica. Em cada momento metabólico, a bactéria ativa um arcabouço específico e especializado de proteínas sintetizadas, mesmo que a taxa de síntese protéica absoluta seja inferior à de células em condições ótimas de crescimento (i.e. fase exponencial de crescimento) (Albertsson *et al.*, 1990; Zambrano *et al.*, 1993). A síntese de proteínas sofre redução progressiva ao longo do período de limitação, e desenvolve um papel fundamental no fenótipo de resistência ao estresse nutricional. Apesar de a síntese de proteínas relacionadas a essa resistência ocorrer principalmente durante as primeiras horas de limitação de carbono, a continuação da atividade destas garante a sobrevivência das células a longo prazo (Reeve *et al.*, 1984). Alguns genes são ainda descritos por relacionarem-se à longevidade celular a longo-prazo, a exemplo dos genes envolvidos com o reparo do DNA, modificação de tRNAs e fidelidade da síntese proteica, e são genes amplamente conservados em bactérias (Pechter *et al.*, 2017).

Finalmente, a resposta à presença de carbono nas culturas de células em limitação nutricional ocorre quase instantaneamente, já que as células mantêm e priorizam seus sistemas de reconhecimento e assimilação de nutrientes durante esse estágio de estresse para viabilizar essa resposta imediata, a qual pode ser intermediada pela preservação de RNAs de longa-duração – transcritos estáveis por mascaramento funcional ou proteção física do mRNA (e.g. interação dos mRNAs com proteínas ou RNAs repressores) (Kolter *et al.*, 1993; Ananchenko, 2013; Ercan *et al.*, 2015). Dentre esses sistemas de reconhecimento e assimilação estão o aumento da concentração de enzimas especializadas na ligação a substratos em conjunto ao transporte de alta afinidade para estes, além da possibilidade de desenvolverem novas estratégias para a obtenção do macronutriente em escassez por meio de fenótipos GASP (Matin *et al.*, 1989; Kolter *et al.*, 1993). Nessas condições extremas, a utilização do PE como fonte de carbono é favorecida e a célula microbiana pode, então, reconhecer o grande potencial nutricional neste encriptado, investindo suas estratégias metabólicas na conversão desse polímero a fragmentos assimiláveis em prol da manutenção da viabilidade celular microbiana.

## Metabolismo de polímeros sintéticos

---

Considerando-se a estabilidade química e estrutural dos polímeros sintéticos, o metabolismo destes pode ser subdividido, em linhas gerais, em duas etapas. A primeira etapa desse mecanismo degradativo é necessariamente a redução da massa molecular e, no caso de polímeros de cadeia carbônica reduzida (e.g. polietileno), a oxidação do material. Essas modificações iniciais ocorrem no ambiente extracelular e são mediadas por espécies químicas reativas (e.g. radicais), catálise química (e.g. metais) ou catálise enzimática (e.g. lacase). Além disso, em amostras ambientais, fatores abióticos como radiação UV e IV influenciam significativamente esse processo, promovendo a quebra e oxidação dos polímeros em fragmentos heterogêneos de tamanhos e níveis de oxidação variados em processos como foto ou termo oxidação, agregando mais um possível mecanismo de fragmentação polimérica (Albertsson *et al.*, 1987; Arda *et al.*, 2017). Esses eventos permitem a ocorrência da segunda etapa do metabolismo de polímeros sintéticos, a qual inicia-se com a assimilação dos fragmentos oxidados e segue até a completa oxidação destes a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O no ambiente intracelular.

Plásticos constituídos por grupos químicos hidrolisáveis, como o PET, o PVA e o PU, são mais propensos à degradação biótica, que, nesse caso, geralmente é mediada por hidrolases extracelulares (Yoshida *et al.*, 2016; Wilkes & Aristildes, 2017). Recentemente foram descritas duas hidrolases, PETase e MHETase, as quais apresentam similaridade a lipases e esterases, respectivamente, envolvidas na fragmentação de PET de baixa cristalização e do seu consequente produto de degradação, o MHET. Foi proposto que a PETase, que é secretada por *Ideonella sakaiensis*, promove a fragmentação extracelular do PET a MHET e ácido tereftálico (TPA). A MHETase, por sua vez, hidrolisa o MHET a etileno glicol e TPA, o qual é assimilado por meio de transportadores específicos e oxidado intracelularmente mediante a atividade de dioxigenases e desidrogenases (Yoshita *et al.*, 2016).

A hidrólise de grupos oxidados ocorre por meio do ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila, e é imperativo que haja essa diferença de eletronegatividade entre os átomos da ligação para a ocorrência do mecanismo de quebra por hidrólise (Wilkes & Aristildes, 2017). Diante da cadeia carbônica completamente reduzida do PE, afirma-se que é muito pouco provável que eventos hidrolíticos mezeiem a fragmentação extracelular deste. Desse modo, a fragmentação de polímeros sintéticos altamente hidrofóbicos e/ou reduzidos, como o PE e o PP, inicia-se pela introdução de grupos oxidados na molécula, o que permite, inclusive, a posterior atuação de hidrolases. A oxidação desses polímeros é mediada principalmente por enzimas da classe das oxidorreduções, enquanto a assimilação provavelmente envolve sistemas dedicados de transporte (Gravouil *et al.*, 2017). Nesse sentido, análises do transcrito de *Rhodococcus ruber* sugerem a existência de três potenciais gargalos metabólicos relacionados ao metabolismo PE de baixa massa molecular: oxidorreduções extracelulares, transportadores e oxidorreduções intracelulares. Uma vez superados esses gargalos, os fragmentos subsidiariam a síntese de ácidos graxos, os quais seriam degradados pela  $\beta$ -oxidação (Gravouil *et al.*, 2017).

A maioria dos estudos relacionados a metabolismo de polímeros sintéticos restringe-se aos processos extracelulares mediados por enzimas secretadas que acarretam a fragmentação do polímero, o que caracteriza, de fato, o principal gargalo metabólico do processo. Assim, o metabolismo intracelular permanece relativamente sub-explorado, já que os produtos de degradação não são explicitamente detectados (Wilkes & Aristildes, 2017). De modo geral, esses produtos de degradação, os quais variam muito em função do polímero sintético a partir do qual são gerados, são utilizados para a síntese de acetato e para a biossíntese de vários produtos em diversas vias metabólicas. A fragmentação do PS, por exemplo, gera vários compostos, como estireno, fenil álcool, tolueno e benzeno, os quais podem ser metabolizados nas vias relacionadas ao catabolismo de aromáticos (Wilkes & Aristildes, 2017). No caso do PU, a atuação de esterases culmina na produção de ácido adípico e butanodiol, que são metabolizadas por meio do ciclo do ácido cítrico (Shah *et al.*, 2013; Wilkes & Aristilde, 2017). A hidrólise do PET por cutinases,

lipases ou esterases extracelulares resulta na produção de etilenoglicol e ácido tereftálico (TPA), o qual é convertido intracelularmente a protocatecoato entrando no ciclo do ácido cítrico após a degradação deste também pela via de catabolismo de aromáticos. O PE, por sua vez, apresenta como produtos de fragmentação oxidativa cadeias carbônicas de diferentes níveis de oxidação, como alcanos, alcenos, álcoois, aldeídos, éteres, ésteres e ácidos carboxílicos. Apesar dessa heterogeneidade no que tange os possíveis produtos de degradação, é bem aceito que o metabolismo intracelular destes ocorra por meio da  $\beta$ -oxidação, similarmente ao mecanismo descrito para a degradação de n-alcanos como a parafina (Albertsson *et al.*, 1987; Gravouil *et al.*, 2017).

Em relação ao metabolismo de PE, apesar da identificação de vários candidatos em nível enzimático que possam participar ativamente do processo de degradação extracelular desse polímero, o potencial bacteriano para a realização do processo metabólico completo ainda permanece relativamente inestimado (Yang *et al.*, 2014; Peixoto *et al.*, 2017). Isso decorre da usual necessidade de pré-tratamentos abióticos e da descrição de enzimas com atuação pontual apenas em determinadas etapas dos processos de fragmentação em relação aos biodegradadores até então identificados e investigados. Assim, a compreensão do processo degradativo de PE desenvolvido integralmente por microrganismos ainda não foi acessada, mesmo que partes desse processo possam ter sido descritas ou presumidas. Desse modo, acredita-se que a investigação de microrganismos e seus mecanismos capazes de efetivamente concretizar esse processo sem a necessidade de intermediários externos é de grande relevância tanto no contexto da pesquisa básica quanto da aplicada.

### *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp.: o potencial microbiano encriptado nos solos do Cerrado no contexto da biodegradação de polietileno

---

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, correspondendo a 24% do território do país, cuja localização situa-se na região central do Brasil. Esse bioma, classificado como um dos *hotspots* de biodiversidade mundial, apresenta vegetação savânica neotropical de composição florística variada e, com base na cobertura vegetal, pode ser categorizado em: Campo Sujo, Cerrado *sensu stricto*, Cerrado Denso e Mata de Galeria. Cada uma dessas vegetações típicas do Cerrado compreende particularidades em

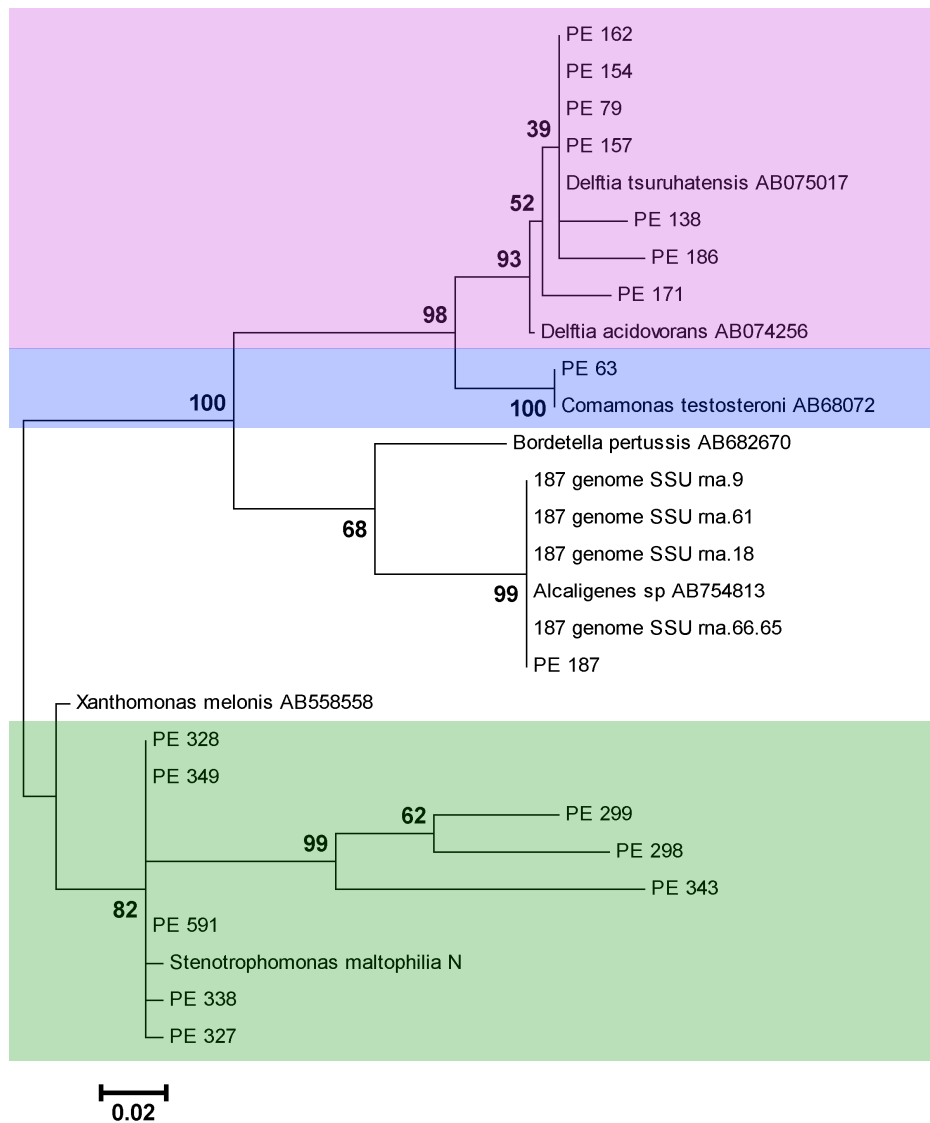


relação a fatores climáticos, topográficos e edáficos, abrangendo não apenas dinâmicas e estruturas de vegetação específicas, como também comunidades microbianas características (Oliveira *et al.*, 2002; Quirino *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2012).

Estudos sobre a identificação taxonômica e a classificação filogenética dos microrganismos colonizadores dos solos do Cerrado revelam uma colossal riqueza e diversidade microbianas (Araujo *et al.*, 2012). Assim, uma ampla variedade de rotas metabólicas envolvendo os mais diversos substratos e produtos é esperada como consequência direta dessa alta biodiversidade. De fato, debrís plásticos previamente coletados em solos do Cerrado na região da Chapada dos Veadeiros (Goiás, Brasil; **Figura 7**) apresentaram uma distinta comunidade microbiana especializada na degradação de hidrocarbonetos (Peixoto, 2013). Esses materiais coletados apresentavam evidências macroscópicas de degradação (e.g. furos, quebras, variação de cor e textura), sugerindo prévia atividade degradativa influenciada pela microbiota do solo onde esses debrís foram descartados. Assim, aproximadamente 700 microrganismos colonizadores desses debrís coletados foram primeiramente isolados e, com isso, nove estirpes biodegradadoras de PE dos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* foram isoladas, selecionadas e identificadas (**Figura 8**). Esses resultados revelam o grande potencial destas para a biodegradação de PE e, ainda, para a classificação destas como novas espécies bacterianas (Peixoto, 2013).



**Figura 7.** Região de coleta dos debrís plásticos colonizados por microrganismos provenientes da microbiota do solo do bioma Cerrado, caracterizada por sua grande biodiversidade.



**Figura 8.** Cladograma de similaridade da análise filogenética das sequências dos genes 16S rRNA dos isolados potencialmente degradadores de PE usando o método de máxima verossimilhança e sequências de referência do GenBank (Schloss et al., 2009). As sequências foram alinhadas e todas as posições contendo *gaps* foram eliminadas. O cladograma foi construído utilizando-se o programa MEGA6 com 100 réplicas de bootstrap. Ramificações correspondendo a partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas de bootstrap foram colapsadas. A estirpe “PE 187” não apresentou atividade biodegradativa de PE, mas foi incluída na análise filogenética por questões comparativas.

Os isolados microbianos foram inicialmente submetidos a etapas de triagem com base no fenótipo de degradação de óleo mineral, o qual é constituído por alcanos de baixa massa molecular e mesma natureza química do PE. Em seguida, dos 54

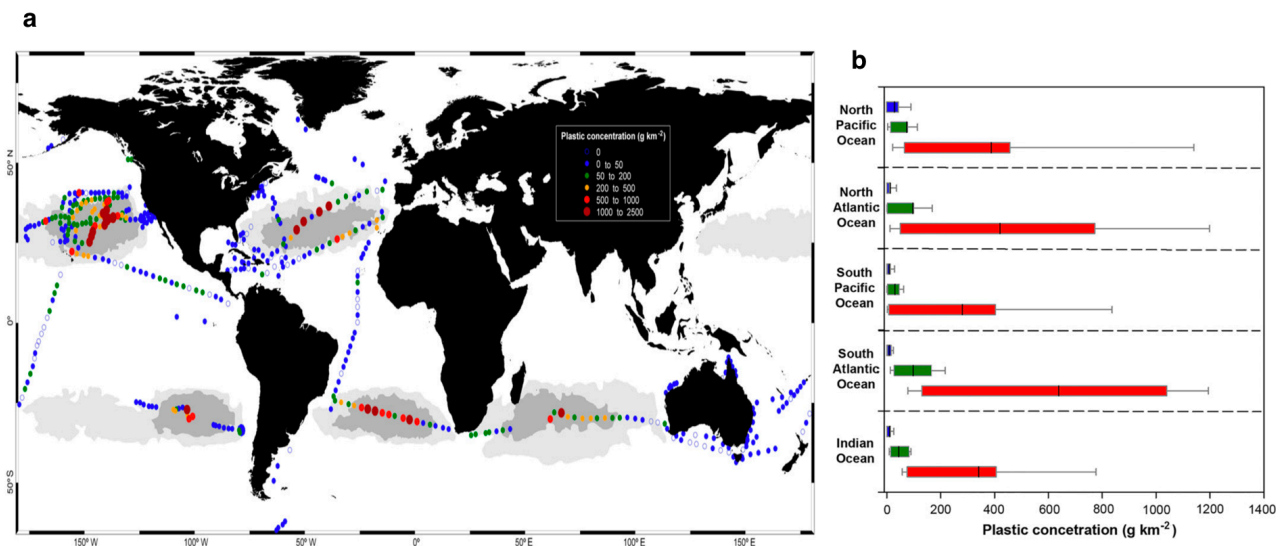
degradadores de óleo mineral identificados, 28 apresentaram atividade metabólica na presença de PE como única fonte de carbono, a qual foi inferida por meio da quantificação dos RNAs totais a partir de culturas incubadas por 12 dias. A presença de viabilidade celular foi detectada em 16 desses isolados em culturas contendo filmes de PE como única fonte de carbono. Então, esses 16 isolados foram novamente cultivados na presença de PE como única fonte de carbono e energia e, por meio de técnicas baseadas no uso de repórteres de viabilidade celular aliado à microscopia de fluorescência, foram, finalmente, selecionadas 9 bactérias com potencial para a biodegradação de PE (Peixoto, 2013).

---

As atuais estratégias de manejo dos plásticos pós-consumo são inefetivas e ineficientes, além de prejudicar extensiva e permanentemente os ecossistemas por meio da liberação de compostos tóxicos nos solos ou na atmosfera, os quais em sua maioria são classificados como gases estufa ou substâncias carcinogênicas. Esses contaminantes são emitidos por meio do processo de incineração dos plásticos ou advindos de aditivos (e.g. corantes e antioxidantes) a estes comumente adicionados (Kamal *et al.*, 1992; Williams, 1999; Perugini *et al.*, 2005; Teuten *et al.*, 2009). Dentre esses inúmeros compostos tóxicos emitidos e liberados cita-se o benzeno, tolueno, xileno, estireno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PHA), compostos de cloro, metais pesados, monóxido e dióxido de carbono, radicais livres, aldeídos, ácidos, cetonas, lactonas, hidrocarbonetos saturados, éteres cíclicos, ésteres cíclicos, alcenos e dienos (Hoff *et al.*, 1981; Hawley-Fedder *et al.*, 1984; Kaminsky *et al.*, 1996; Aracil *et al.*, 2005; Siddiqui *et al.*, 2009). Adicionalmente, o descarte inadequado de polímeros sintéticos causa o bloqueio do trato gastrointestinal e o estrangulamento de peixes, aves e mamíferos (**Figura 10**) (Spear *et al.*, 1995; Secchi *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2009). De acordo com a Administração Nacional Oceanográfica e Atmosférica Americana, apenas nos EUA os debris plásticos acumulados em ambientes naturais acarretam a morte de cerca de 100.000 mamíferos marinhos e milhões de aves e de peixes.

Estimativas traçadas pela GESAMP (United Nations Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) preconizam que 80% da poluição mundial marinha é advinda de fontes terrestres sendo que até 95% desses poluentes são classificados como debris plásticos. Ademais, a contaminação dos oceanos por microplásticos progressivamente aumenta, resultando no agravamento desse cenário, tendo em vista o acúmulo destes no organismo de animais marinhos e seu efeito ainda desconhecido nos ambientes naturais (Frias *et al.*, 2010; Katsnelson, 2015; Kalogerakis *et al.*, 2017). Ressalta-se, ainda, que os efeitos deletérios do descarte de plásticos não restringem-se localmente, a exemplo da colossal contaminação de ilhas isoladas e desabitadas por toneladas de resíduos plásticos, bem como da contaminação superficial global de oceanos (**Figura 9**) (Cózar *et al.*, 2014). Recentemente, a ONU (Organização das Nações Unidas) comprometeu-se em efetivar ações emergenciais para conter a contaminação de oceanos por plásticos, que foi descrita como uma crise em escala global (Em <http://www.bbc.com/news/science-environment-42239895>. Acesso em: 22 de janeiro de 2018). Ademais, esse tópico tem sido pauta não apenas em resoluções governamentais, como também tem sido amplamente divulgado em mídias sociais, como jornais e documentários, confirmando o caráter de extrema relevância em relação à necessidade imediata da gestão sustentável desses resíduos. Estima-se que o impacto

da poluição será expressivamente agravado em curto prazo, cerca de 20 anos, resultando em estado de calamidade global (Greenpeace; Coastal Care; CBC news). Consequentemente, a realização de intervenções é urgente e imprescindível, visto que os efeitos são irrefutáveis e atingem níveis iminentemente irremediáveis. Diante desse panorama crítico, estratégias que possibilitem a reversão desses problemas serão extremamente promissoras, inclusive sob a perspectiva econômica.



**Figura 9.** (a) Concentração global de debris plásticos em superfícies oceânicas. Círculos coloridos indicam a concentração em massa por área ( $g.Km^{-2}$ ) baseada na média entre 442 locais amostrados. Áreas em cinza indicam zonas de acumulação nas superfícies dos oceanos preditas por um modelo de circulação superficial global. (b) Representação em boxplot da distribuição da contaminação das superfícies marinhas por resíduos plásticos, incluindo regiões sem acumulação (azul), regiões externas à acumulação (verde) e regiões de acumulação (vermelho) (adaptado de Cózar *et al.*, 2017).

Nessa perspectiva, a exploração do potencial biotecnológico associado à degradação biótica de plásticos é bastante promissora, de modo que os diversos produtos metabólicos gerados por meio desta podem ser utilizados para inúmeras finalidades (e.g. bioprocessos de produção de biocombustíveis e outras moléculas orgânicas com aplicabilidade industrial e comercial), culminando na geração de possíveis patentes. Diante da nocividade associada à incineração e deposição em aterros e do alto custo agregado a processos de reciclagem, a biodegradação de plásticos emerge como uma alternativa não apenas sustentável, mas economicamente viável. Além disso, esta também apresenta a possibilidade vantagens econômicas devido ao menor custo de

manutenção de biorreatores em relação aos equipamentos utilizados na reciclagem e ao retorno financeiro associado a compostos de interesse biotecnológico (Albertsson *et al.*, 1990; Foerch *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991; Albertsson *et al.*, 1993; Bandopadhyay *et al.*, 2001; Yamada-Onodera *et al.*, 2001; Orr *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2004; Hadad *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2008; Nowak *et al.*, 2011; Sivan, 2011; Usha *et al.*, 2011; Sen *et al.*, 2015).

Os resultados preliminares (Peixoto, 2013) incluem a seleção de nove micro-organismos potencialmente degradadores de polietileno, pertencentes aos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas*, sendo o primeiro nunca antes relacionado a esse fenótipo na literatura. O processo de biodegradação de plásticos, embora apresente caráter biotecnológico e aplicado, também envolve fundamentalmente a pesquisa básica em virtude da interdisciplinaridade deste, contemplando áreas como a biologia molecular, bioquímica, química, físico-química e microbiologia. Além disso, após décadas de pesquisas, apenas duas bactérias foram descritas por participarem da degradação de PE sem a necessidade de pré-tratamentos (Yang *et al.*, 2014). No entanto, o processo de metabolismo de PE permanece relativamente desconhecido, observando-se uma grande limitação de dados acerca da biodegradação em nível celular. Tendo em vista o impacto, a relevância e a complexidade do problema em questão, contribuições que avancem no sentido de elucidar o metabolismo de plásticos serão de grande importância, interesse e aplicabilidade tanto para a comunidade científica, como para a sociedade.



Krichim, Boat in plastic, April 25, 2009. Photo: Dimitar Dilkoff



Midway atoll, bird corpse. Photo: Chris Jordan



Entangled seal by derelict net, Hawaii. Photo Source: NOAA

**Figura 10.** Consequências do acúmulo de plásticos em ambientes naturais. (Em: <<http://coastalcare.org/2009/11/plastic-pollution/>>.

Acesso em: 20 de outubro de 2013).

## OBJETIVO GERAL

---

---

O presente projeto tem como objetivo o estudo do metabolismo de polietileno a partir da identificação e caracterização, no âmbito da genômica funcional, dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo, além da avaliação do potencial degradativo de moléculas microbianas, visando a posteriores aplicações no campo da biotecnologia e da biorremediação.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

---

- i. Avaliar a viabilidade celular dos nove microrganismos, previamente selecionados com base em seus potenciais biodegradativos, em meios mínimos contendo polietileno como única fonte de carbono pelo período de 90 dias;
- ii. Analisar os efeitos de tratamentos abióticos nos filmes de PE por meio da exposição destes a condições climáticas e ambientais (i.e. *weathering*) por 90 dias;
- iii. Estimar as alterações das propriedades físico-químicas dos filmes de PE após serem submetidos a tratamentos bióticos e abióticos;
- iv. Determinar, por meio de técnicas microscópicas, o grau de degradação superficial sofrida por filmes de PE submetidos a tratamentos bióticos e abiótico;
- v. Caracterizar o genoma de um representante de cada gênero de biodegradadores de polietileno selecionados: *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas*;
- vi. Caracterizar os transcritomas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. cultivados na presença de PE como única fonte de carbono;
- vii. Investigar a expressão gênica diferencial entre os microrganismos cultivados com PE, com glicose ou sem a presença de fontes de carbono e energia;
- viii. Investigar o papel de espécies reativas no processo de biodegradação de PE;

- ix. Investigar possíveis estratégias de resistência à limitação de carbono empregadas por esses microrganismos;
- x. Identificar os genes expressos relacionados a moléculas que potencialmente participem direta ou indiretamente na biodegradação de PE;
- xi. Identificar potenciais candidatos envolvidos na fragmentação oxidativa extracelular polietileno para posteriores ensaios *in vitro*, visando a aplicações biotecnológicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 1. *Desinfecção dos filmes de PE*

Todos os filmes de PE (Ipten®111, Carmel Olefins, Haifa, Israel) submetidos a análises foram previamente desinfetados com SDS 2% (Sigma Aldrich, EUA) por 4 h seguido de etanol 70% (Sigma Aldrich, EUA) por 1h e lavados com água destilada, conforme adaptação de um protocolo bem-estabelecido (Orr *et al.*, 2004; Sivan *et al.*, 2006). Esse procedimento permite a completa remoção de células microbianas aderidas à superfície do material sem que haja modificações físico-químicas e/ou estruturais no polímero. Com isso, impede-se a interferência de debris celulares nos ensaios, cultivos e análises (e.g. fontes de carbono vestigiais nos cultivos restritivos ou contaminantes em análises espectroscópicas), garantindo maior confiabilidade aos resultados obtidos.

### 2. *Limpeza de vidrarias*

Todas as vidrarias utilizadas nos cultivos restritivos em relação a fontes de carbono foram lavadas com SDS 10% (Sigma Aldrich, EUA) seguidas de 2 lavagens com etanol absoluto e 10 lavagens com H<sub>2</sub>O destilada. O material foi deixado o.n. em NaOH 0,5M (Sigma Aldrich, EUA) e, consecutivamente, lavado mais 10 vezes com H<sub>2</sub>O bidestilada. Em seguida, as vidrarias foram autoclavadas e separadas para uso posterior.



### 3. Cultivo dos potenciais biodegradadores de PE

Os nove isolados previamente identificados como potenciais biodegradadores de polietileno, pertencentes aos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* (Peixoto, 2013), foram cultivados em frascos de vidro contendo 30 mL de meio de cultura mínimo mineral (MMM) (Tab. 1) (Pridham *et al.*, 1948) e um filme de PE de baixa densidade (0,92 g.cm<sup>3</sup>) de 1 cm<sup>2</sup> de área com massa molecular média de 191.000 (Ipten®111, Carmel Olefins, Haifa, Israel) previamente desinfetado segundo o protocolo acima descrito. Para tanto, os microrganismos foram previamente inoculados em 10 mL de meio Nutrient Broth (Difco, Holanda) (Tab. 2) e cultivados a 28°C sob agitação (150 RPM) por 24 h. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5.500 ×g por 5 min a fim de resgatar o *pellet* de células crescidas, desprezando-se o sobrenadante. As células foram lavadas 3 vezes consecutivas com solução salina (NaCl 0,9%) para a completa remoção de vestígios do meio Nutrient Broth e ressuspensas em 1 mL adicional dessa solução para o posterior inóculo nos frascos de vidro contendo MMM+PE, os quais foram mantidos a 28°C sob agitação (120 RPM) por 90 dias.

**Tabela 1.** Reagentes constituintes do meio de cultura mínimo mineral (MMM) e suas respectivas concentrações.

Reagente	Concentração (g/L)
Sulfato de Amônia	2,6400
Fosfato de Potássio monobásico	2,3800
Fosfato de Potássio dibásico	5,6500
Sulfato de Magnésio heptahidratado	1,0000
Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	0,0064
Sulfato de Ferro (II) heptahidratado	0,0011

Cloreto de Manganês (II) tetrahidratado	0,0079
Sulfato de Zinco heptahidratado	0,0015

**Tabela 2.** Reagentes constituintes do meio Nutrient Broth (NB) e suas respectivas concentrações.

Reagente	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de Carne	3,0

#### 4. *Viabilidade e adesão bacteriana aos filmes de PE*

Com a finalidade de avaliar a manutenção da viabilidade microbiana após longos períodos de cultivo na presença do PE como única fonte de carbono e energia, os microrganismos foram cultivados em MMM contendo um filme de PE por 90 dias. Após esse período, os filmes de PE foram resgatados e as células a este aderidas foram coradas com fluoróforos repórteres de viabilidade celular (SYTO9® e iodeto de propídeo) por meio do kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability (Invitrogen, EUA), aplicando-se o protocolo do fabricante ao sistema “filme + células”. Em seguida, as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência (Zeiss, Alemanha) em aumento de 40×, avaliando-se o total bruto de células aderidas e a proporção qualitativa entre as células viáveis e inviáveis. Essa análise possibilita inferências sobre a capacidade de reconhecimento e adesão das células em relação ao PE, e sobre a habilidade destas em utilizar esse polímero como fonte energética, possibilitando, assim, a manutenção da viabilidade celular. A fim de confirmar-se os resultados obtidos por meio dessa análise, os microrganismos aderidos aos filmes de PE também foram transferidos a uma placa de petri contendo meio Nutrient Agar (meio Nutrient Broth + 15% ágar bacteriológico) por meio da técnica de plaqueamento de réplica (Madigan *et al.*, 2009), e mantidos a 28°C por 24 h. Para isso, o filme de PE foi brevemente submetido ao contato direto com o meio sólido, a fim de que neste crescessem os microrganismos com a mesma disposição espacial

daquele. Tendo em vista que os isolados são gram negativos, logo não-espurulantes, as colônias crescidas no meio Nutrient Agar representariam parte das células efetivamente viáveis aderidas aos filmes de PE.

### 5. *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

O perfil químico dos filmes de PE previamente desinfetados foi acessado por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier utilizando-se um sensor de reflectância total atenuada (ATR-FTIR), na região dos números de onda entre 400 e 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho médio). Para tanto, empregou-se o espectroscópio Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer (Thermo Scientific, EUA), a fim de investigar as modificações químicas sofridas pelos filmes de PE antes e depois dos tratamentos biótico ou abiótico. Em cada filme de PE foram realizadas 10 leituras do espectro em diferentes pontos da amostra. As bandas de absorção dos espectros de IR foram analisadas comparativamente, em busca da formação de novos grupos funcionais (a partir de 1.300  $\text{cm}^{-1}$ ) e de outras modificações químicas induzidas pelos diferentes tratamentos (800 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ ). O espectro de IR (do inglês, *infrared*) de filmes não-tratados foi utilizado como padrão comparativo (controle negativo) durante as análises dos filmes degradados.

### 6. *Espectroscopia Raman e cálculo do grau de cristalinidade dos polímeros*

A fim de acessar a cristalinidade dos filmes de PE, possibilitando estimativas acerca de modificações físico-químicas, morfológicas e estruturais (Rull *et al.*, 1993) induzidas pelos tratamentos biótico e abiótico, esses materiais foram submetidos à espectroscopia Raman por meio do microscópio Raman confocal (WITec Alpha 300 RA) com detector de dispositivo de carga acoplada e fonte de laser de diodo (XTRA II) de frequência única a 786 nm (potência < 400 mW). Os espectros Raman foram obtidos no modo espectroscopia, utilizando-se a objetiva Zeiss EC Epiplan-Neofluar 100× air objective (Zeiss, Alemanha) em alta abertura numérica. O tempo de integração foi de 0,2 s e foram obtidas 100 aquisições utilizando-se 10 replicatas por amostra.

As massas das frações cristalina-ortorrômbica ( $\alpha_c$ ), isotrópica-amorfa ( $\alpha_a$ ) e desordenada anisotrópica ( $\alpha_b$ ) dos filmes de PE tratados e não-tratados foram determinadas pelo método de Strobl & Hagedorn (Strobl *et al.*, 1978), em que  $\alpha_a + \alpha_b + \alpha_c = 1$ . Esse método preconiza o cálculo da intensidade integral dos picos de absorção referentes às fases cristalina (vibração flexional

de CH<sub>2</sub>; 1416 cm<sup>-1</sup>) e amorfa (vibração de estiramento de CC; 1080 cm<sup>-1</sup>), utilizando a região espectral entre 1250 e 1350 cm<sup>-1</sup> (vibração torcional de CH<sub>2</sub>) como padrão interno por ser independente da conformação do polímero, de modo que sua intensidade integral é proporcional à soma das três fases. Para um PE totalmente cristalino,  $\alpha_c = 1$  e a intensidade integral referente à região de 1416 cm<sup>-1</sup> assume o valor de 0,46, valor máximo de cristalinidade assumido para o PE. Um PE totalmente amorfo (e.g. ponto de fusão do polímero), por sua vez, é descrito por  $\alpha_a = 1$  e a intensidade integral referente à região de 1080 cm<sup>-1</sup> é 0,79, constituindo o valor máximo da fração amorfa para esse polímero. Em ambos os casos (i.e. PEs totalmente cristalinos ou totalmente amorfos), o valor relativo da região espectral referente ao padrão interno é 1 (intensidade integral normalizada da região de vibração torcional de CH<sub>2</sub>), correspondendo ao mesmo valor da soma  $\alpha_a + \alpha_b + \alpha_c$ . Assim, temos que:

$$I_T = 1 = I_{T(a)} + I_{T(b+c)}$$

$$\alpha_a = I_{T(a)}$$

Alternativamente,  $\alpha_a$  e  $\alpha_c$  podem ser deduzidos a partir de

$$\alpha_a = I_E / I_{E(\alpha_a = 1)} = I_E / 0,79$$

$$\alpha_c = I_F / I_{F(\alpha_c = 1)} = I_F / 0,46.$$

Portanto, com base em  $\alpha_a + \alpha_b + \alpha_c = 1$ , o valor de  $\alpha_b$  é resolvido como

$$\alpha_b = 1 - I_E / 0,79 - I_F / 0,46$$

onde  $I_F$  representa a intensidade integral de vibração em modo de flexão (1416 cm<sup>-1</sup>),  $I_E$  a intensidade integral de vibração em modo de estiramento (1080 cm<sup>-1</sup>) e  $I_T$  a intensidade integral de vibração em modo de torção (1250–1350 cm<sup>-1</sup>), a qual compreende  $I_{T(a)}$  do largo pico de absorção amorfo com máximo em 1303cm<sup>-1</sup> e  $I_{T(b+c)}$  do pico cristalino estreito com máximo em 1295cm<sup>-1</sup>.

## 7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com a finalidade de caracterizar a topografia superficial dos filmes de PE tratados (biótica ou abioticamente) e não-tratados, esses materiais foram desinfetados, secos *o.n.* a 60°C e metalizados com platina sob alto vácuo. As amostras metalizadas

foram então analisadas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (JSM-7001F, Jeol, Japan) com voltagem de aceleração de 5 kV e aumento de 4.500 vezes. Essa estratégia permite avaliar a superfície micrométrica dos polímeros, fornecendo importantes informações qualitativas acerca do grau de deterioração destes.

#### 8. *Microscopia de Força Atômica (MFA): análise da topografia e caracterização da viscoelasticidade*

Os filmes de PE submetidos ao tratamento biótico e os controles positivo (filme de PE tratado abioticamente) e negativo (filme de PE sem tratamento), previamente desinfetados, foram analisados por microscopia de força atômica no ar à temperatura ambiente, utilizando-se *cantilevers* retangulares de silicone (raio da ponteira < 10 nm), constante de mola nominal de 42 N/m e frequência de ressonância de ~260 kHz. As imagens foram adquiridas em modo de fase dinâmica, com varredura máxima de 125 µm nas direções X-Y e 7 µm na direção Z. Para o processamento das imagens foram utilizadas apenas as funções de nivelamento horizontal e ajuste de plano superficial pelo software SPM-9600 *offline*. Os parâmetros de nanorugosidade foram determinados e foi definida a média de cada parâmetro para cada amostra (10 réplicas por amostra), seguida do cálculo do erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste T, comparando-se cada amostra individualmente ao controle negativo e assumindo-se como hipótese nula a ausência de diferença entre a amostra e o controle. As análises estatísticas foram realizadas no programa Microsoft® *Excel for mac*, e o *valor de P* foi calculado por meio da função TDIST aplicada ao t-stat:

$$t\text{-stat} = (m_a - m_c) / (e_a / \sqrt{n})$$

onde  $m_a$  corresponde ao valor médio obtido para a amostra (filme de PE tratado) investigada (i.e. média das intensidades dos picos de absorção),  $m_c$  ao valor médio do controle (filme de PE não-tratado),  $e_a$  ao erro padrão da amostra investigada e  $n$  ao número de leituras espectroscópicas para cada amostra investigada ( $n = 10$ ).

A partir das imagens da distribuição das fases do polímero, as quais refletem a viscoelasticidade do polímero, foram estimadas as proporções entre as regiões mais elásticas e as menos viscosas por meio do programa *ImageJ*. Com base nos percentuais estimados para cada região (i.e. elástica ou viscosa), as médias dos valores correspondentes às áreas viscosas foram calculadas, seguidas do cálculo do erro padrão a estas associado. Realizou-se um teste T a fim de comparar o percentual da área viscosa total obtido para os filmes tratados com o percentual obtido para o filme sem tratamento, de modo que, novamente, a ausência de diferença entre a amostra e o controle foi assumida como hipótese nula. Adicionalmente, a representação gráfica do

tipo *boxplot* das distribuições referentes aos percentuais mensurados foi construída pelo software R, a fim de facilitar a comparação entre as proporções das áreas viscosas antes e depois de dos tratamentos.

### 9. Purificação e sequenciamento do DNA total

Representantes dos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* (isolados PE 63, PE 138 e PE 591, respectivamente) foram inoculados em 5 mL de meio Nutrient Broth (Difco, Holanda) e mantidos a 28°C sob agitação (150 RPM) por 24 h. Em seguida, as células crescidas foram resgatadas por centrifugação a 5.500 ×g por 5 min a 4°C, e seus DNAs totais foram purificados por meio do kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich, EUA) e quantificados com o fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA) por meio do kit dsDNA BR Quant-it assay kit (Invitrogen, EUA). Os DNAs totais purificados foram analisados por eletroforese em gel de 0,8% agarose + 0,5X tampão TBE (0,05 M Trizma base, 0,05 M Ácido Bórico e 0,001 M EDTA), utilizando-se o marcador de massa molecular 1 kb DNA ladder (Invitrogen, EUA). Finalmente, os DNAs totais foram sequenciados pelo sistema Miseq (2 x 300 bp *paired-end*) da plataforma Illumina (Macrogen, Seoul, Coréia do Sul).

### 10. Montagem e anotação dos genomas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp.

Os *reads* sequenciados foram submetidos à análise de qualidade pelo programa FastQC, e, com isso, as sequências *sense* e *antisense* de cada isolado com valor de qualidade inferior a 20 na escala *phred* foram removidas (do inglês, *trimmed*) pelo programa Trimmomatic (parâmetros: leading = 20, trailing = 20, slidingwindow = 8:20, minlen = 200), resultando em *reads* de alta qualidade e tamanho mínimo de 200 bp (Bolger *et al.*, 2014). Em seguida, realizou-se a montagem *de novo* dos *reads* em *scaffolds* por meio do *A5-miseq pipeline* (Coil *et al.*, 2014). As ORFs foram preditas por meio do programa Glimmer 3.02 (Delcher *et al.*, 2007) e anotadas pelo programa Blast2GO (Götz *et al.*, 2008). As informações funcionais foram analisadas tanto individualmente, como em redes metabólicas geradas pelo *KEGG Pathway Maps* (Edwards *et al.*, 2013).

### 11. Preparo de materiais e soluções RNase FREE

Todas as vidrarias e espátulas foram devidamente lavadas e incubadas a 180°C *o.n.* visando à inativação de RNases. Os materiais plásticos utilizados (e.g. microtubos, falcons e caixas de ponteiras) foram adquiridos e separados exclusivamente para essa finalidade, todos advindos de embalagens devidamente destinadas a mantê-los estéreis e sem contaminação por RNases. Os reagentes e pipetas foram separados para uso exclusivo, a fim de evitar a manipulação e a exposição excessivas. As soluções foram preparadas com água milli Q previamente tratada com DEPC 0,1% (Sigma Aldrich) e autoclavada para a inativação deste (água milli Q *RNase free*). As cubas de eletroforese e outros materiais utilizados durante o processamento dos RNAs, excluídos os acima descritos, foram tratados com DEPC 0,1% por 1 hora e lavados com água milli Q *RNase free*.

### 12. Purificação dos RNAs totais e RNA-seq

A expressão gênica de uma estirpe representante de cada um dos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* foi investigada por meio da análise transcritômica destes (i) na ausência de fontes de carbono e (ii) na presença de PE ou (iii) glicose como única fonte de carbono. Assim, para cada um desses cenários metabólicos, 30 mL de cultura de células em meio Nutrient Broth (Difco, Holanda) mantidas por 24 horas a 28°C sob agitação (180 RPM) foram centrifugadas a 5.500 ×g a 4 °C por 5 min, lavadas 3× em solução salina estéril (0,9% NaCl) e inoculadas em 30 mL de MMM (i) sem a adição de fontes de carbono, (ii) contendo filmes de PE triturados ou (iii) 0,1% glicose (Sigma Aldrich, EUA). Após 2 e 20 dias de cultivo, os RNAs totais das células cultivadas foram extraídos com TRIzol Reagent (Invitrogen, EUA) utilizando-se o kit Purelink® RNA minikit (Thermo Scientific, EUA), segundo o protocolo do fabricante. Os RNAs purificados após os diferentes tempos de cultivo foram misturados, a fim de obter-se uma única amostra composta pelos transcritos sintetizados nos estágios inicial (2 dias) e final (20 dias) de cultivo. Os RNAs totais foram quantificados pelo fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA) por meio do kit RNA Quant-it assay kit (Invitrogen, EUA), analisados por eletroforese em gel desnaturante de formaldeído, tratados com DNase I (Promega, USA) e submetidos à análise de integridade por meio do equipamento 2100 Bioanalyser Instrument (Agilent, USA) utilizando-se o kit Agilent RNA 6000 nano (Agilent, USA), de modo que apenas amostras com valores de RIN (do inglês, *RNA integrity number*) superiores a 6 foram qualificadas para o posterior sequenciamento. Finalmente, os RNAs totais foram preservados por meio do reagente RNAsstable (Biomatrix, EUA) para o subsequente envio à empresa MacroGen Inc., na qual as amostras foram submetidas aos processos de depleção de rRNAs,

conversão a cDNA e seqüenciamento pelo sistema HiSeq 4000 100 bp paired-end da plataforma Illumina (Macrogen Inc., Seoul, Coréia do Sul). Esse estudo foi conduzido em três réplicas biológicas, visando a uma maior confiabilidade dos resultados.

### 13. Mapeamento, montagem e análise dos transcritomas

As seqüências referentes aos transcritomas obtidas foram primeiramente analisadas pela ferramenta FastQC (Andrews, 2010) de modo a inferir-se a qualidade do sequenciamento. Os reads foram submetidos a filtros de qualidade baseados na remoção da 101ª base, dos adaptadores e das seqüências controle PhiX por meio do software *bbmap* empregando-se a ferramenta *bbduk* (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bb-tools/>), sendo empregados os parâmetros *default* das respectivas ferramentas (Bushnell, 2015). O *trimming* foi realizado por meio da ferramenta *sickle* também com base nos parâmetros *default* estabelecidos no manual do programa (Joshi & Fass, 2011). Os *reads* referentes a seqüências de rRNA foram removidos por meio do programa *sortmerna* com base nos bancos de dados de seqüências de rRNAs bacterianos 16S, 23S e 5S pré-estabelecidos pelo programa (Kopylova *et al.*, 2012).

Após o filtro de qualidade, os *reads* restantes foram submetidos a duas diferentes estratégias de análise: (i) mapeamento contra um genoma de referência e (ii) montagem de novo dos *reads* seguida da anotação. Para o mapeamento, as referências utilizadas foram os genomas anotados de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. e o alinhamento foi realizado por meio do programa *Bowtie2* e para a conversão entre os diferentes formatos dos arquivos empregou-se a ferramenta *samtools* (Li *et al.*, 2009; Langmead & Salzberg, 2012;). Também foram utilizados os comandos *fixmate* com o parâmetro *-r* para remover reads não mapeados e *sort* para ordenar os *reads* com base nas coordenadas da extrema esquerda, sendo ambos os comandos preconizados pela ferramenta *samtools*. A montagem *de novo* dos *reads* foi realizada por meio do programa *SPAdes* utilizando-se a ferramenta *rnapades*, a qual é otimizada para a montagem de *reads* de RNA-seq (Bankevich *et al.*, 2012). Após a montagem, os contigs foram submetidos à etapa de predição de ORFs pelo programa *Glimmer 3.02* e estas foram anotadas por meio do programa *Blast2GO* (Delcher *et al.*, 2007; Götz *et al.*, 2008).

Com base em ambas as anotações (genoma e transcritoma), foram geradas tabelas de contagem de *reads* (*count table*) para cada gene, que consiste no número de *reads* que alinham em determinada característica (e.g. gene). As tabelas de contagem foram normalizadas pelo método TMM (*trimmed mean of M values*) (Maza *et al.*, 2013) e então submetidas à análise de expressão

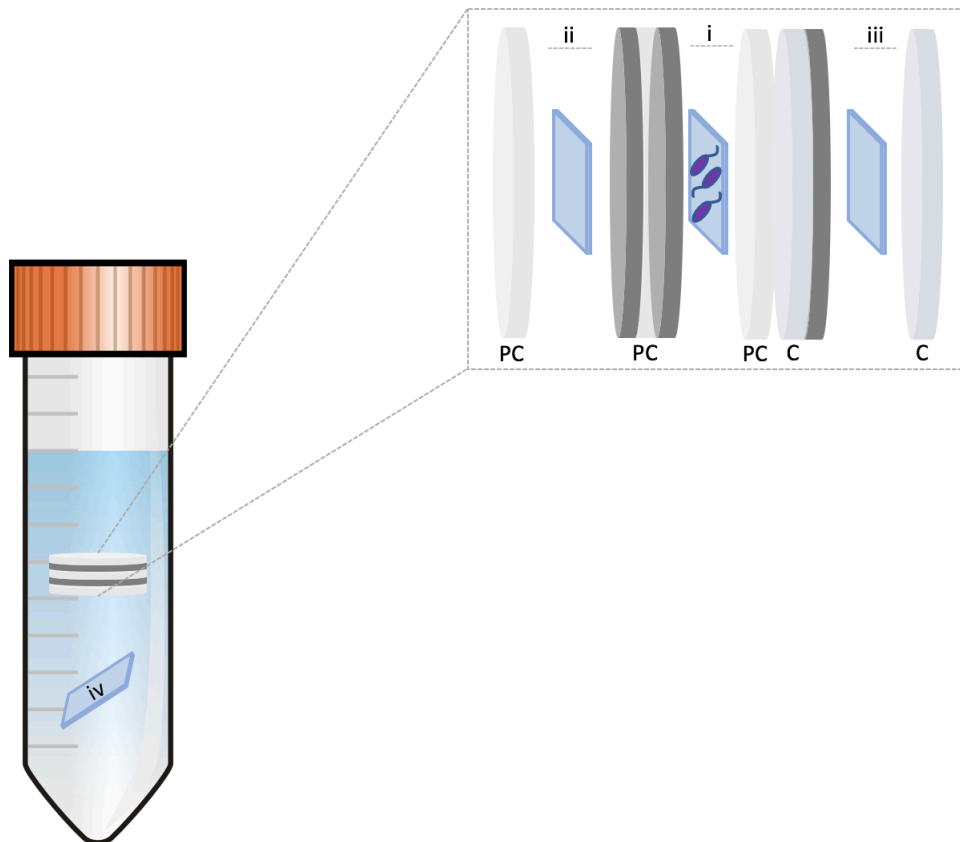


diferencial pareada por meio do programa *Blast2GO*, que implementa o pacote *edgeR* para análises empíricas de DGE (do inglês, *differential gene expression*) em R (Robinson *et al.*, 2010). Essa abordagem possibilitou a identificação de genes diferencialmente expressos em função das diferentes condições experimentais (ausência de fontes de carbono, presença de PE, presença de glicose). Para a seleção de genes diferencialmente expressos, foi considerado um *cutoff* de FDR < 0,25 para possibilitar uma investigação mais abrangente dos possíveis genes envolvidos no fenômeno de biodegradação de PE. A análise de enriquecimento de termos (*Fisher's exact test*) também foi realizada por meio do programa *Blast2GO* com base nos genes *up* e *down regulated* em cada par de condições contrastantes (ausência de carbono/PE, ausência de carbono/glicose, glicose/PE) (Fang *et al.*, 2012). Também foi realizada a análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA, do inglês *gene set enrichment analysis*) a partir dos dados de expressão diferencial, utilizando-se os valores de logFC e um *cut-off* de FDR < 0,25, a fim de que não fossem excluídos resultados potencialmente significantes (Subramanian *et al.*, 2005). Os genes diferencialmente expressos bem como os termos enriquecidos foram graficamente representados implementando-se os pacotes em R *ggplot2* e *pheatmap* (Kolde, 2012; Wickham, 2016).

#### **14. Efeito do tratamento de filmes de PE com o sobrenadante das culturas de biodegradadores**

A fim de estimar o efeito biodegradativo de moléculas secretadas por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp., os filmes de PE foram submetidos estratégias de cultivo com membranas semipermeáveis (**Figura 11**). Para tanto, os microrganismos foram primeiramente cultivados em 30 mL MMM contendo filmes de PE como única fonte de carbono, incubados sob agitação de 150 RPM a 28°C por 5 dias. Em seguida, os filmes contendo as bactérias aderidas foram transferidos para um sistema de membranas montado a partir da fixação de uma membrana de policarbonato de 0.1 µm de poro e 1,3 cm de diâmetro (Whatman, USA) em *o'ring*s de viton de 1,3 cm de diâmetro utilizando-se cola silicone Silicon Glue II (GE, USA) (Kaeberlein *et al.*, 2002). Após a transferência dos filmes de PE e das células advindos das culturas, fixou-se à outra face do *o'ring* mais uma membrana de policarbonato de 0.1 µm de poro e 1,3 cm de diâmetro a fim de isolar fisicamente o sistema composto por um sanduíche de membranas separadas por um *o'ring* contendo bactérias aderidas a filmes de PE em seu interior. Ao sistema foram fixados mais 2 *o'ring*s (um acima e outro abaixo), posicionados um filme de PE em cada face do sistema e, em seguida, fixadas mais duas membranas (uma em cada face) a fim de manter os filmes em constante contato com as moléculas difusíveis produzidas pelas bactérias isoladas no interior do sistema. Em uma dessas faces, foram incluídas, além das membranas de policarbonato, membranas celulósicas de diálise de proteínas, a fim de impedir a difusão de proteínas e permitir a passagem de moléculas menores

(e.g. espécies reativas). Externamente ao sistema, foi adicionado um filme de PE a fim de estimar-se o efeito de proteínas secretadas.



**Figura 11.** Montagem do sistema de membranas (PC: membranas de policarbonato; C: membrana de celulose) para a investigação das modificações químicas sofridas pelo PE em função (i) do efeito global da atuação microbiana, (ii) de proteínas e pequenas moléculas secretadas, (iii) apenas de pequenas moléculas secretadas e (iv) apenas de proteínas secretadas.

### 15. *Teste da produção de biosurfactantes*

Os sobrenadantes das culturas contendo filmes de PE incubadas por 90 dias foram submetidos a um teste qualitativo para inferir a presença de biosurfactantes. Para tanto, 100  $\mu$ L de cada sobrenadante e do MMM como controle foram pipetados em placas de poliestireno de 96 poços. Diante da hidrofobicidade do poliestireno, espera-se que o meio aquoso (MMM) forme uma

curvatura superficial convexa, já que as moléculas de água tendem a interagir entre si em vez de interagir com esse material. Por outro lado, a presença de surfactantes agrega uma interface de interação entre a água e o poliestireno, formando-se, então, uma superfície de curvatura côncava. Em virtude do desvio óptico da luz dirigido pelas curvaturas superficiais dos líquidos nos poços, é possível estimar a presença de sobrenadantes após contrapor-se a placa a um grid de tamanho padronizado. Distorções da luz que acarretarem um aumento da imagem caracterizam, portanto, a ausência de sobrenadantes e, as que acarretarem a diminuição da imagem, presença de surfactante (Vaux & Cottingham, 2007).

### 16. *Quantificação de nitrito e nitrato*

A fim de estimar-se a síntese de produtos do metabolismo de nitrogênio, *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foram cultivadas nos mesmos três cenários metabólicos descritos previamente (presença de PE, glicose ou ausência de fontes de carbono). Para tanto, essas bactérias foram crescidas em meio Nutrient Agar (Difco, Netherlands) e uma colônia foi selecionada e inoculada em 10 mL de meio Nutrient Broth. Após 24 horas de cultivo, as culturas foram lavadas 3 vezes com solução salina (0,9% NaCl) e inoculadas em 10 mL de MMM sem fontes de carbono ou contendo 0,1% PE em pó (Sigma Aldrich, USA) ou 0,1% glicose (Sigma Aldrich, USA) como única fonte de carbono e energia. Nos dias 1, 2, 3, 5, 8, 10, 12, 15, 20 e 30 as amostras foram submetidas a testes para a quantificação de (i) nitrito, (ii) nitrato e (iii) óxido nítrico. Para a quantificação de nitrito (i) utilizou-se o método baseado na reação de Griess, de modo que a 100 µL de amostra foram adicionados 20 µL do reagente de diazotação (0,5 g sulfanilamida em 100 mL 2,4 M HCl) (Sigma Aldrich, USA) e, em seguida, 20 µL do reagente de acoplamento (0,3 g N-(1-naphthyl)-ethylenediamine em 100 mL de 0,12 M HCl) (Sigma Aldrich, USA) (Keeney & Nelson, 1982). Após a adição dos reagentes de Griess, a absorvância em 540/550 nm foi estimada por meio do espectrofotômetro Spectramax M3 Multi-mode Microplate reader (Molecular Devices, USA). A concentração foi mensurada por meio da comparação entre a absorvância medida e a absorvância obtida na curva padrão de nitrito, gerada por diferentes diluições de nitrito de sódio (Sigma Aldrich, USA) em MMM em concentrações predeterminadas. Após estimar-se a concentração do composto diazo formado pela reação de Griess, foram adicionados 20 µL de solução de cloreto de vanádio (3,5 g cloreto de vanádio em 50 mL de 1 M HCl) (Sigma Aldrich, USA) e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Novamente, a absorvância em 540/550 nm foi mensurada e a concentração de nitrato (ii) foi calculada subtraindo-se desta a referente à concentração de nitrito (Doane & Horwath, 2003).

### *17. Quantificação de óxido nítrico*

A síntese de óxido nítrico (NO) foi estimada por meio da utilização dos fluoróforos indicadores de NO 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluoresceína (DAF-FM) e DAF-FM diacetato (Thermo Fisher Scientific, USA). DAF-FM é impermeável à membrana plasmática e reage com o NO formando um derivado benzotriazólico fortemente fluorescente, sendo, portanto, utilizado para mensurar a presença de NO nos sobrenadantes das culturas. Para quantificar o NO intracelular, utilizou-se o DAF-FM diacetato que, apesar de apresentar baixa fluorescência em sua forma acetilada, é assimilado pela célula microbiana e convertido por esterases intracelulares a DAF-FM. Para a quantificação de NO por meio desses fluoróforos, foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  de cultura contendo 5  $\mu\text{L}$  DAF-FM ou DAF-FM diacetato, conforme descrito no protocolo do fabricante. As células tratadas com DAF-FM diacetato foram incubadas por 1 hora a 28°C no escuro. A fluorescência emitida foi quantificada em  $\lambda_{\text{excitação}} = 495 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{emissão}} = 515 \text{ nm}$  por meio do espectrofotômetro Spectramax M3 Multi-mode Microplate reader (Molecular Devices, USA). Ressalta-se que todas as culturas e análises foram conduzidas em triplicatas biológicas e técnicas.

### *18. Oxidação abiótica de amônia mediada por espécies reativas de oxigênio*

A fim de investigar a possível ocorrência de oxidação abiótica da amônia a nitrito, foram adicionadas diferentes concentrações (1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 3 mM, 3,5 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM e 100 mM) de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a frascos contendo 30 mL de MMM em triplicatas. A concentração de nitrito abioticamente produzido foi estimada durante 15 dias por meio do método de Griess, conforme descrito anteriormente.

### *19. Efeito da quimiodenitrificação nos filmes de PE*

Filmes de PE foram desinfetados e submetidos a tratamentos abióticos em triplicata durante 90 dias com (i) 1 mM nitrito de sódio, (ii) MMM contendo 1 mM nitrito de sódio, (iii) 3,5 mM  $\text{FeSO}_4$  / 3,5 mM nitrito de sódio, (iv) MMM e (v) 3,5 mM  $\text{FeSO}_4$ . Ao final desse período, os filmes foram novamente desinfetados e analisados por espectroscopia no infravermelho por reflectância total atenuada (ATR-FTIR) utilizando-se o espectroscópio ALPHA FTIR Spectrometer (Bruker, Alemanha).

## 20. Investigação da oxidação de amônia por catálise enzimática

A presença de enzimas participantes da catálise da oxidação de amônia a nitrito nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foi acessada por meio de ensaios enzimáticos a partir de preparações do lisado e do sobrenadante das culturas. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de petri contendo meio nutriente-agar incubadas a 28°C por 2 dias. As colônias isoladas foram então inoculadas em 30 mL de meio nutriente e incubadas a 28°C sob agitação de 150 RPM por 1 dia. Em seguida, as células foram resgatadas, lavadas e inoculadas em 30 mL de MMM na presença de glicose ou PE como fontes de carbono ou na ausência de fontes de carbono, conforme o protocolo descrito anteriormente (vide “Cultivo dos potenciais biodegradadores de PE”) incluindo a realização de 3 réplicas biológicas para cada condição. Após 20 dias de cultivo, as culturas foram centrifugadas a 7500 xg por 10 min a 4°C a fim de separar-se células e sobrenadantes. O pellet contendo as células foi submetido a um processo de lise celular em condições nativas por meio da adição de 5 mL de tampão de lise (50mM HEPES, pH 7.0; 500 mM NaCl e 20 mM imidazol) e de 4 µg.ml<sup>-1</sup> lisozima. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C e as células rompidas por sonicação em 6 ciclos de 20 pulsos a 30 % de amplitude com intervalos de 20 s. Estas foram então centrifugadas a 8000 xg por 20 min a 4°C. O ensaio enzimático foi realizado adicionando-se 1 mL do lisado/sobrenadante a 1 mL de tampão fosfato (0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.8), 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, BSA (25mg/ml) e CuCl<sub>2</sub> (1mM) (Ensign *et al.*, 1993). As amostras foram incubadas sob agitação a 30°C por até 1 dia e as leituras espectrofotométricas foram realizadas ao longo desse período mediante a aplicação do método de Griess.

## 21. Efeito do nitrato, nitrito e L-arginina como fontes de nitrogênio na produção de nitrito e NO

O impacto de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de NO e nitrito foi acessado com a finalidade de investigar os possíveis mecanismos metabólicos envolvidos na síntese desses compostos. Para tanto, *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foram cultivadas em MMM sem sulfato de amônia. Em vez disto, foram adicionados 20 mM de nitrito, 20 mM de nitrato ou 2 g.L<sup>-1</sup> de L-arginina ao MMM como fontes de nitrogênio (Tiso & Schechter, 2015; Siddiqui & Shaukat, 2004) e o NO e o nitrito produzidos nessas culturas foram quantificados após 5 dias de incubação conforme descrito anteriormente. Ressalta-se que todas as culturas e análises foram conduzidas em triplicatas biológicas e técnicas.

## *22. Análises estatísticas dos dados quantitativos*

Todos os dados quantitativos foram obtidos em triplicata técnica e biológica e submetidos à análises estatísticas por meio de testes T, cuja hipótese nula foi a ausência de diferença significativa entre as amostras e os respectivos controles negativos, a qual foi rejeitada para valores de  $P < 0,05$  (95% de confiança).

---

---

## Prospecção de microrganismos e caracterização físico-química dos filmes de PE biodegradados<sup>2</sup>

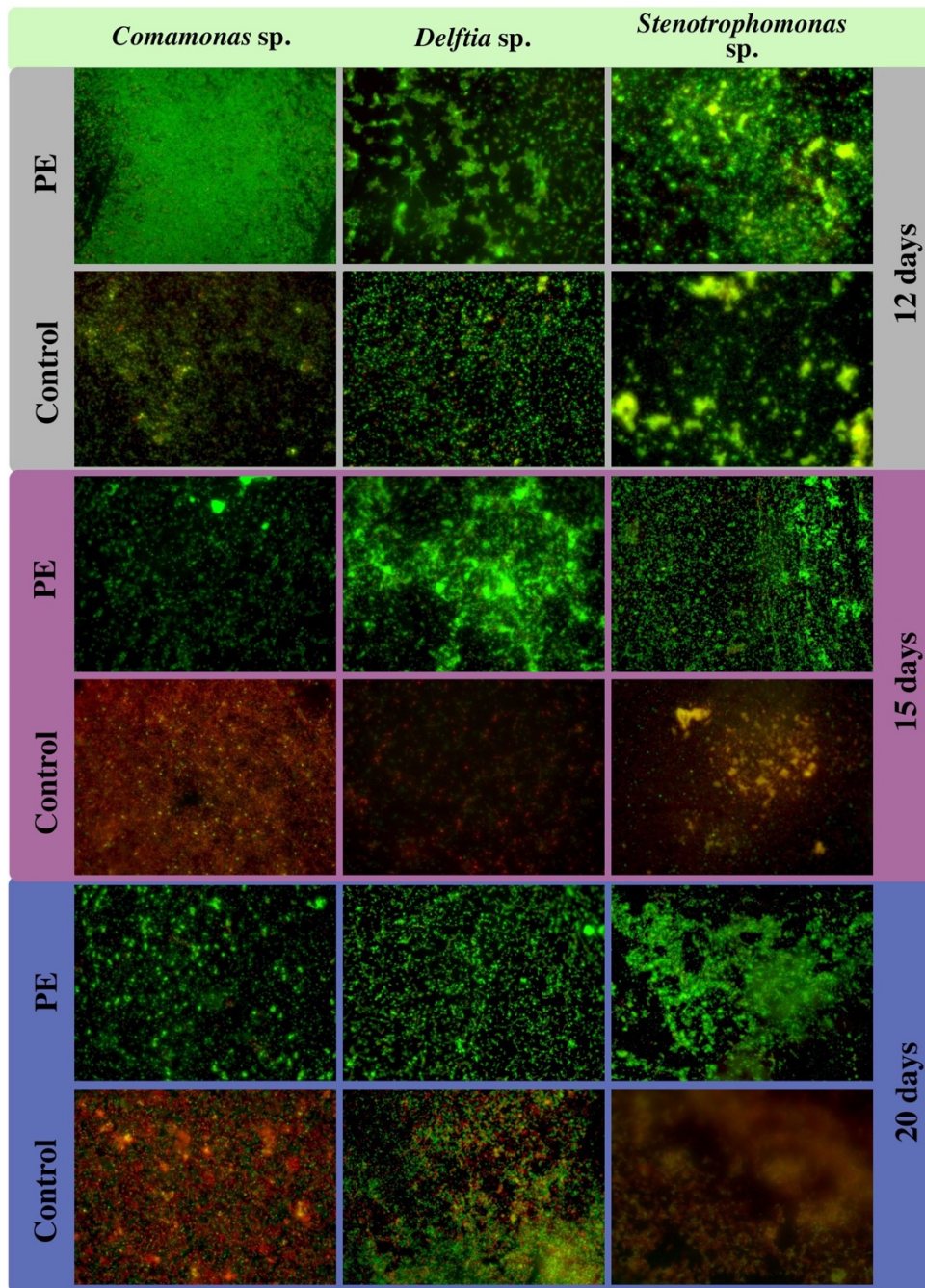
---

A seleção de microrganismos biodegradadores de PE foi realizada a partir do cultivo dos microrganismos previamente isolados na presença de PE como única fonte de carbono e energia. Os filmes de PE submetidos a essas culturas foram analisados por microscopia de fluorescência mediante a utilização de fluoróforos repórteres de viabilidade celular constituintes do kit comercial *LIVE/DEAD baclight bacterial viability assay* (Invitrogen, USA). Neste, as 16 estirpes bacterianas degradadores de óleo mineral que apresentaram atividade metabólica na presença de PE foram cultivadas em MMM por até 20 dias na presença de um filme de PE como única fonte de carbono ou na ausência de fontes de carbono como controle negativo (adesão em lamínulas de vidro). Os cultivos e as análises foram realizados em triplicada biológica e foram amostrados 10 pontos de cada lado dos filmes. As micrografias obtidas permitem a estimativa de células vivas (coradas em verde) e células mortas (coradas em vermelho), onde é possível observar a massiva presença de viabilidade celular ao longo do cultivo contendo PE em contraste à progressiva morte celular observada nas culturas deficientes de fontes de carbono (**Figura 12**). Com base nesses resultados, foram selecionados 9 microrganismos com potencial para a biodegradação de PE, classificados nos gêneros *Delftia*, *Comamonas* e *Stenotrophomonas* (**Figura 8**).

As 9 bactérias gram-negativas com potencial para a biodegradação de PE foram novamente cultivadas em MMM contendo um filme de PE como única fonte de carbono estendendo-se o período de incubação para 90 dias com a finalidade de estimar-se a habilidade dessas células de manterem-se viáveis após longos períodos de cultivo. De fato, foi possível observar a densa colonização dos filmes de PE além da vasta predominância de células vivas em face da reduzida evidência de morte celular (**Figura 13**), refletidas tanto nas micrografias quando nas imagens do plaqueamento por réplica. Isso corroborou com os resultados anteriores, fornecendo suporte para o grande potencial biodegradativo dessas estirpes.

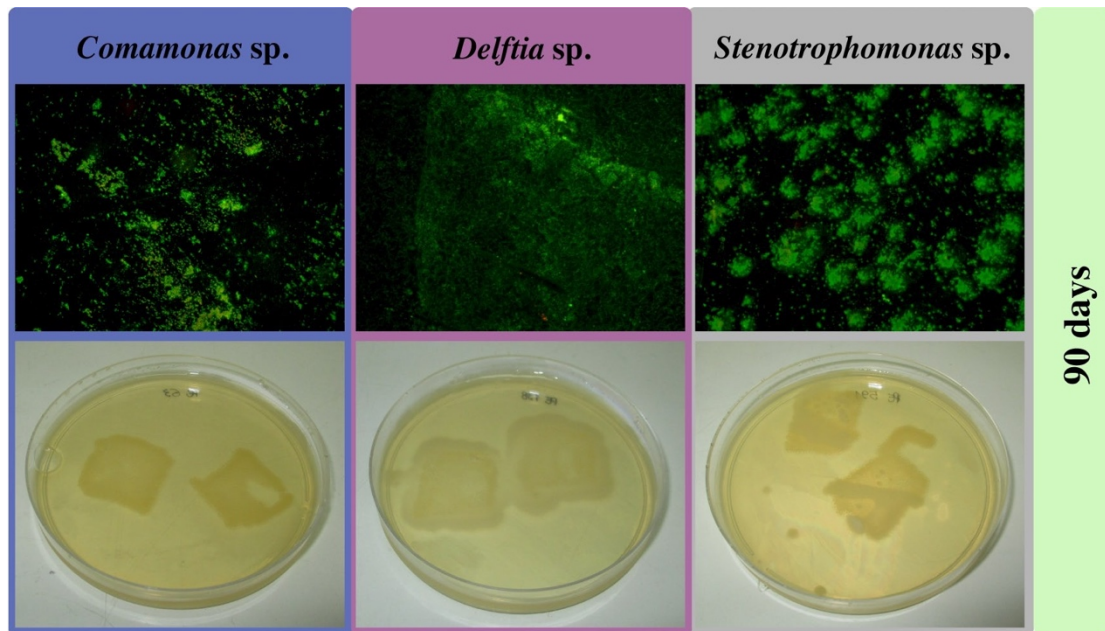
---

<sup>2</sup> Parte publicada em Peixoto *et al.*, 2017.



**Figura 12.** Viabilidade celular de representantes dos gêneros de biodegradadores de PE *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* ao longo de 20 dias de cultivo em MMM contendo um filme de PE como única fonte de carbono (PE) em contraste a culturas sem fontes de carbono (Control). Nessas imagens de microscopia de fluorescência das células coradas com os fluoróforos syto9® e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD baclight bacterial viability kit, Invitrogen, USA) estão representadas em verde as células vivas, em vermelho células mortas e em amarelo a sobreposição de células vivas e mortas.





**Figura 13.** Viabilidade celular de representantes dos gêneros de biodegradadores de PE *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* ao longo de 90 dias de cultivo em MMM contendo um filme de PE como única fonte de carbono. Os resultados revelam a viabilidade das células aderidas aos filmes de PE por microscopia de fluorescência (acima: em verde, células vivas; em vermelho, células mortas) e por crescimento em meio nutriente após a transferência das células aderidas para este.

Para confirmar a indução de modificações químicas, estruturais e morfológicas ao PE provocada pelos potenciais biodegradadores, os filmes tratados com estes por 90 dias foram submetidos a estratégias de caracterização físico-químicas e topográficas por meio da utilização de diferentes abordagens espectroscópicas e microscópicas. Tais avaliações permitiram inferir se os microrganismos notadamente aderidos ao PE e viáveis na presença deste polímero como única fonte de carbono e energia por tão longos períodos estavam de fato utilizando o potencial energético contido na molécula deste. Para tanto, os resultados obtidos para os polímeros bioticamente tratados foram comparados a controles negativo e positivo, sendo estes, respectivamente, filmes de PE não-tratados e filmes tratados abioticamente por meio da exposição a fatores ambientais (e.g. radiação, chuva e alterações de temperatura) pelo mesmo período (90 dias).

O perfil químico dos filmes de PE tratados e não tratados foi investigado por meio da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). A partir dessa técnica foi possível acessar a alteração da composição química e a formação de novos grupos funcionais nos filmes de PE em resposta aos tratamentos biótico e abiótico.

Os espectros de infravermelho dos filmes de PE revelaram claras diferenças entre os tratamentos biótico e abiótico e entre estes e o filme não tratado (**Figura 14**). Os picos de absorção destacados nos espectros representam as principais e mais relevantes modificações químicas características dos filmes degradados, como evidências de quebra de cadeia ( $915 - 905 \text{ cm}^{-1}$ ;  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}-$ ) e formação de grupos alcóxi ( $1026 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1090 \text{ cm}^{-1}$ ; C-O), grupos acilas ( $1220 \text{ cm}^{-1}$ ; C-O), grupos nitro ( $1500 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ; N-O), vinilenos ( $1640 \text{ cm}^{-1}$ ;  $-\text{C}=\text{C}-$ ) e carbonilas ( $1715 \text{ cm}^{-1}$ ; C=O).

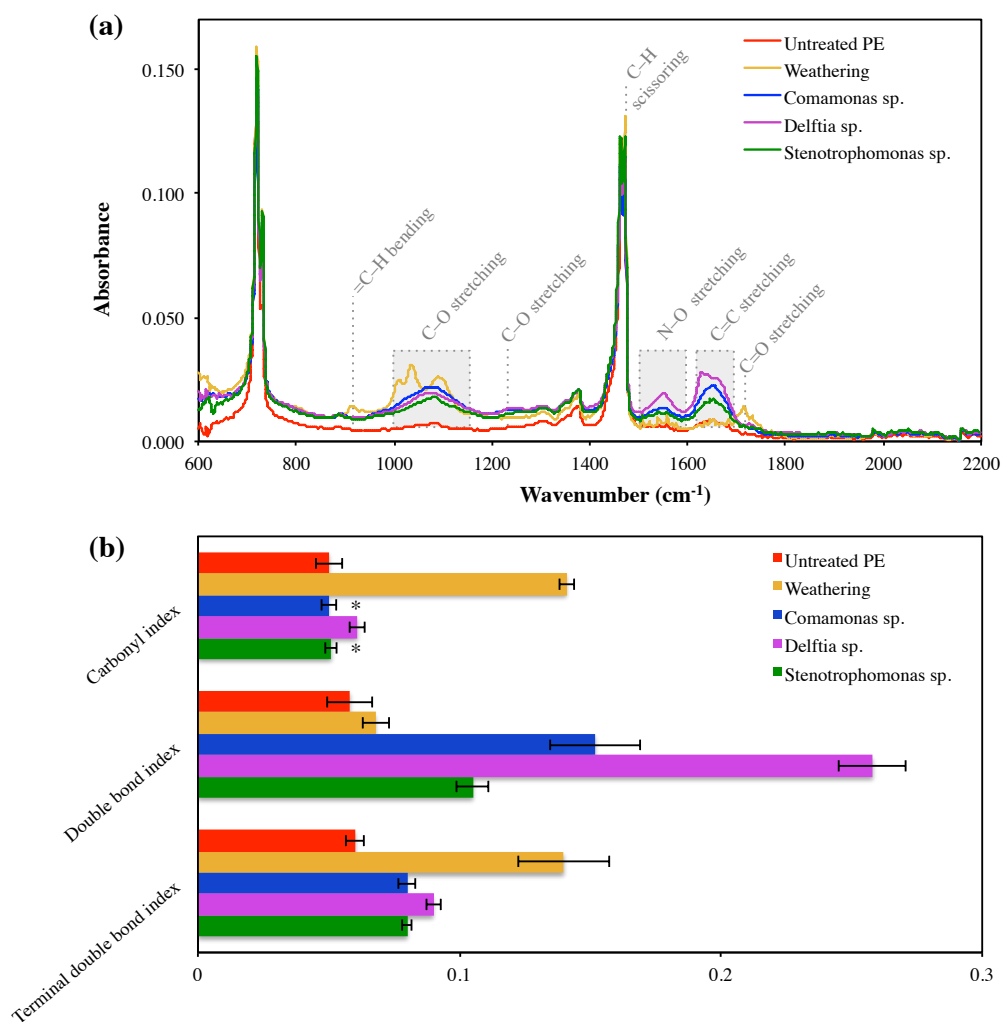
Adicionalmente, foram calculados os índices de carbonilas ( $1715 \text{ cm}^{-1}$ ), insaturações terminais ( $905 \text{ cm}^{-1}$ ) e insaturações internas ( $1640 \text{ cm}^{-1}$ ), que correspondem às concentrações dessas espécies químicas nos filmes de PE e permitem inferências e estimativas acerca do grau de oxidação, formação de vinilenos e quebra de cadeia induzidos pelos tratamentos (**Figura 14B**; **Tab. 3**). De acordo com os resultados, o tratamento biótico dos filmes de PE acarretou um expressivo aumento de até 3,4 vezes na formação de duplas ligações, enquanto o menor aumento na formação de carbonilas e insaturações terminais indica a formação e a subsequente assimilação dos fragmentos oxidados e de menor massa molecular. Ademais, a substancial formação de grupos vinileno confirma a modificação química do PE pelo metabolismo bacteriano. Esses resultados destacam também que a degradação biótica e abiótica ocorre por mecanismos diferentes, o que é evidenciado pelos contrastes observados nos perfis químicos dos materiais submetidos a esses tratamentos.

**Tabela 3.** Índices referentes às principais modificações químicas observadas nos filmes de PE submetidos ou não a tratamentos bióticos e abióticos.

Índice	Tratamento biótico			Tratamento abiótico	Controle negativo
	<i>Comamonas sp.</i>	<i>Delftia sp.</i>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>		
Carbonila	0.050±0.005*	0.061±0.005	0.051±0.004*	0.141±0.005	0.050±0.009
Dupla ligação	0.152±0.030	0.258±0.022	0.105±0.011	0.068±0.009	0.058±0.015
Dupla ligação terminal	0.08±0.006	0.09±0.005	0.08±0.003	0.14±0.03	0.06±0.006

Dados apresentados como média ± EP (n = 3)

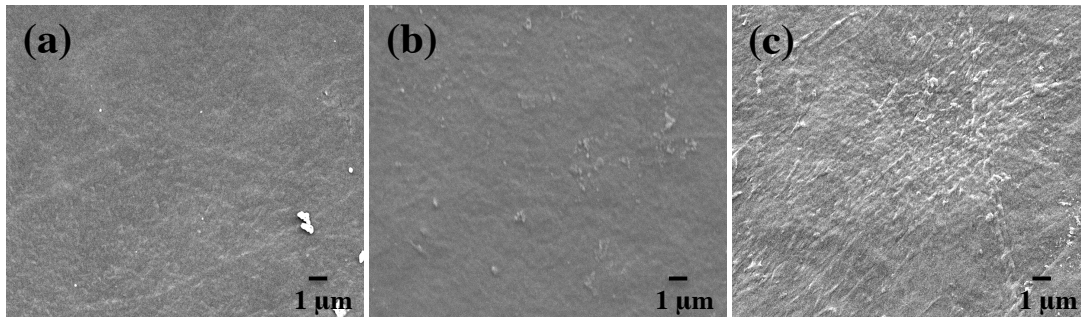
\* Não há diferença estatística entre a amostra e o controle negativo ( $P > 0,05$ )



**Figura 14.** (a) Espectro de infravermelho (ATR-FTIR) dos filmes de PE incubados por 90 dias com *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde). Como controle positivo empregou-se o filme de PE exposto a fatores ambientais por 90 dias (amarelo) e como controle negativo o filme não tratado (vermelho). Em destaque estão os picos de absorção referentes às principais modificações químicas inferidas por meio dessa técnica. (b) Comparação entre os índices de carbonilas (carbonyl index), duplas ligações internas (double bond index) e duplas ligações terminais (terminal double bond index) estimados a partir dos espectros das amostras biodegradadas e dos controles (média  $\pm$  EP, n = 3). (\*) Não há diferença estatística em relação ao filme não submetido a tratamentos ( $P > 0,05$ ).

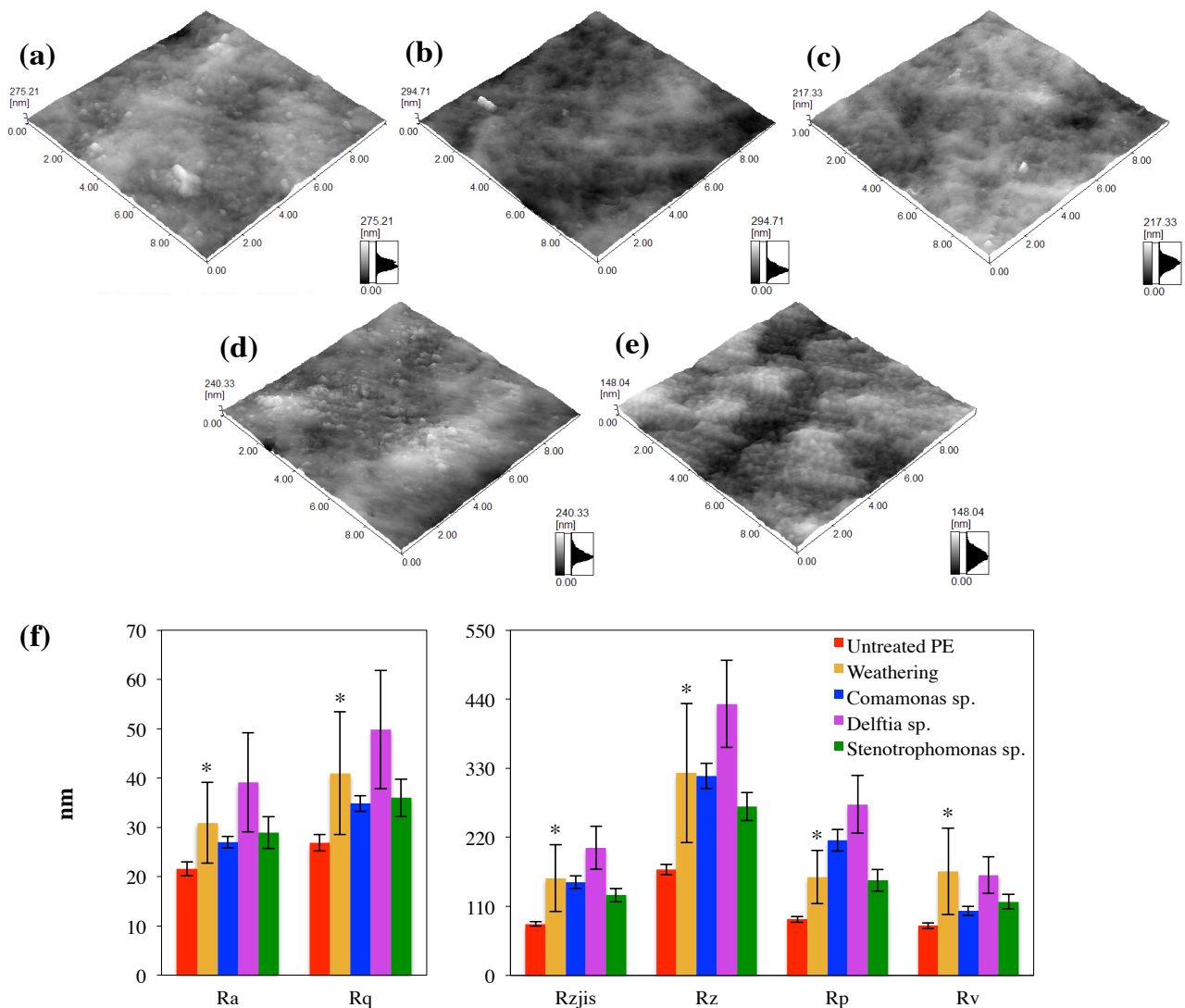
Estudos em escala micrométrica da superfície dos filmes de PE biodegradados em contraste aos controles conduzidos por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) indicaram grande modificação superficial daqueles em relação a estes, a qual está refletida na presença de evidentes sinais de desgaste, ranhuras e erosão dos filmes (Figura 15). As micrografias

revelam a estrutura plana e lisa do filme intacto (não-tratado) em contraste à clara deterioração superficial dos filmes biodegradados, que foi muito mais evidente do que a induzida pelo tratamento abiótico.



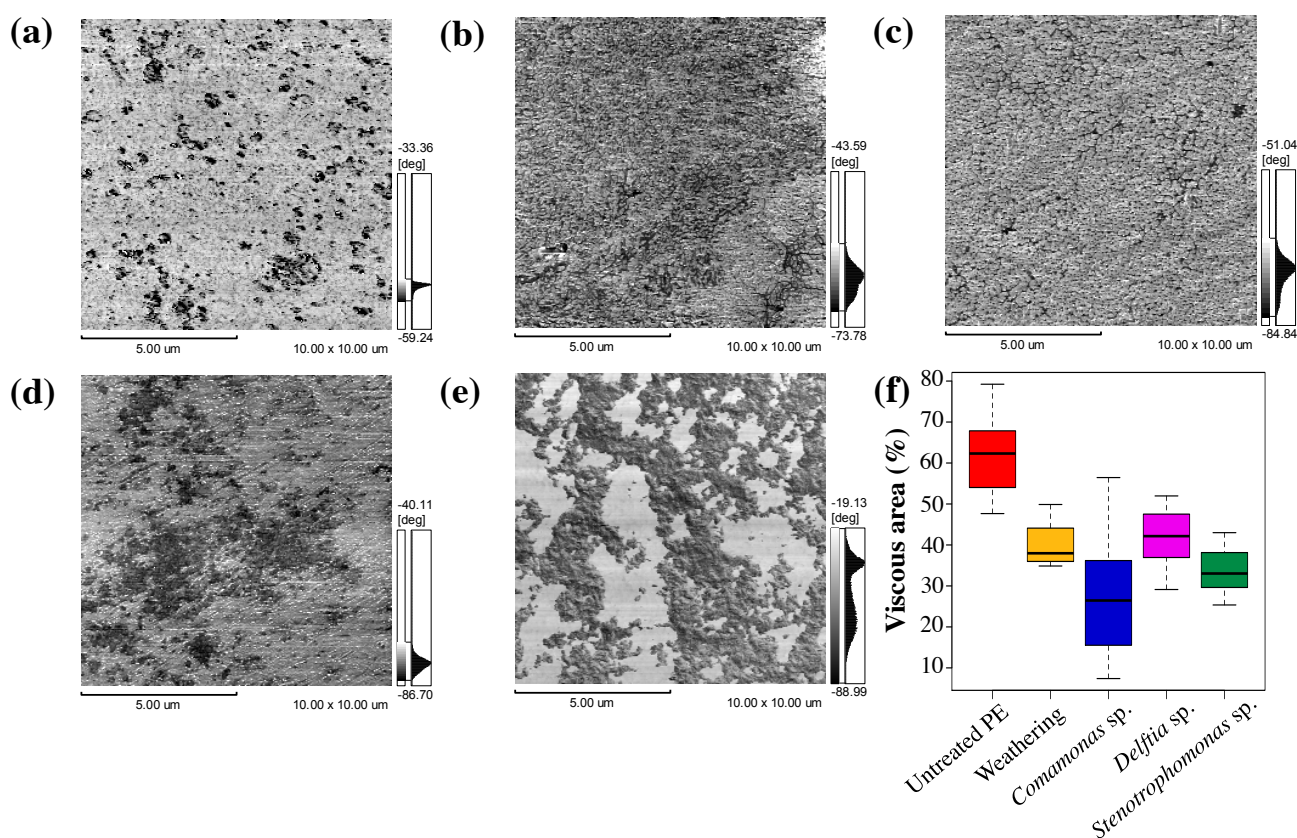
**Figura 15.** Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de PE (a) não tratado, (b) exposto a fatores ambientais por 90 dias ou (c) incubado com bactérias por 90 dias. Evidente deterioração superficial pode ser observada após a incubação com as bactérias, sugerindo a ocorrência de biodegradação.

Análises topográficas por microscopia de força atômica (MFA) também indicaram consideráveis modificações na nanoestrutura dos filmes de PE após os tratamentos biótico e abiótico (**Figura 16**). Em perspectiva nanométrica, os filmes de PE submetidos aos tratamentos apresentaram grande variação na rugosidade em comparação ao filme intacto (não submetido a tratamentos), detectada tanto qualitativamente por meio das micrografias, quanto quantitativamente por meio dos parâmetros de rugosidade. De maneira geral, todos os parâmetros apresentaram dramáticas variações nos filmes biodegradados mesmo quando comparados aos obtidos para os filmes abioticamente tratados. A rugosidade média ( $R_a$ ) destacou diferenças substanciais entre o controle negativo, com valores  $R_a$  de  $21,5 \pm 1,4$  nm, e as amostras biodegradadas, cujos valores atingiram até  $39,2 \pm 10,1$  nm. A rugosidade média quadrática ( $R_q$ ), por sua vez, variou de  $82,0 \pm 3,9$  nm no controle negativo para até  $203,5 \pm 34,2$  nm no PE biodegradado. Similarmente, a altura média ( $R_z$ ) dos filmes, que corresponde à amplitude entre o vale mais baixo e o pico mais alto presentes na amostra, variou de  $168,5 \pm 8,2$  nm no controle negativo para até  $432,5 \pm 69,6$  nm mediante a exposição aos biodegradadores.



**Figura 16.** Topografia nanométrica dos filmes de PE incubados com (a) *Comamonas* sp., (b) *Delftia* sp. ou (c) *Stenotrophomonas* sp. por 90 dias. (d) Filmes expostos a fatores ambientais por 90 dias foram utilizados como controle positivo e (e) filmes não tratados foram considerados como controle negativo. Barras laterais correspondem à distribuição das amplitudes ao longo do material e à amplitude máxima em nm em uma superfície de 100  $\mu\text{m}^2$ . (f) Representação gráfica dos parâmetros de rugosidade (média  $\pm$  EP, n = 10) do controle negativo (vermelho), controle positivo (amarelo) e PE incubado com *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) ou *Stenotrophomonas* sp. (verde): rugosidade médias (Ra), rugosidade média quadrática (Rq), padrão industrial japonês de rugosidade média (Rzjis), altura média (Rz), altura máxima de pico (Rp) e profundidade máxima de vale (Rv). (\*) Não há diferença estatística em relação ao filme não submetido a tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Por meio das imagens de contraste de fase constatou-se também a modificação das propriedades mecânicas no material, inferidas a partir da análise do comportamento viscoelástico dos filmes biodegradados e dos controles (Figura 17). A viscoelasticidade é uma propriedade intimamente relacionada à massa molecular de materiais poliméricos, os quais comportam-se como sólidos e fluidos simultaneamente, de modo que, a partir dessas análises, é possível inferir a ocorrência de modificações tanto na massa quanto no tamanho médio das moléculas constituintes desses materiais. O PE não tratado (controle negativo) apresenta uma certa equivalência qualitativa entre a contribuição dos componentes viscoso e elástico (Figura 17e). A distribuição desses componentes sofre uma substancial alteração induzida principalmente pelo tratamento biótico, no qual pode-se observar uma grande predominância de regiões elásticas nas imagens de fase dos polímeros biodegradados (Figura 17).



**Figura 17.** Comportamento viscoelástico determinado pelas imagens de contraste de fase em microscopia de força atômica dos filmes de PE incubados com (a) *Comamonas* sp., (b) *Delftia* sp. ou (c) *Stenotrophomonas* sp. por 90 dias. (d) Filmes expostos a fatores ambientais por 90 dias foram utilizados como controle positivo e (e) filmes não tratados foram considerados como controle negativo. Áreas com tendências elásticas estão representadas por tons mais claros em escala de cinza e áreas com tendências

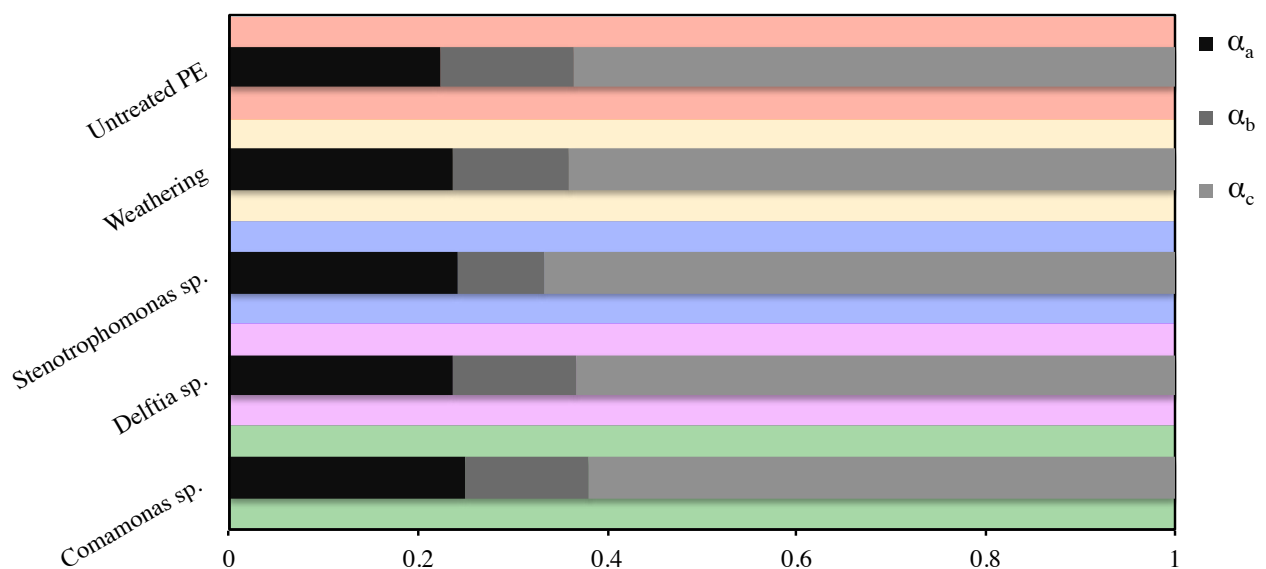
viscosas por tons mais escuros. Barras laterais indicam a distribuição dos ângulos de fase da oscilação do *cantilever*. (f) Percentual da contribuição do componente viscoso nos filmes de PE submetidos por 90 dias a tratamentos bióticos (azul, magenta, verde) ou abiótico (amarelo) em contraste a filmes não tratados (vermelho).

Paralelamente, os dados quantitativos da viscoelasticidade dos controles negativos revelam que estes apresentam em torno de  $59,9 \pm 10,4$  % (média  $\pm$  EP,  $n = 10$ ) de suas áreas constituídas por regiões viscosas. O tratamento biótico desses materiais mostrou-se capaz de reduzir o total da área viscosa para até  $31,9 \pm 4,9$  %, superando, inclusive, a redução para  $39,9 \pm 5,9$  % induzida pelo tratamento abiótico, consistindo em uma dramática redução de 46,7 % provocada pela ação microbiana (**Figura 17f**). Ainda, a análise da distribuição dos ângulos relacionados ao avanço ou atraso da fase da onda relacionada à trajetória desenvolvida pelo *cantilever* (sonda constituinte do microscópio, a qual é responsável pela varredura da amostra) mostrou uma forte tendência à alteração partindo de uma distribuição ampla e bimodal no controle negativo, para um padrão de distribuição estreito após ambos os tratamentos, confirmando os resultados obtidos por meio da análise quantitativa e qualitativa das imagens de contraste de fase.

Finalmente, com o objetivo de acessar e confirmar as modificações físico-químicas e morfológicas sofridas pelos filmes de PE submetidos aos tratamentos, as proporções dos principais arranjos estruturais caracterizados pelas fases cristalina-ortorrômbica (ou cristalina;  $\alpha_c$ ), *melt-like* isotrópica amorfa (ou amorfa;  $\alpha_a$ ) e anisotrópica-desordenada (ou interfase;  $\alpha_b$ ) foram estimadas por meio da técnica de espectroscopia Raman. O conteúdo relativo dessas frações é descrito por  $\alpha_a + \alpha_b + \alpha_c = 1$ , sendo os valores referentes a  $\alpha_a$ ,  $\alpha_b$  e  $\alpha_c$  determinados a partir da intensidade integral de picos de absorção específicos do espectro Raman dos filmes de PE. Esses picos de absorção estão compreendidos nas regiões espectrais relacionadas aos modos vibracionais de estiramento do C–C ( $1062\text{--}1129\text{ cm}^{-1}$ ) e de torção ( $1250\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ ) e dobramento do  $\text{--CH}_2\text{--}$  ( $1390\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ ). Em particular os picos de absorção referentes aos números de onda  $1416\text{ cm}^{-1}$  e  $1080\text{ cm}^{-1}$  foram considerados para estimar as frações cristalina e amorfa, respectivamente. Nesse sentido, a vibração torcional foi utilizada como padrão interno de cada filme analisado, tendo em vista que esse modo vibracional não responde a mudanças conformacionais e que as intensidades integrais dos picos constituintes dessa região são proporcionais à soma de todas as fases. Com base nas frações previamente estabelecidas para padrões, um PE totalmente cristalino ( $\alpha_c = 1$ ; intensidade integral da banda de absorção referente a  $1416\text{ cm}^{-1}$  de 0,46) e outro totalmente amorfo ( $\alpha_a = 1$ ; intensidade integral da banda de absorção referente a  $1080\text{ cm}^{-1}$  de 0,79), e levando-se em consideração os padrões

internos de cada filme, foi possível calcular a massa relativa das frações  $\alpha_a$ ,  $\alpha_b$  and  $\alpha_c$  dos filmes de PE biodegradados e dos controles.

Assim, por meio desse cálculo, constatou-se que todos os tratamentos (bióticos e abiótico) induziram um aumento na fração amorfa do PE, de modo que a fração mais impactada foi a de interfase (**Figura 18**). Filmes de PE incubados com *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. apresentaram redução na fração cristalina em oposição ao apresentado pelos filmes incubados com *Stenotrophomonas* sp., nos quais observou-se um aumento considerável nessa fração. Por sua vez, os filmes submetidos ao tratamento abiótico apresentaram aumento discreto na fração cristalina, além do aumento significativo na fração amorfa e da redução da fração de interfase.



**Figura 18.** Massa relativa da fração da matéria nas fases isotrópica-amorfa ( $\alpha_a$ ), anisotrópica-desordenada ( $\alpha_b$ ) e ortorrômbica-cristalina ( $\alpha_c$ ) dos filmes de PE antes (vermelho) e depois dos tratamentos abiótico (amarelo) e bióticos (*Comamonas* sp.: verde, *Delftia* sp.: magenta, *Stenotrophomonas* sp.: azul), calculada a partir da Espectroscopia Raman.

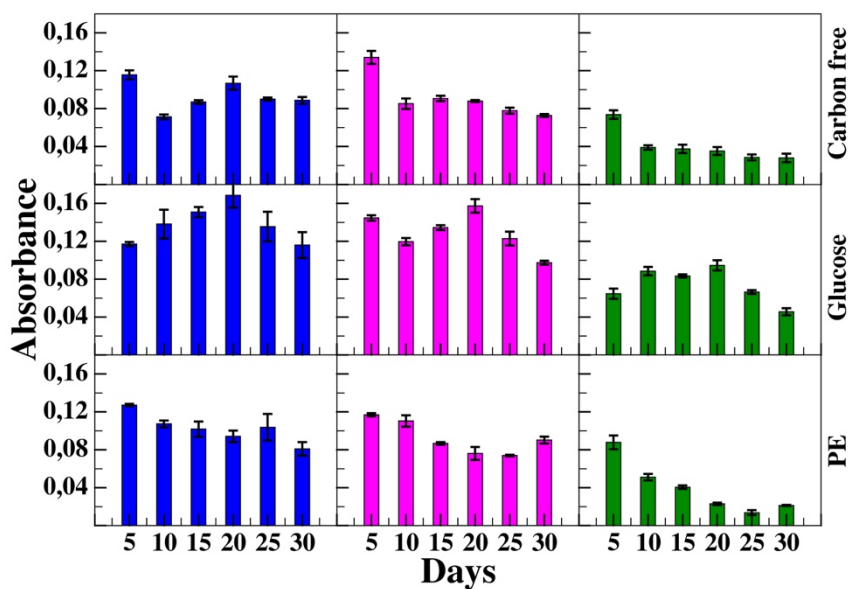


Para o estudo do metabolismo de PE por parte dos 9 microrganismos biodegradadores isolados, foram selecionados um representante de cada um dos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* (PE63, PE138 e PE591, respectivamente) a fim de possibilitar análises experimentais mais aprofundadas acerca dos mecanismos moleculares empregados por estes nesse processo. Como diretriz principal dessa seleção, foram considerados os espectros de FTIR dos filmes de PE biodegradados que apresentaram maior modificação química quando comparados ao controle negativo. Esse resultado foi crucial para o estudo, tendo em vista que revelou a formação de novas espécies químicas induzida pelos microrganismos biodegradadores.

Dentre essas espécies químicas, destaca-se a formação de grupos nitro, a qual ainda não havia sido relacionada à atividade microbiana (**Figura 14**, 1500–1600  $\text{cm}^{-1}$ ). Tais modificações químicas são bastante promissoras no contexto da biodegradação por contribuírem para a redução da hidrofobicidade e da massa molecular, as principais barreiras físico-químicas no que tange a ocorrência desse processo degradativo. Especula-se que essa modificação oxidativa seja consequência do metabolismo de nitrogênio desses organismos. Nesse contexto, as células aderidas aos filmes de PE estariam sintetizando óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), o qual difunde-se pela membrana externa para a interface imediata entre a célula e o PE. No meio extracelular, o NO seria oxidado pelo  $\text{O}_2$  ao radical bastante reativo dióxido de nitrogênio ( $\bullet\text{NO}_2$ ), que ataca a cadeia carbônica do PE acarretando a formação dos grupos nitro ao longo da molécula deste (**Figura 14**).

Em nível celular, existem dois principais mecanismos para a produção biótica de NO: a partir da (i) oxidação da amônia (fonte de nitrogênio disponível no MMM) a nitrito, que é subsequentemente reduzido a NO, e da (ii) síntese deste a partir da conversão da L-arginina a L-citrulina catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS). Diante do exposto, investigou-se a presença de nitrito nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. por meio do método de Griess. Essa estratégia permitiu a detecção e a quantificação de nitrito em todas as culturas analisadas, cujas concentrações atingiram até 5  $\mu\text{M}$  ao longo dos 30 dias de análise. Interessantemente, observou-se um perfil distinto da produção de nitrito nas diferentes condições de cultivo (ausência de fontes de carbono, presença de PE ou presença de glicose) ao longo desse período de incubação. Esse perfil de produção aparenta ser proporcionalmente compartilhado entre as três estirpes e, embora as concentrações sejam específicas a cada uma destas, este aparenta seguir uma tendência similar para os microrganismos ao longo do cultivo em função de cada uma das três condições investigadas (**Figura 19**). Para as culturas em limitação de carbono, a produção de nitrito tende a diminuir ao

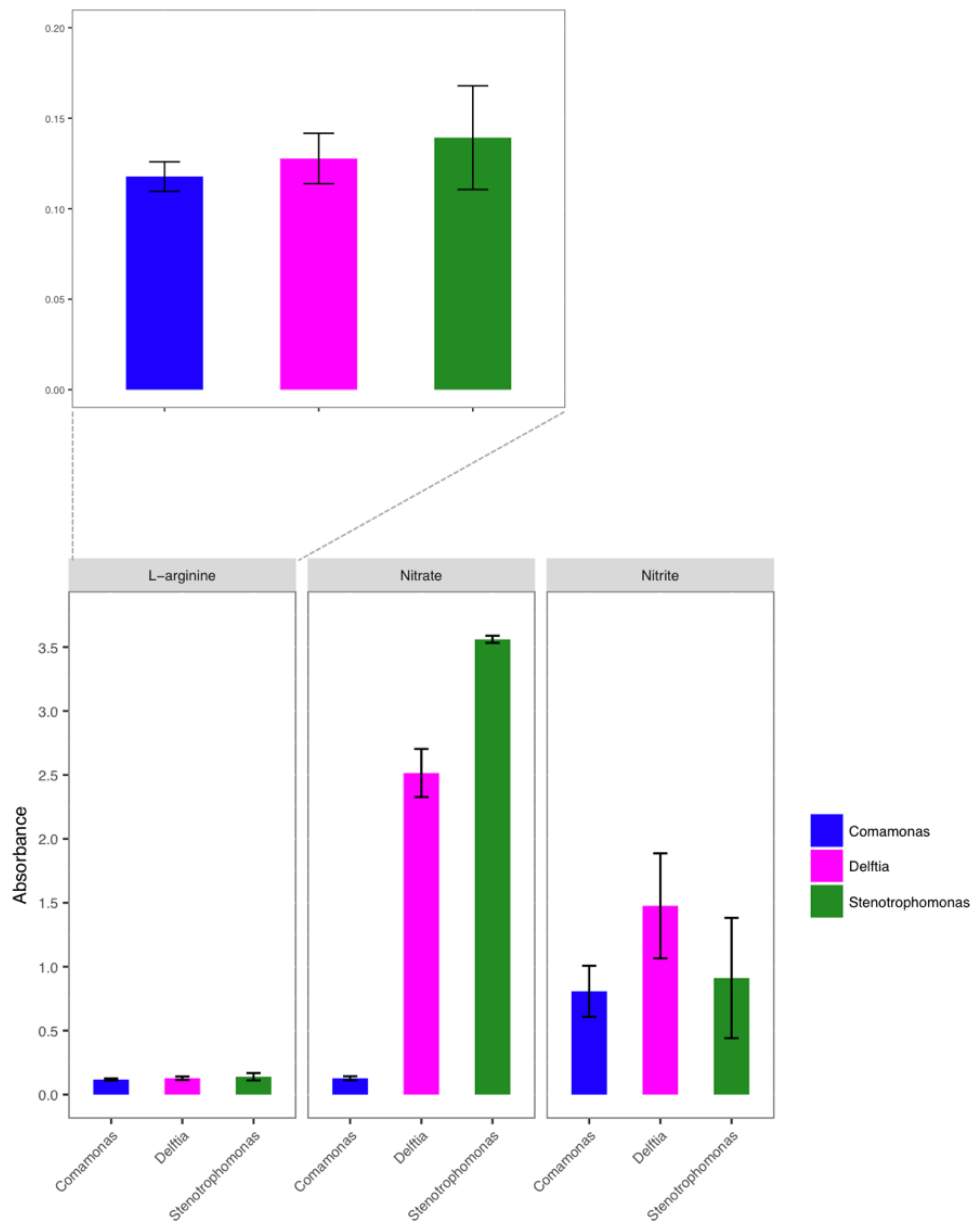
longo dos 30 dias. Nas culturas contendo glicose, a produção é crescente até o vigésimo dia, decrescendo nos dias posteriores. No entanto, o comportamento da curva de produção de nitrito nas culturas contendo PE é bastante particular: observa-se um padrão semelhante ao das culturas em limitação de carbono até em torno do vigésimo dia e, em seguida, a concentração de nitrito volta a aumentar. O nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) também foi quantificado por meio da adição de cloreto de vanádio à reação de Griess, mas não foi constatada a presença dessa molécula em nenhuma das culturas, o que descarta a possibilidade de a possível síntese de óxido nítrico a partir do nitrito ser desviada por meio da ação da nitrito oxidoreductase (NXR).



**Figura 19.** Quantificação pelo método de Griess de nitrito produzido por *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) ao longo de 30 dias de cultivo em MMM contendo PE (PE) ou glicose (glucose) como única fonte de carbono ou na ausência de fontes de carbono (carbon free). Não foram observadas concentrações significativas de nitrato em nenhuma das culturas.

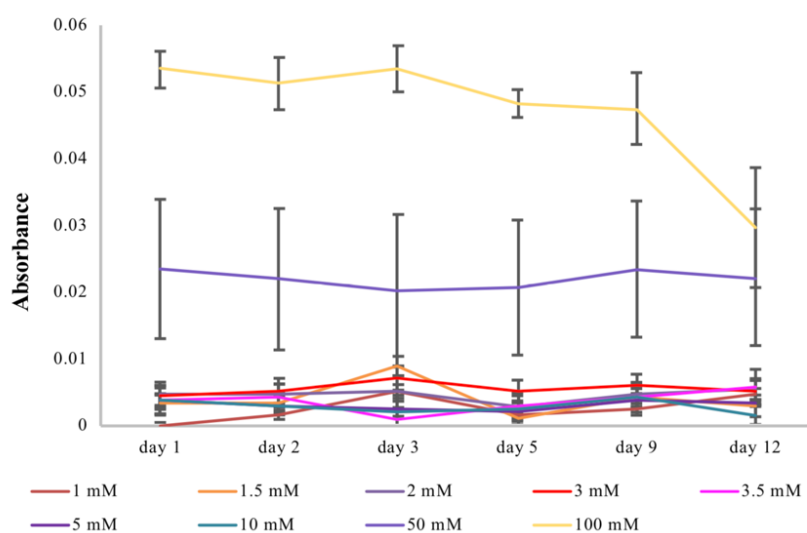
A presença de fontes alternativas de nitrogênio no MMM impactou substancialmente a produção de nitrito principalmente em *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. (**Figura 20**). Na presença de nitrato, estas 2 estirpes apresentaram alta produção de nitrito, o que revela a atuação de nitrato redutases que catalisam a redução do nitrato a nitrito. Também foi observado que esses microrganismos, em especial *Delftia* sp., assimilaram nitrito com mais eficiência. A presença de nitrito nas culturas contendo L-

arginina foi confirmada para os 3 microrganismos, sendo esta bastante similar ao observado nas culturas contendo amônia. O catabolismo de L-arginina produz amônia e, portanto, esta poderia ser, então, oxidada a nitrito (Schneider *et al.*, 1998). Ademais, outros estudos baseiam-se na quantificação do nitrito a fim de estimar indiretamente a produção de NO, tendo em vista que aquele é um dos produtos da estabilização deste (Tiso & Schechter, 2015).



**Figura 20.** Quantificação pelo método de Griess de nitrito produzido por *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) ao longo de 5 dias de cultivo em MMM sem amônia contendo L-arginina (L-arginine), nitrato (Nitrate) ou nitrito (Nitrite) como fontes de nitrogênio. O cultivo contendo nitrito reflete o consumo deste durante a incubação.

Para avaliar se a síntese de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é um efeito abiótico, ou seja, decorrente da oxidação da amônia mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS), diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foram adicionadas ao MMM e a consequente formação de nitrito foi estimada por meio da quantificação deste (Figura 21). A ativação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ocorre na presença de um metal de transição (e.g. ferro ou manganês) catalisador, o qual converte essa molécula a um oxidante mais ativo (Grigoropoulou *et al.*, 2003). Por meio do mecanismo da reação de Fenton ( $\text{Fe}_2^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}_3^+ + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ ), o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é oxidado pelo ferro redox ativo a radicais hidroxil, que mediarão a síntese de nitrito. Dessa maneira, constatou-se que as concentrações de nitrito mensuradas nas soluções mais concentradas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50 mM e 100 mM) atingiram valores abaixo de  $2 \mu\text{M}$ , o que não é consistente com as concentrações de nitrito quantificadas nas culturas desses organismos nem com possíveis concentrações fisiológicas desse oxidante (Figura 19). Esses resultados sugerem a possibilidade de que esse efeito oxidativo seja mediado por catálise enzimática, que resultaria em uma produção otimizada desse produto, justificando, assim, as altas concentrações de nitrito observadas *in vitro*.



**Figura 21.** Quantificação de nitrito produzido a partir da oxidação abiótica de amônia em soluções de MMM contendo diferentes concentrações de 1 a 100 mM peróxido de hidrogênio ao longo de 12 dias

Semelhantemente, a oxidação de amônia mediada por mecanismos enzimáticos foi investigada por meio de ensaios enzimáticos das frações proteicas intracelulares (lisados celulares) dos biodegradadores cultivados nas três condições descritas anteriormente. Com base nesses ensaios, observa-se que a produção de nitrito mediada pelas enzimas intracelulares foi consistente

com aquela observada nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp., sugerindo que a oxidação de amônia seja facilitada por esses catalisadores biológicos (Figura 22). No entanto, a identificação dessas enzimas ainda não foi realizada, sendo necessárias investigações posteriores que visem a determinar quais são as efetivas responsáveis por esse processo. Embora a produção de nitrito aparente estar reduzida nos ensaios realizados a partir das culturas de PE, isso pode ser decorrente da menor efetividade da lise celular nestas, tendo em vista que as células destas se encontram na forma de biofilmes e fortemente aderidas à superfície do polímero. A resistência conferida pelos biofilmes formados na superfície do PE acarreta maior dificuldade na lise dessas bactérias, justificando a presença de menor quantidade de enzimas disponíveis para atuar nesse processo oxidativo.

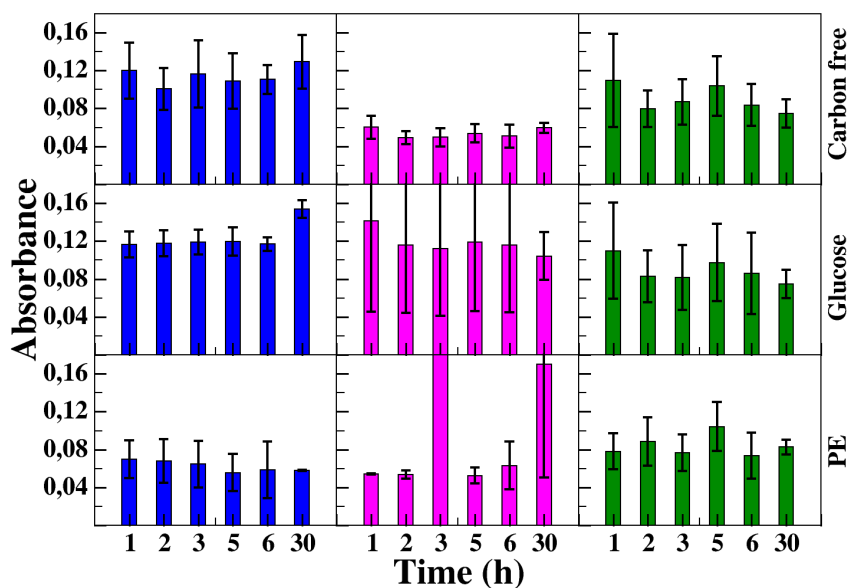


Figura 22. Quantificação pelo método de Griess de nitrito produzido a partir de frações lisadas de células de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) após 5 dias de cultivo em MMM contendo PE (PE) ou glicose (glucose) como única fonte de carbono ou na ausência de fontes de carbono (*Carbon free*).

Em seguida, a formação de NO nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foi estimada acessando-se tanto a atividade em tempo real de enzimas envolvidas com a formação desse produto, quanto o NO extracelular presente nos sobrenadantes dessas culturas. Essa estratégia permitiu a detecção de NO liberado nos sobrenadantes (Figura 23a), além da presença de atividade em enzimas intracelulares envolvidas na formação desse radical (Figura 23b). De acordo com os

resultados, podemos constatar um efeito bastante similar em relação à produção de nitrito nas culturas contendo PE, de modo que a produção de NO reduz progressivamente até o décimo quinto dia e, em seguida, torna a aumentar. Esse padrão foi observado em todas as culturas sob as três diferentes condições, e, aparentemente, o aumento na produção de NO ocorre mais rapidamente nas culturas contendo PE (Figura 23a). Em contraste ao que se observou em relação à produção de nitrito, as culturas de *Comamonas* sp. mantidas na ausência de fontes de carbono apresentaram as mais levadas produções de nitrito, seguido pelas culturas contendo glicose como fonte de carbono e, por último, pelas culturas contendo PE. Em contrapartida, *Delftia* sp. apresenta a maior produção de NO na presença de PE, enquanto nas outras duas condições observou-se produção similar. *Stenotrophomonas* sp., por sua vez, apresentou a maior produção de NO na presença de glicose. Embora *Delftia* sp. apresente a maior produção de NO constatada extracelularmente (Figura 23a), principalmente na presença de PE, a quantificação intracelular revelou a menor produção de NO em comparação às duas outras estirpes (Figura 23b). Isso pode ser justificado como consequência do período de incubação de uma hora com o fluoróforo, o suficiente para que este seja degradado por meio do metabolismo de aromáticos. Ressalta-se, ainda, a instabilidade dos fluoróforos e do NO, que é um gás de alta reatividade, o que dificulta a precisão dessa detecção, impondo a esta potenciais variações podendo, inclusive, induzir erros relacionados à subestimação da produção de NO. Por esse motivo, os resultados dessa quantificação foram considerados apenas qualitativamente e em conjunto a outras análises.

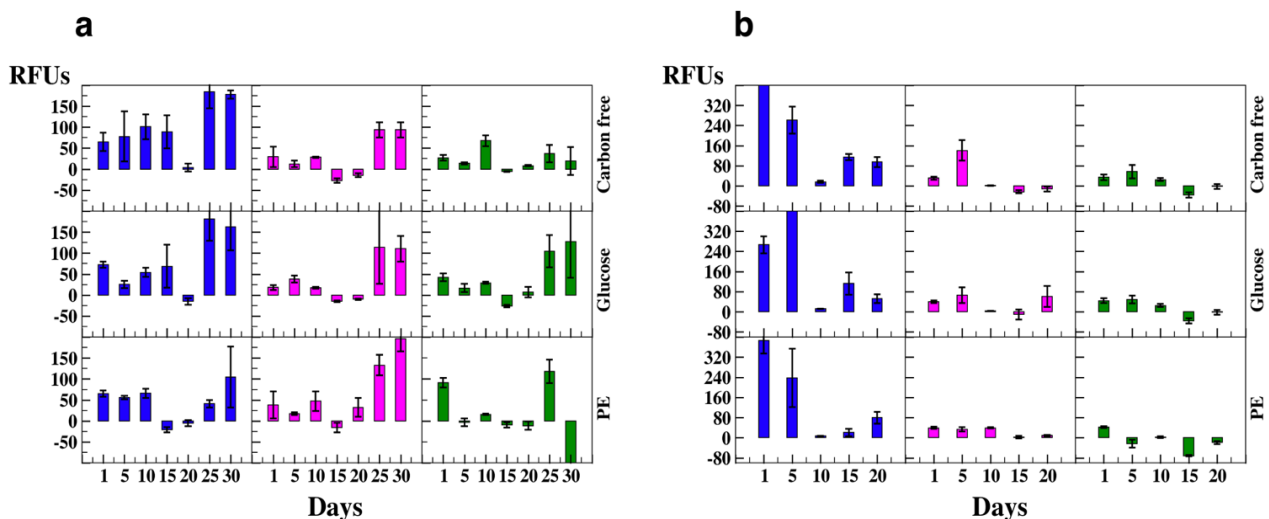


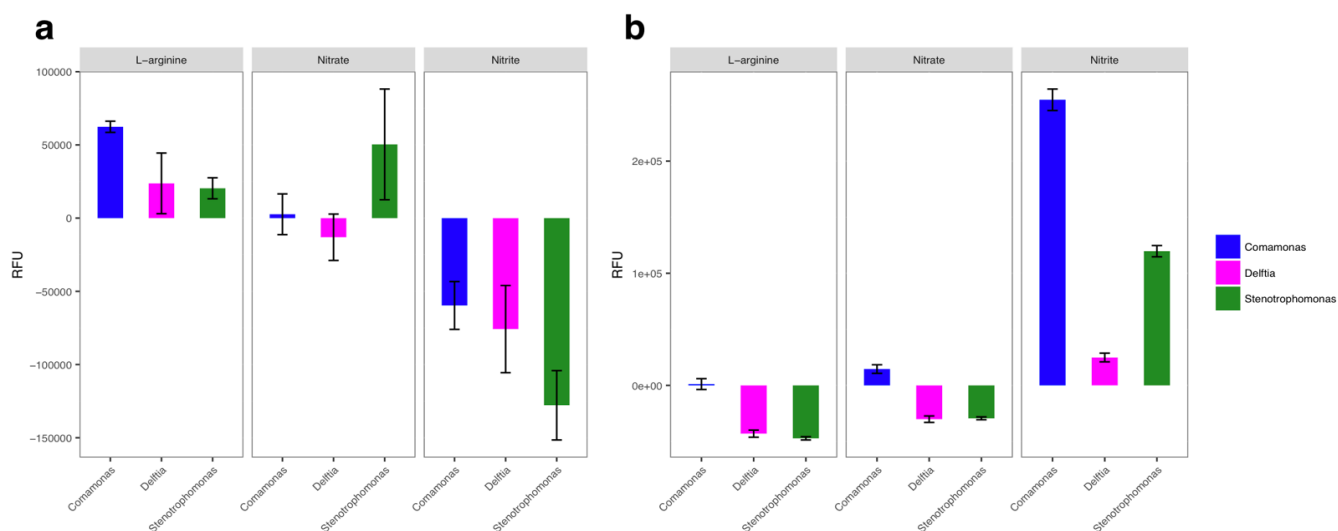
Figura 23. Produção de óxido nítrico mensurada em unidades relativas de fluorescência (RFU) (a) nos sobrenadantes e (b) intracelularmente em tempo real a partir de culturas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp.

(verde) em MMM sem fontes de carbono (Carbon free) e contendo PE (PE) ou glicose (Glucose) como fonte de carbono mantidas por 30 dias (Days). Os valores de RFU estão representados na escala de  $\text{RFU} \cdot 10^{-3}$ .

O cultivo desses microrganismos na ausência de carbono e na presença de outras fontes de nitrogênio além da amônia revelou importantes *insights* acerca dos mecanismos metabólicos envolvidos na produção de NO (**Figura 24**). Primeiramente, ressalta-se que o DAF-FM diacetato emitiu o dobro de fluorescência nos MMM livres de células (branco) contendo nitrito em relação aos meios contendo L-arginina e nitrato. Similarmente, o DAF-FM emitiu fluorescência de intensidade de quase 6 vezes maior nos MMM livres de células (branco) contendo nitrito em relação aos contendo L-arginina e aproximadamente 2,5 vezes maior do que a observada nos meios contendo nitrato. Isso sugere não apenas a presença de afinidade entre o DAF-FM diacetato e o NO com a consequente emissão de fluorescência, como também a ocorrência de quimiodenitrificação, justificando a elevada emissão de fluorescência observada no branco do DAF-FM na presença de nitrito (**Figura 24a**). Ademais, o NO produzido abioticamente no MMM contendo nitrito acumula-se neste, já que não sofre a ação enzimática de mecanismos de resposta ao estresse nitrosoativo ou de outros processos metabólicos decorrentes da presença de células microbianas (**Figura 24a**). Isso pode justificar a aparentemente maior presença de NO nos brancos desse meio em relação às culturas deste.

A presença de NO nos sobrenadantes das culturas das três estirpes na presença de L-arginina como fonte de nitrogênio sugere a atividade catalítica de óxido nítrico sintases na síntese desse radical (**Figura 24a**). Por sua vez, a produção de NO mensurada com DAF-FM diacetato (**Figura 24b**) nas culturas contendo nitrito pode sugerir tanto a atuação de nitrito redutases como catalisadoras da redução do nitrito, como também a produção abiótica de NO mediada pela síntese de nitrito por meio da quimiodenitrificação. Tendo em vista a quantificação anômala de NO por meio do DAF-FM diacetato referente às culturas de *Delftia* sp., subentende-se a ocorrência de uma possível interferência metabólica na reação de deacetilação do DAF-FM diacetato a DAF-FM e na subsequente complexação deste com o NO. Assim, é possível que o metabolismo de *Delftia* sp. incorra na degradação do DAF-FM diacetato durante a incubação de 1 hora, já que são observados nessas culturas valores inconsistentes de RFU, sendo estes muito baixos ou negativos. A produção de NO na presença de nitrato pode sugerir a atividade da nitrato redutase (**Figura 24**) já que esta catalisa tanto a redução do nitrato a nitrito, como do nitrito a NO, o que também reforça a interferência do metabolismo de *Delftia* sp. na quantificação de NO por meio do DAF-FM e DAF-FM diacetato, já que a produção de nitrito nas culturas contendo nitrato foi substancialmente alta (**Figura 20**), indicando a alta atividade da nitrato redutase nestas. O maior conteúdo de NO detectado por meio do DAF-FM e DAF-FM diacetato nos meios contendo nitrito e nitrato livres de células (brancos) pode revelar, também, uma baixa especificidade destes em relação ao NO, tendo em vista que esses fluoróforos podem estar se ligando a espécies

químicas transitórias relacionadas ao nitrito e nitrato disponíveis no meio, os quais são assimilados nas culturas e, portanto, apresentam menor concentração nestas.

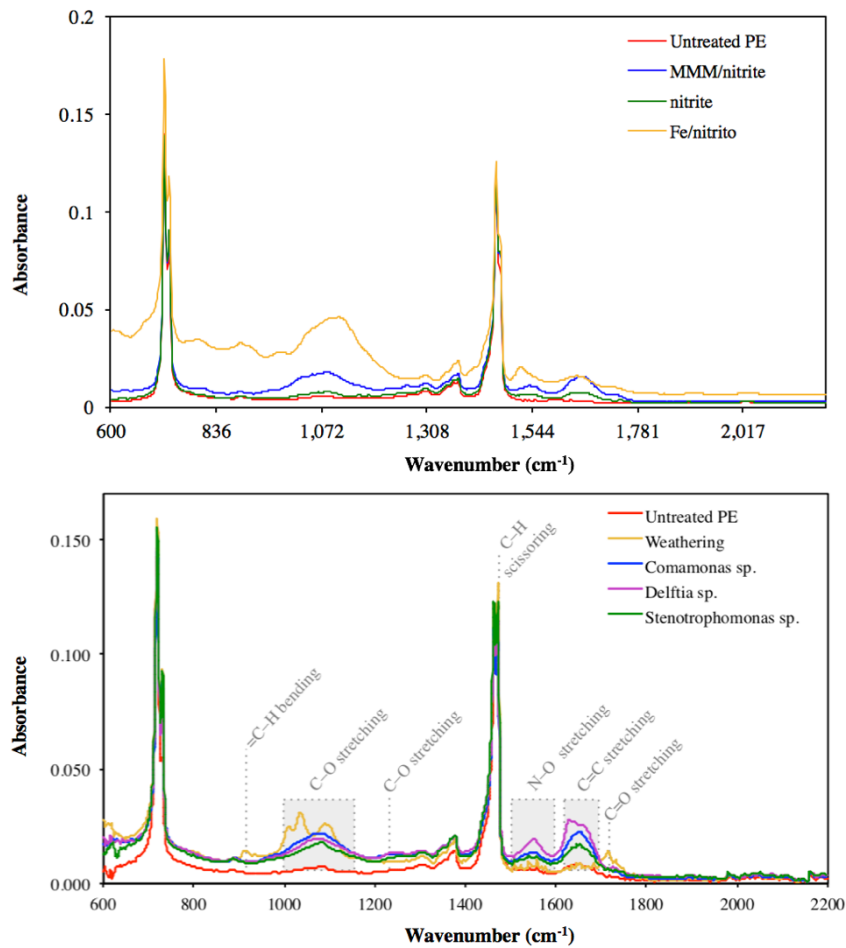


**Figura 24.** Produção de óxido nítrico mensurada (a) nos sobrenadantes e (b) intracelularmente em tempo real a partir de culturas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) incubadas por 5 dias em MMM sem amônia contendo L-arginina (L-arginine), nitrato (Nitrate) e nitrito (Nitrite) como fontes de nitrogênio.

Assim como o nitrito, o NO também pode ser produzido abioticamente por meio da desnitrificação, reação que envolve a redução do nitrito a NO mediada por cátions divalentes em pH ácido ( $\text{NO}_2^- + \text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} \uparrow + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ ). De fato, foi detectada a produção de NO no MMM suplementado com 20 mM nitrito por meio do DAF-FM. Com a finalidade de investigar a produção de NO por meio desse mecanismo e os efeitos no PE mediados por este composto, filmes de PE foram expostos por 90 dias a soluções contendo (i) MMM suplementado com nitrito de sódio, (ii) sulfato de ferro e nitrito de sódio ou (iii) nitrito de sódio. O espectro FTIR dos filmes tratados com MMM suplementado com nitrito apresentou perfil bastante similar ao espectro dos filmes biodegradados, exceto pelos maiores picos de absorção deste em relação àquele (Figura 25). Isso sugere que o envolvimento do efeito oxidativo mediado pela produção de NO seja um fenômeno bastante relevante para a quebra e oxidação da longa cadeia



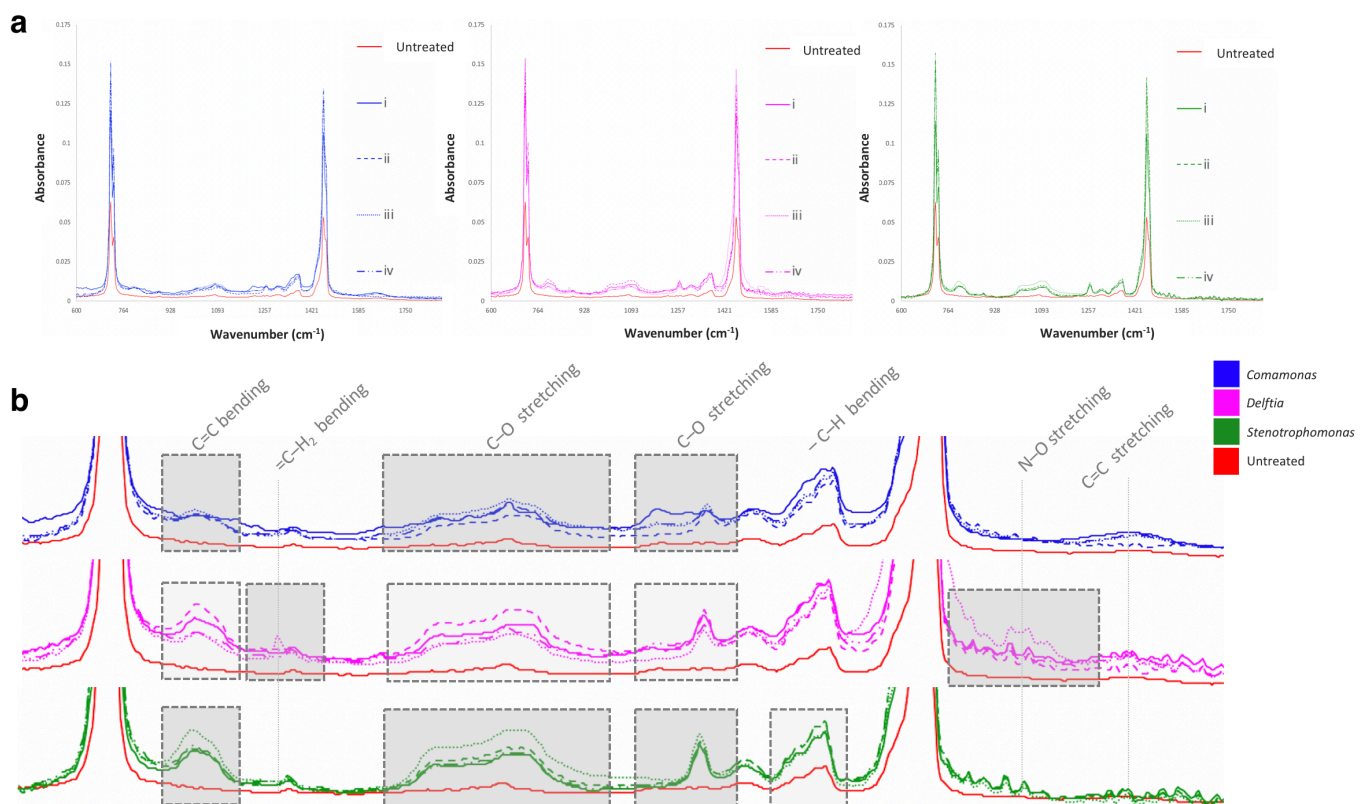
hidrofóbica do PE, possibilitando, assim, que os microrganismos consigam internalizar potenciais fragmentos gerados durante esse processo.<sup>3</sup>



**Figura 25.** Comparação entre os espectros FTIR de filmes de PE expostos aos produtos da reação de desnitrificação com filmes de PE biodegradados. Espectro FTIR dos filmes de PE submetidos a tratamentos abióticos com soluções de nitrito de sódio (verde), sulfato de ferro e nitrito de sódio (amarelo) ou MMM suplementado com nitrito de sódio (azul) em contraste a filmes não tratados (vermelho) (acima). Espectro FTIR dos filmes biodegradados por *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) ou *Stenotrophomonas* sp. (verde) (abaixo).

<sup>3</sup> Resultados a serem publicados em “The role of nitrogen metabolism in polyethylene biodegradation” (*in preparation*).

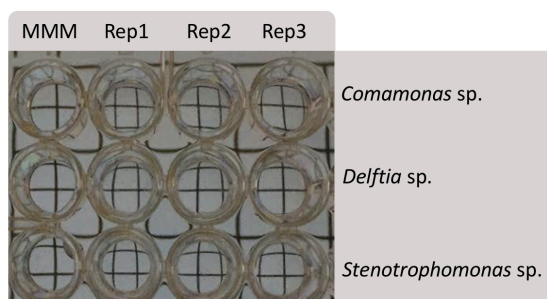
Para distinguir os efeitos da modificação oxidativa decorrente de reações com espécies reativas, proteínas secretadas e proteínas transmembrana, foi realizado o cultivo desses organismos em aparatos contendo membranas semipermeáveis de policarbonato que permitam a difusão de proteínas e pequenas moléculas (e.g. espécies reativas) ou apenas de pequenas moléculas (Figura 11). Externamente a esse sistema de membranas, o filme de PE incluído no meio de cultura permitiu a avaliação do efeito exclusivo de enzimas extracelulares, tendo em vista que, devido à alta reatividade das espécies reativas, o efeito destas virtualmente restringe-se ao local de produção, ou seja, às proximidades das células, as quais estão confinadas entre membranas no interior do aparato e cercadas por filmes de PE. Assim, constatou-se que espécies reativas desempenham papel central na oxidação e na redução da massa molecular do PE, conforme exposto no espectro FTIR por meio da relevante formação de grupos alcóxi, acil e nitro, além das insaturações em posição terminal (Figura 26).



**Figura 26.** (a) Espectro FTIR dos filmes de PE submetidos aos tratamentos bióticos com *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) por 60 dias por meio do sistema de membranas, revelando os efeitos da ação direta do microrganismo em contato com o filme (i; linha contínua), bem como os efeitos da ação de enzimas extracelulares e ROS/RNS (ii; linha tracejada), de ROS/RNS (iii; linha pontilhada) e de enzimas extracelulares (iv; linha tracejada e pontilhada) nos polímeros

sintéticos. (b) Análise detalhada das regiões espectrais compreendidas entre 600 e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , enfatizando a relevante fragmentação oxidativa induzida por ROS/RNS (retângulos cinza escuro) e pela ação acoplada entre enzimas extracelulares e ROS/RNS (retângulos cinza claro). As principais modificações químicas induzidas pelos microrganismos e pelo metabolismo destes no PE indicam a fragmentação e a oxidação deste inferidas a partir da formação de insaturações (C=C bending), insaturações em posição terminal (=CH<sup>2</sup> bending), grupos alcóxi (C–O stretching), grupos acil (C–O stretching), grupos metil (–CH bending), grupos nitro (N–O stretching) e grupos vinileno (C=C stretching).

Em *Delftia* sp., observa-se que o efeito da atuação sinérgica entre ROS/RNS e enzimas extracelulares acarreta maior oxidação do PE, mas ROS/RNS induzem intensa fragmentação e formação de grupos nitro no polímero (**Figura 26**). Essas análises, portanto, confirmam o importante papel desempenhado pelas espécies reativas no contexto da biodegradação. Não obstante fosse esperado que o contato direto entre as bactérias e o PE induzisse maior grau de fragmentação oxidativa devido às maiores concentrações de enzimas e espécies reativas na superfície polimérica, o consumo microbiano dos produtos gerados acarreta a aparente redução das bandas de absorção do espectro FTIR do PE (**Figura 26**). Adicionalmente, a presença de biosurfactes que assistam no processo de adesão e interação enzimática ao PE foi acessada por meio de testes em microplacas de 96 poços (Vaux & Cottingham, 2007). A partir dessa análise qualitativa, foi possível detectar a presença de surfactantes nos sobrenadantes das culturas contendo filmes de PE relativas às três estirpes estudadas (**Figura 27**).



**Figura 27.** Teste em microplaca da presença de biosurfactantes nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. em três réplicas biológicas (Rep1; Rep2; Rep3) em contraste ao controle negativo (MMM), revelando a presença dessas moléculas em todas as culturas investigadas.

### Caracterização genômica dos biodegradadores de PE

Diante da grande complexidade do metabolismo microbiano e da grande pluralidade de processos que podem estar influenciando a modificação química extracelular do PE e a consequente oxidação intracelular deste, é necessário acessar o potencial metabólico completo inerente a cada um desses organismos a fim de identificar possíveis vias e mecanismos específicos envolvidos na biodegradação. Nesse sentido, estudos em nível genômico e transcritômico fornecem diretrizes acerca do panorama geral das estratégias degradativas empregadas por esses organismos. Essas diretrizes, por sua vez, podem fundamentar análises experimentais específicas, permitindo isolar as possíveis variáveis atuantes nesse complexo processo a fim de avaliá-las experimentalmente de maneira mais específica e direcionada. Tais estratégias permitem identificar os genes e vias metabólicas ativos, bem como a interação entre estes, em função da presença de PE quando comparadas a condições nutricionais ótimas (glicose como fonte de carbono) e condições de estresse devido à limitação de carbono (ausência de fontes de carbono).

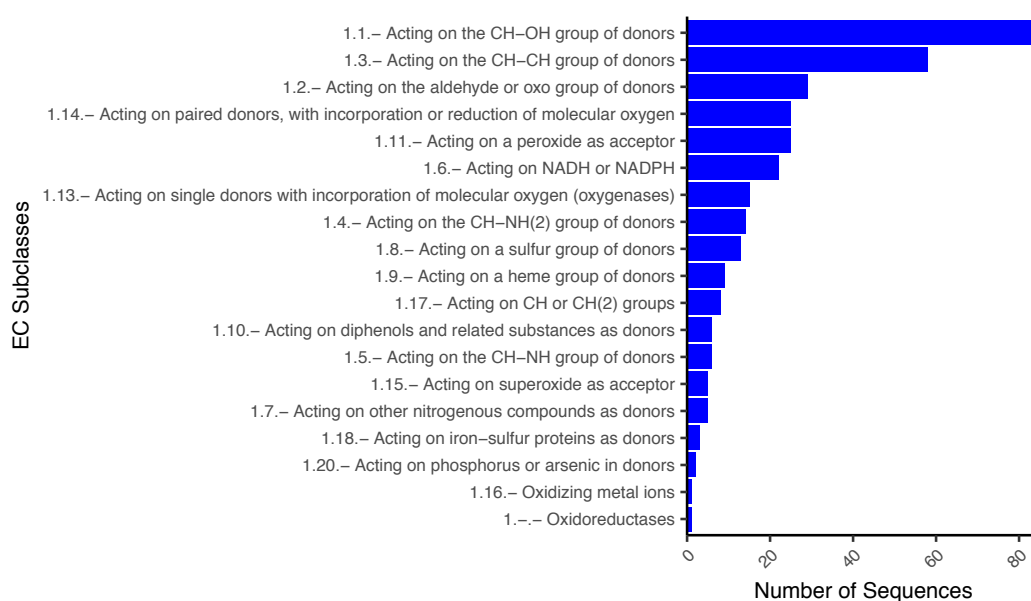
Na tentativa de desvendar o processo metabólico do PE, o acesso ao potencial degradativo desses organismos foi iniciado a partir da análise dos seus genomas. Para tanto, os genomas completos dos isolados biodegradadores de PE foram sequenciados (**Tab. 4**), e os *reads* gerados foram submetidos a análises de qualidade pelo programa FastQC. As coberturas dos sequenciamentos dos genomas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foram de ~743X, ~525X e ~804X respectivamente, sendo estes, assim, qualificados para as análises posteriores tendo em vista que superaram a cobertura mínima teórica necessária de 50X. A qualidade mínima estabelecida para as bases constituintes dos *reads* foi de 20 na escala *Phred*, o que corresponde à probabilidade de 1 erro a cada 100 bases, de modo que as porções dos *reads* que apresentaram ao menos 8 bases consecutivas com média de qualidade inferior a esse valor foram removidas (trimadas). Os *reads* trimados, após serem novamente analisados por meio do programa FastQC (Anexo II), foram submetidos à montagem *de novo* pelo *pipeline* A5-miseq. Por meio desse *pipeline*, obteve-se um total de 5,4 Mb, 6,4 Mb e 4,8 Mb montados em 9, 22 e 18 *scaffolds* para *Comamonas* sp. (PE63), *Delftia* sp. (PE138) e *Stenotrophomonas* sp. (PE591), respectivamente (**Tab. 5**).

A partir dos *scaffolds* montados, foram anotados 5379 genes de *Comamonas* sp., 6033 genes de *Delftia* sp. e 4455 genes de *Stenotrophomonas* sp. (**Tab. 5**). A anotação revelou também a presença de vários genes que codificam enzimas da classe das oxidoredutases nos genomas dessas estirpes (**Figura 28**), além de vários genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio e síntese de óxido nítrico (**Figura 29**). Com isso, observa-se o potencial desses microrganismos para induzir a modificação química do PE, o que inclui a fragmentação e a oxidação deste. Adicionalmente, a descrição acerca das três categorias de ontologias (função

molecular, processo biológico e componente celular) dos genes anotados foi acessada a fim de estimar-se as características gerais dos prováveis mecanismos celulares que dirigem a fisiologia desses microrganismos (Figura 30; Figura 31; Figura 32).

**Tabela 4.** Relatório do sequenciamento dos DNAs totais de *Comamonas sp.*, *Delftia sp.* e *Stenotrophomonas sp.* pelo sistema Miseq (2 x 300 bp paired-end) da plataforma Illumina.

Microrganismo	Total de bases dos <i>reads</i> (bp)	Total de reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
<i>Comamonas sp.</i>	3.712.496.122	12.374.998	64,949	35,05	74,003	58,350
<i>Delftia sp.</i>	2.613.121.254	8.720.810	67,177	32,82	73,307	57,668
<i>Stenotrophomonas sp.</i>	4.019.163.037	13.411.628	66,975	33,03	73,191	57,483



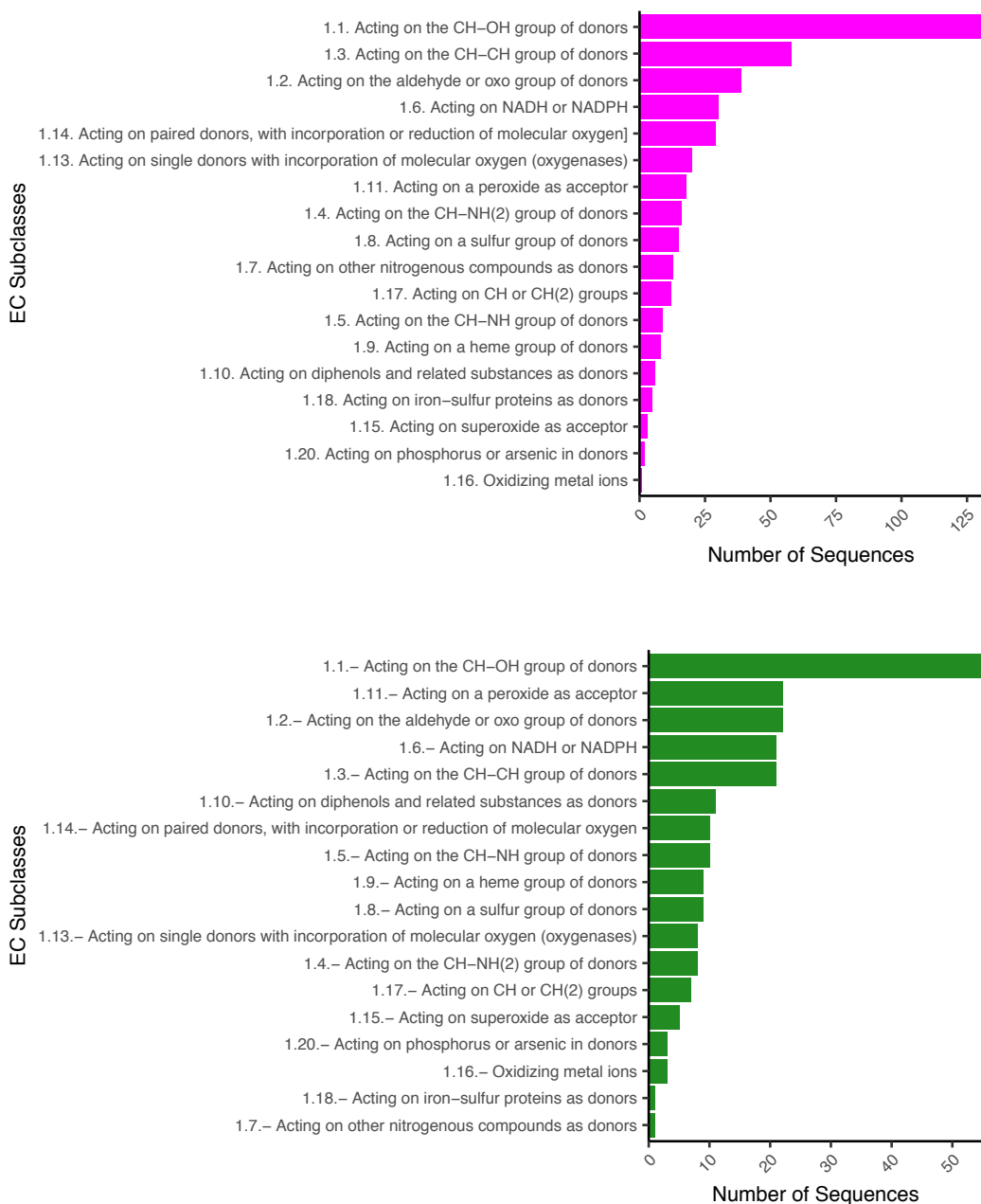


Figura 28. Distribuição dos EC numbers relativos à classe das oxidorreductases anotados a partir dos genomas de *Comamonas sp.* (azul), *Delftia sp.* (magenta) e *Stenotrophomonas sp.* (verde).

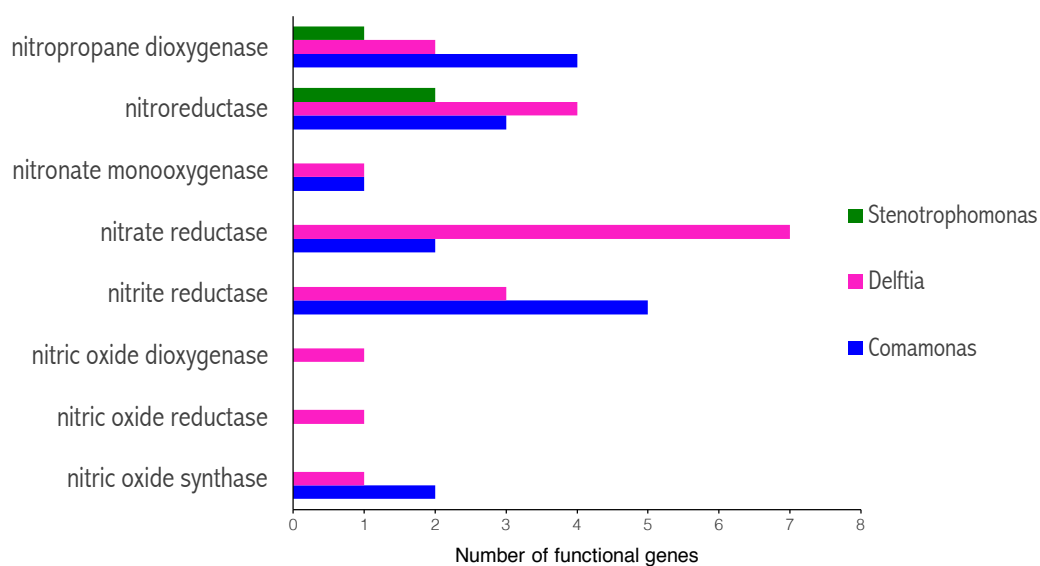
Os genomas anotados também foram comparados entre si a fim de inferir a possível presença de padrões genéticos que possam resultar no fenótipo de biodegradação. As análises comparativas entre o potencial gênico dos genomas dos três microrganismos foram realizadas com base na homologia entre os genes constituintes de cada um destes. Para tanto, criou-se um banco de dados a partir do genoma anotado de *Comamonas sp.* e, em seguida, realizou-se o alinhamento local das sequências

constituintes dos genomas de *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. contra as sequências do genoma de *Comamonas* sp., de modo a mapear os genes ortólogos compartilhados por essas bactérias. De acordo com essa análise, *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. compartilham 2075 genes codificadores de proteínas, enquanto *Stenotrophomonas* sp. e *Comamonas* sp. compartilham apenas 172. Isso é consistente com filogenia inferida a partir das sequências de 16S rRNA, a qual agrupa os membros dos gêneros *Comamonas* e *Delftia*, revelando maior similaridade entre estes. Sob a perspectiva da biodegradação de PE, esse resultado é particularmente interessante tendo em vista as similaridades nas modificações físico-químicas sofridas pelo polímero induzidas por esses organismos. Isso sugere a possibilidade de estes microrganismos compartilharem estratégias metabólicas semelhantes direcionadas pelos diferentes estímulos (limitação de carbono, presença de PE ou de glicose).

**Tabela 5.** Características gerais dos genomas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. após montagem dos *reads* e anotação das ORFs.

	Comamonas sp.	Delftia sp.	Stenotrophomonas sp.
Tamanho do genoma (Mb)	5,44	6,42	4,75
N50 (bp)	915.874	582.377	473.437
DNA codificador (Mb)	5,27	6,31	4,68
Conteúdo GC (%)	62,1	66,8	66,5
Total de <i>scaffolds</i>	9	22	18
Total de genes	5.379	6.033	4.455
Genes codificadores de proteínas	5.321	5.979	4.415
Genes codificadores de RNAs	58	54	40
Genes com domínios funcionais preditos	4806	5484	4126

Genes com função predita	4068	4569	3288
Genes relacionados a COGs	2572	2847	1908
Genes com domínios Pfam	4167	4790	3471
Genes com peptídeo sinal	1091	1205	1103
Genes com hélices transmembrana	1108	1268	1062
Genes CRISPR (confirmado)	1	5 (1)	11 (1)



**Figura 29.** Genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio e síntese de óxido nítrico anotados a partir dos genomas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde).

As ontologias relativas a funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares anotadas a partir desses genomas foram acessadas a fim de subsidiar a descrição do perfil funcional encriptado em seus materiais genéticos (**Figura 30**; **Figura 31**; **Figura 32**). Para isso, as GOs anotadas foram ordenadas com base no número total de genes funcionais contidos no genoma de cada microrganismo. As principais GOs foram então filtradas e analisadas posteriormente, sendo possível constatar a



presença não apenas de funções relacionadas a genes constitutivos, como também de importantes funções que possam conferir vantagens metabólicas no contexto da biodegradação de polímeros sintéticos, a exemplo de processos de degradação de compostos aromáticos, potencial redox e síntese de metabólitos secundários. De acordo com os dados experimentais, *Delftia* sp. apresenta o maior potencial degradativo de PE, seguida por *Comamonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. respectivamente. Logo, infere-se que a investigação comparativa das funções codificadas em seus genomas seja uma promissora estratégia para pressupor possíveis recursos metabólicos que as fazem prosperar, em maior ou menor grau, nesse processo. Entretanto, cabe ressaltar que nem todas as categorias GO foram recuperadas e, portanto, essa análise limita-se aos genes cujas funções foram identificadas durante a anotação funcional.

No geral, os processos biológicos (**Figura 30**) mais abundantes nos três organismos são relacionados a mecanismos de oxirredução, transcrição, transporte, transdução de sinal, metabolismo de proteínas, divisão celular, quimiotaxia e mecanismos de reparo do DNA, o que não é surpreendente tendo em vista que esses mecanismos garantem a viabilidade microbiana e são determinados por uma grande complexidade de parâmetros. Isolando o processo de transcrição como exemplo, a multitude de genes que devem ser transcritos a cada minuto em adição à enorme variedade de moléculas nesta envolvidas (e.g. tRNA, enzimas, fatores de transcrição) implica que um grande número de genes funcionais a esta relacionados esteja codificado no genoma microbiano. Processos como metabolismo de ácidos graxos, equilíbrio redox, ciclo do ácido cítrico e biossíntese de aminoácidos e nucleotídeos, embora críticos para a viabilidade celular, são constituídos por genes específicos e geralmente invariáveis, justificando, assim, a existência de um menor número absoluto de genes funcionais. No entanto, observa-se também, em menor escala, a presença de funções não-essenciais que abarcam possíveis estratégias metabólicas interessantes e diferenciais, como as relacionadas ao metabolismo secundário.

*Delftia* sp. e *Comamonas* sp. apresentam um total de genes relacionados a processos de oxirredução bastante superior ao apresentado por *Stenotrophomonas*., o que sugere um menor potencial desta em participar na fragmentação oxidativa do PE comparado àquelas. *Delftia* sp., por sua vez, aparenta apresentar maior *fitness*, tendo em vista o maior e mais variado número de potenciais estratégias metabólicas compreendidas no genoma desta. Alguns processos específicos destacam-se no contexto da biodegradação, a exemplo não apenas da oxirredução, como também do transporte, transdução de sinal, quimiotaxia e degradação de ácidos graxos de cadeia longa, os quais poderiam conferir maior efetividade e eficiência tanto na facilitação da fragmentação oxidativa do PE como na assimilação dos produtos gerados.

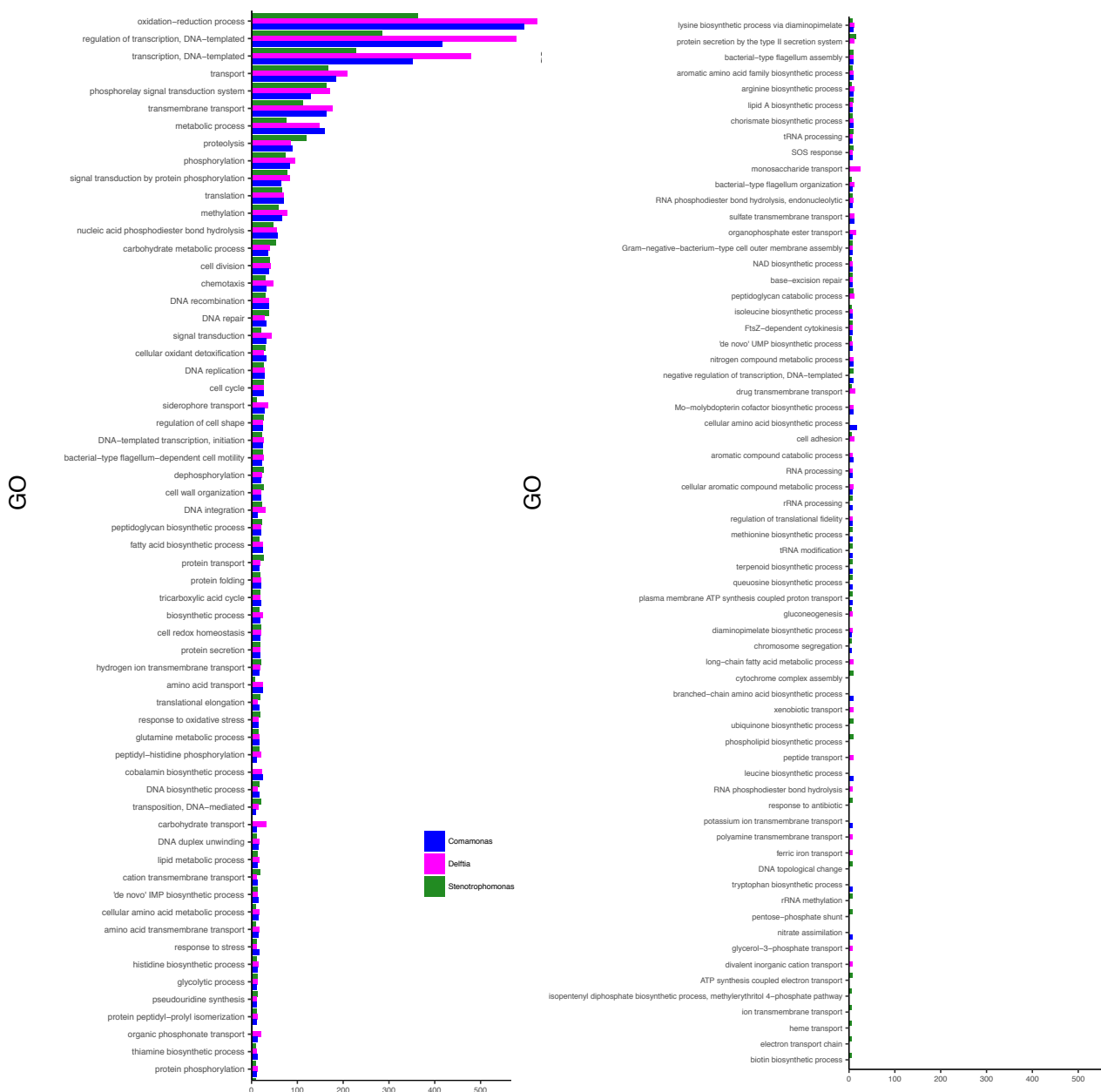
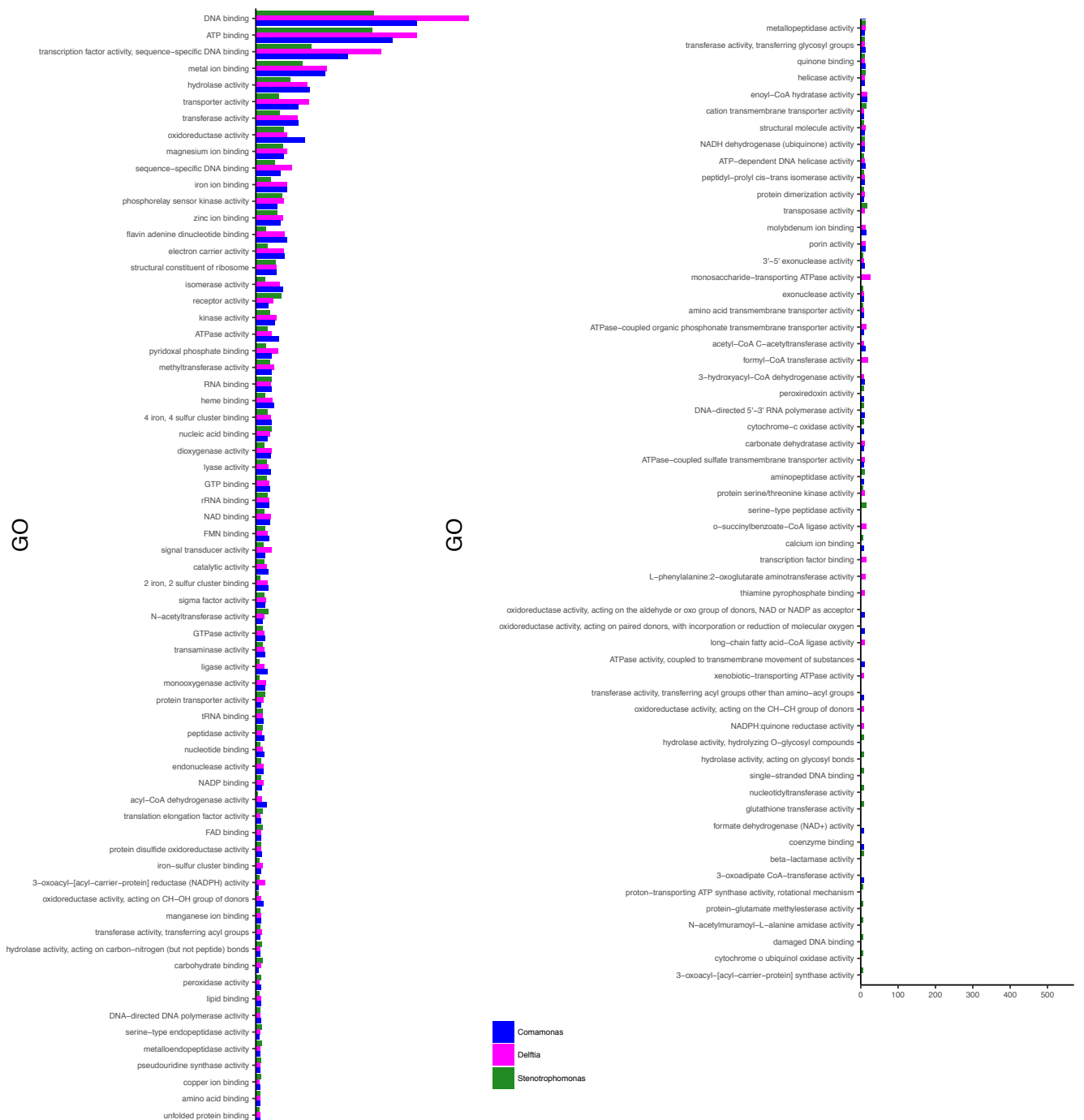


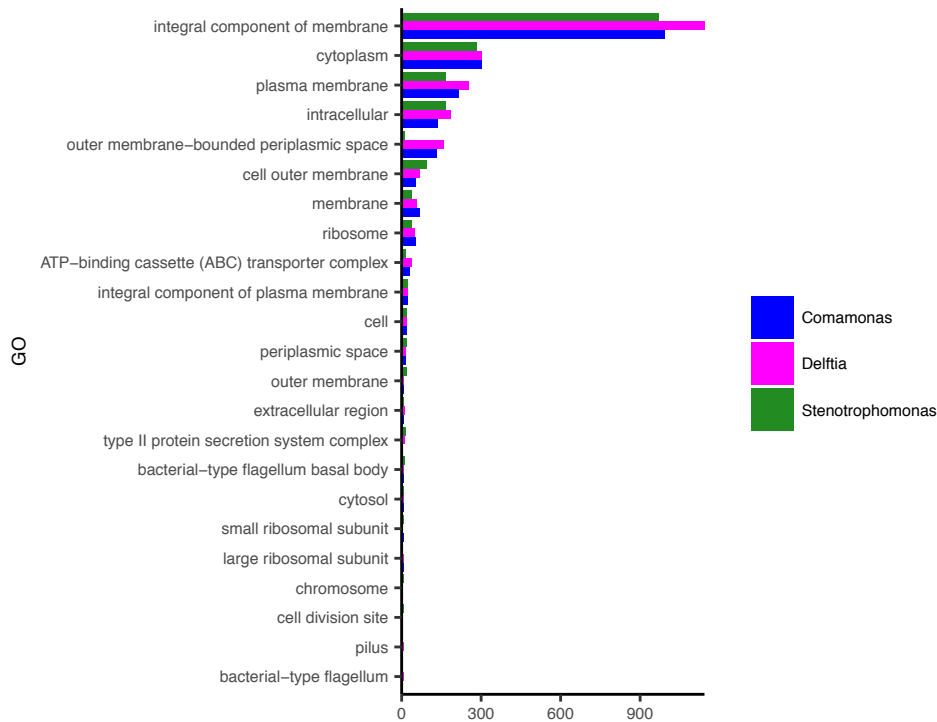
Figura 30. Contagem direta do número de sequências anotadas a partir dos genomas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) e as respectivas descrições dos processos biológicos (GO) a estas relacionadas.

As funções moleculares (Figura 31) revelam um maior número absoluto de genes que codificam oxidorreduções em *Comamonas* sp., seguida por *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. respectivamente, o que é consistente com os resultados inferidos a partir da espectroscopia FTIR. *Delftia* sp. apresenta um maior número de genes relativos a monoxigenases e dioxigenases, embora esse valor seja muito semelhante ao observado no genoma de *Comamonas* sp. Ambas apresentam potencial para degradação de

diferentes produtos derivados do metabolismo de ácidos graxos, e *Delftia* sp. possui em seu genoma maior número de genes que codificam proteínas especializadas na degradação de ácidos graxos de cadeia longa. Adicionalmente, esta apresenta genes relacionados a oxidorreduzases que utilizam elétrons doados por grupos CH–CH, o que pode ser particularmente interessante na oxidação de alcanos. A categoria referente a componentes celulares (Figura 32), por sua vez, indica que esta bactéria possui também o maior número de proteínas secretadas, as quais são primordiais para as etapas iniciais da biodegradação do polímero.



**Figura 31.** Contagem direta do número de seqüências anotadas a partir dos genomas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) e as respectivas descrições das funções moleculares (GO) a estas relacionadas.



**Figura 32.** Contagem direta do número de seqüências anotadas a partir dos genomas de *Comamonas* sp. (azul), *Delftia* sp. (magenta) e *Stenotrophomonas* sp. (verde) e as respectivas descrições dos componentes celulares (GO) a estas relacionadas.

**Caracterização transcritômica de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. no contexto da biodegradação de PE**

Tendo em vista que inferências genômicas apenas descrevem o potencial funcional, para inferir possíveis genes efetivamente envolvidos no processo biodegradativo procedeu-se às análises dos transcritos sintetizados por esses microrganismos. Essa abordagem permitiu investigar os genes ativos e expressos por estes, e não apenas o potencial gênico compreendido em seus genomas. Nesta, primou-se pelo entendimento do processo metabólico global de PE, incluindo todos os genes expressos na presença desse polímero e analisando a possível indução de determinados mecanismos metabólicos por parte

deste. Além disso, também foi possível estimar potenciais mecanismos de resposta microbiana à limitação de carbono, em face das informações disponíveis na literatura.

Os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foram acessados por sequenciamento dos mRNAs (RNA-seq) em três diferentes cenários: (i) presença de PE ou (ii) glicose como única fonte de carbono, ou (iii) ausência de fontes de carbono. Para tanto, os cultivos dessas bactérias nessas condições foram realizados em triplicatas biológicas por 2 e 20 dias, e, imediatamente antes da purificação dos RNAs totais, as culturas dos diferentes períodos foram combinadas constituindo uma única amostra. No total, foram sequenciadas 27 amostras, o que inclui as três estirpes bacterianas em triplicatas biológicas nos três diferentes cenários fisiológicos (Tab. 6). Após serem submetidos a filtros de qualidade, os *reads* resultantes foram alinhados contra os genomas anotados (mapeamento) e também montados *de novo* em *contigs* para a posterior anotação.

**Tabela 6.** Relatório do sequenciamento dos RNAs totais (RNA-seq) de *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591) pelo sistema Hiseq 4000 (2 x 100 bp paired-end) da plataforma Illumina.

Amostra	Total de bases dos reads (bp)	Total de reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
PE63 1	9,302,692,062	92,105,862	56.677	43.32	98.363	95.132
PE63 2	10,948,070,134	108,396,734	53.610	46.39	98.504	95.609
PE63 3	10,213,639,544	101,125,144	51.662	48.34	98.434	95.504
G63 1	8,681,013,630	85,950,630	59.087	40.91	98.384	95.060
G63 2	9,189,187,252	90,982,052	60.426	39.57	98.365	95.046
G63 3	10,075,050,374	99,752,974	53.895	46.1	98.544	95.701
63 1	8,119,607,756	80,392,156	51.569	48.43	98.403	95.438

---

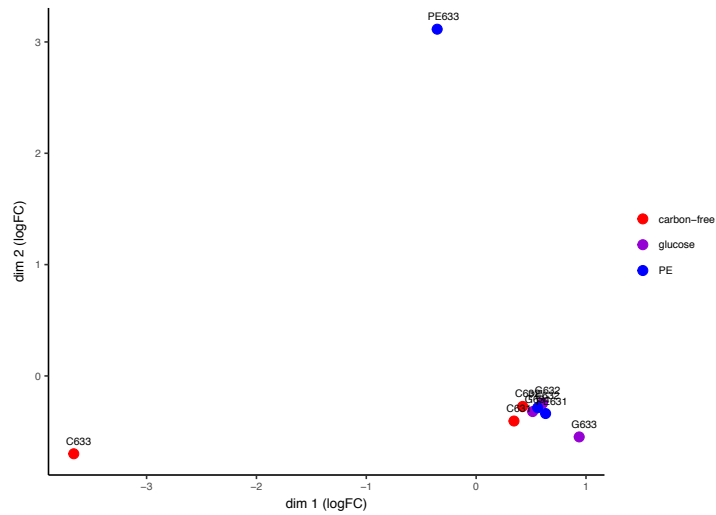
63 2	8,213,682,186	81,323,586	51.535	48.47	98.335	95.141
63 3	5,364,116,666	53,110,066	51.501	48.5	97.382	92.664
PE138 1	3,217,651,536	31,857,936	52.75	47.25	96.05	90.24
PE138 2	3,434,082,820	34,000,820	53.45	46.55	96.4	90.85
PE138 3	2,779,959,956	27,524,356	53.51	46.49	96.2	90.52
G138 1	3,288,937,942	32,563,742	52.44	47.56	96.97	92.15
G138 2	3,336,779,218	33,037,418	52.69	47.31	97.01	92.15
G138 3	3,197,078,846	31,654,246	53.52	46.48	97.05	92.26
138 1	3,230,989,192	31,989,992	53.75	46.25	96.6	91.37
138 2	2,928,064,740	28,990,740	53.43	46.57	96.93	92.02
138 3	2,723,871,828	26,969,028	53.64	46.36	96.83	91.81
PE591 1	2,642,127,276	26,159,676	54.51	45.49	96.48	91.03
PE591 2	3,671,086,188	36,347,388	54.27	45.73	96.73	91.59
PE591 3	3,533,820,522	34,988,322	54.29	45.71	95.59	89.37
G591 1	2,748,064,964	27,208,564	54.71	45.29	95.74	89.24
G591 2	2,959,629,260	29,303,260	60.34	39.66	96.58	91.03
G591 3	2,677,062,166	26,505,566	55.74	44.26	96.54	91.2
591 1	3,189,312,148	31,577,348	55.34	44.66	95.2	88.23

---

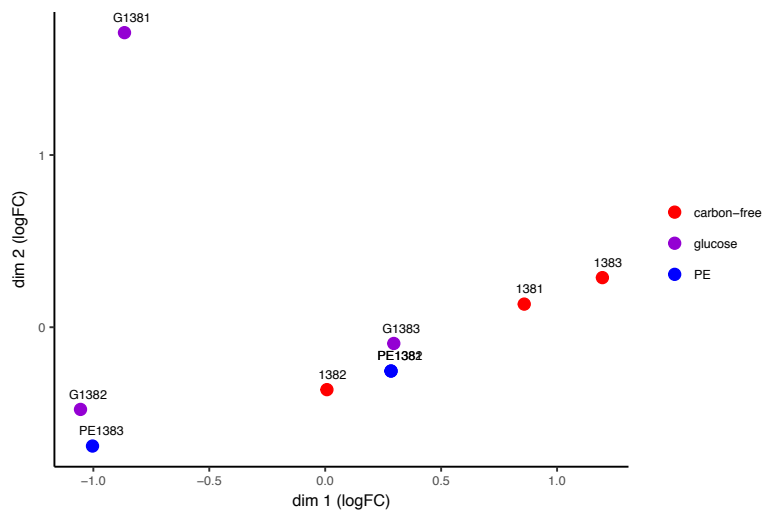
591 2	4,024,600,530	39,847,530	56.24	43.76	96.17	90.26
591 3	3,336,441,878	33,034,078	54.42	45.58	95.41	88.71

O número absoluto de *reads* mapeados contra os genes anotados a partir dos genomas desses microrganismos foi utilizado para a realização de análises de expressão diferencial pareada, a fim de identificar os genes potencialmente participantes do processo de biodegradação de PE (Figura 33; Figura 34; Figura 35). O valor do FDR (false Discovery rate) utilizado como *cutoff* para as análises de enriquecimento foi flexibilizado em decorrência do desenho experimental estabelecido. Espera-se que após 20 dias de cultivo na presença de PE os microrganismos já estejam com o metabolismo direcionado para o processo de degradação deste (Figura 12). No entanto, ao longo dos primeiros dias de cultivo, pode-se dizer que o metabolismo destes ainda está sendo modulado pela limitação de carbono, tendo em vista a alta estabilidade físico-química desse polímero sintético. Assim, para possibilitar a detecção dos genes cuja expressão foi induzida pelo PE nas amostras compostas por RNAs purificados após 2 e 20 dias, foi necessário diminuir a estringência da análise.

A análise retornou um total de 247, 203 e 4 genes de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp., respectivamente, superexpressos nas culturas de polietileno em relação às culturas sem fontes de carbono e 9, 11 e 169 genes nas culturas de polietileno em relação às culturas contendo glicose. Paralelamente, foram contabilizados 896, 94 e 614 genes superexpressos na presença de glicose em relação às culturas em limitação de carbono e 87, 98 e 244 superexpressos durante a limitação de carbono em relação à presença de glicose. As culturas contendo PE subexpressaram 18, 162 e 19 genes respectivamente de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. em relação à ausência de fonte de carbono e 4, 45 e 402 em relação à glicose (Figura 36; Figura 37; Figura 38). Isso revela que o metabolismo de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. na presença de PE é mais alinhado com o observado nas culturas contendo glicose, indicando que, de fato, essas estirpes estão prosperando sob a perspectiva nutricional. Por outro lado, *Stenotrophomonas* sp. apresenta-se engajada em estratégias metabólicas mais similares às do estresse nutricional imposto pela limitação de carbono para acessar o PE. Isso reforça a existência de estratégias degradativas similares entre *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. contrastando àquelas empregadas por *Stenotrophomonas* sp. no que tange o acesso ao potencial energético do PE.

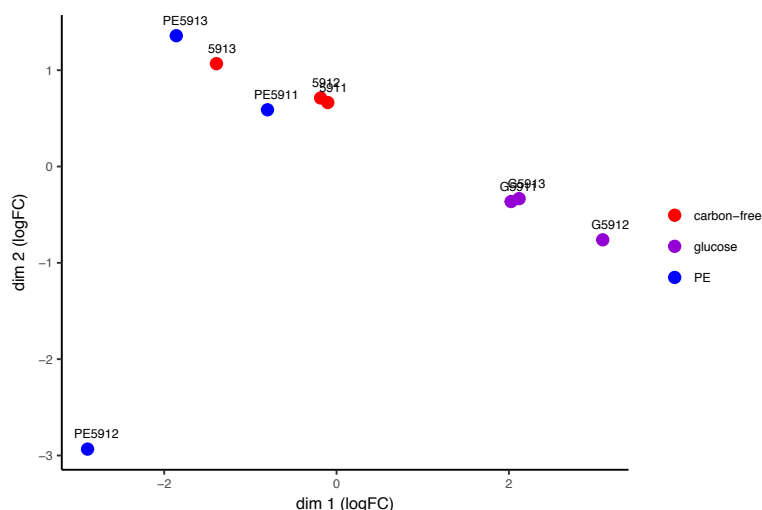


**Figura 33.** MDS plot do logFC calculado a partir da análise de expressão diferencial das culturas de *Comamonas* sp. e as respectivas réplicas biológicas na presença de polietileno (azul) ou glicose (violeta) como única fonte de carbono, ou na ausência de fontes de carbono (vermelho).



**Figura 34.** MDS plot do logFC calculado a partir da análise de expressão diferencial das culturas de *Delftia* sp. e as respectivas réplicas biológicas na presença de polietileno (azul) ou glicose (violeta) como única fonte de carbono, ou na ausência de fontes de carbono (vermelho).





**Figura 35.** MDS plot do logFC calculado a partir da análise de expressão diferencial das culturas de *Stenotrophomonas* sp. e as respectivas réplicas biológicas na presença de polietileno (azul) ou glicose (violeta) como única fonte de carbono, ou na ausência de fontes de carbono (vermelho).

As funções de todas as proteínas codificadas pelos genes diferencialmente expressos bem como as vias metabólicas às quais estas pertencem foram acessadas individualmente e manualmente com base nos bancos de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) e UniProt (Universal Protein Resource). Isso permitiu uma análise de maior acurácia e precisão no que tange os possíveis papéis desempenhados por cada uma destas no processo metabólico de PE. No entanto, genes que não sejam diferencialmente expressos também podem ser potenciais participantes desse processo. As células podem expressar diversos genes que não sejam modulados por estímulos nutricionais específicos, mas que, ainda assim, possam desempenhar funções cruciais durante o metabolismo de PE. Portanto, direcionadas pelas inferências obtidas acerca da análise de expressão diferencial e pelas informações disponíveis na literatura, as análises dos possíveis mecanismos atuantes foram realizadas individualmente por meio da contagem de reads normalizada por TMM de cada gene investigado. Assim, foi possível realizar uma análise mais completa e abrangente acerca da atividade metabólica das três estirpes na presença de PE como única fonte de carbono e energia, e não apenas da atividade metabólica diferencial.

Em um panorama geral, a análise dos resultados da expressão diferencial de genes durante o cultivo contendo PE como única fonte de carbono revelou a superexpressão de genes relacionados à síntese de aminoácidos, constituintes integrais do ribossomo, fatores de transcrição, ciclo do citrato, ATP sintase e citocromos, síntese de ácidos nucleicos, proteínas de membrana,

síntese de parede celular e de LPS (lipopolissacarídeo), evidenciando a substancial viabilidade celular nessas culturas. Ademais, genes relativos a eventos de quimiotaxia, adesão celular, formação de biofilmes, sinalização e síntese de antimicrobianos e estruturas de resistência a estes revelam o potencial reconhecimento do PE como substrato, sugerindo o engajamento microbiano na obtenção de energia por meio desse polímero. Isso é reforçado pela relevante expressão de genes que codificam proteínas transportadoras, sistemas de secreção, metabolismo de compostos aromáticos e metabolismo secundário. Genes de resposta ao estresse oxidativo e, como consequência, genes de reparo do DNA e de proteínas também apresentaram superexpressão nessas culturas. Finalmente, observou-se a relevante expressão de genes relacionados à síntese e à degradação de ácidos graxos.

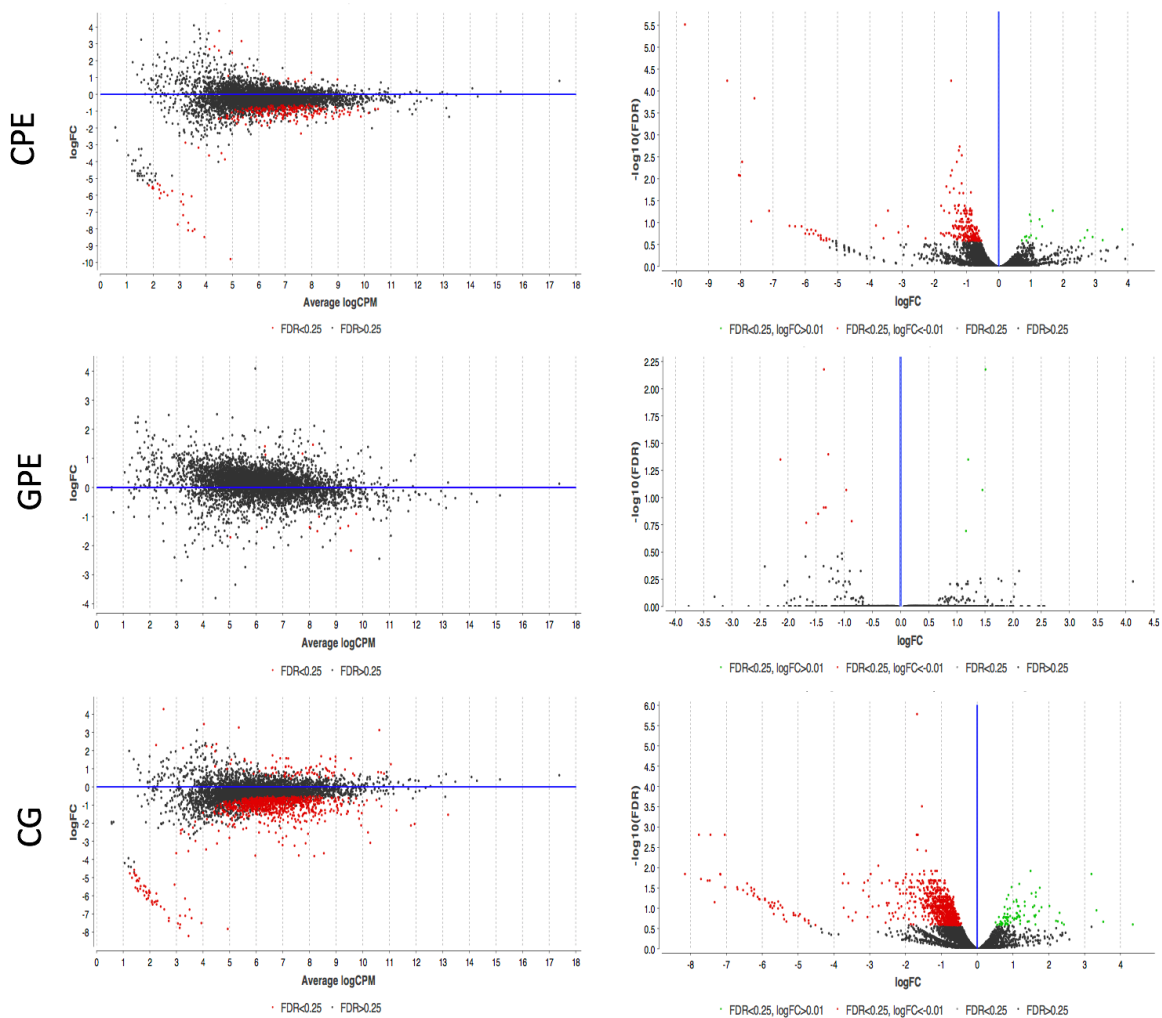
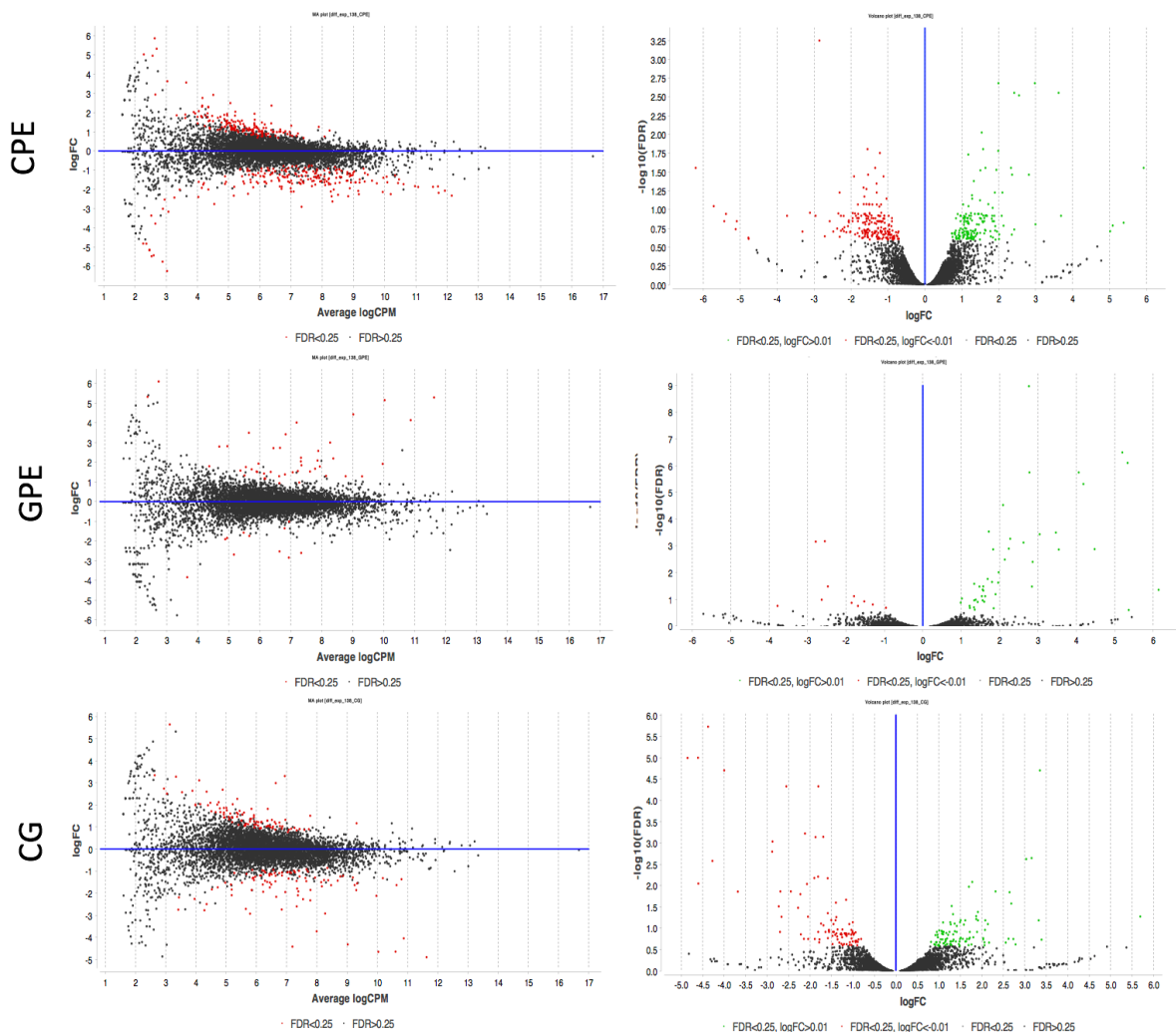


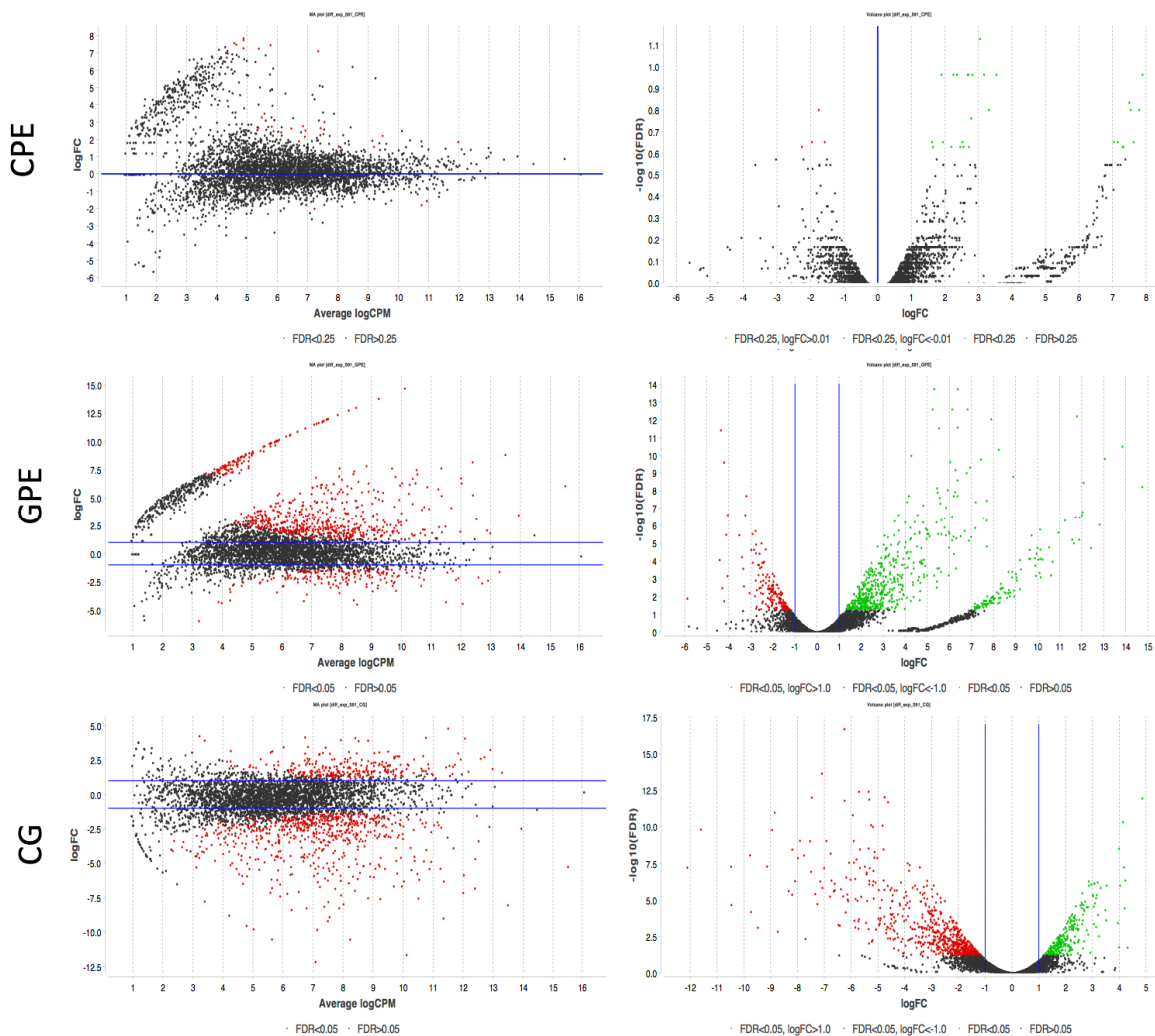
Figura 36. Métricas gerais da análise de expressão diferencial par a par entre culturas de *Comamonas sp.* sem carbono ou contendo PE (CPE), culturas contendo glicose ou PE (GPE) e culturas sem carbono ou contendo glicose (CG). MA plot (à esquerda) do logCPM

em função do logFC representando valores de FDR acima (grafite) ou abaixo (vermelho) do *cutoff* de 0,25 e volcano plot (à direita) do logFC em função do  $-\log_{10}(\text{FDR})$  representando os valores de FDR < 0,25 acima (verde) e abaixo do *threshold* logFC > 0,01 (vermelho), além dos valores de FDR > 0,25 (grafite). Pontos vermelhos no MA plot representam genes cuja expressão foi considerada alterada em função do estímulo (fonte de carbono). No volcano plot, pontos vermelhos representam os genes considerados superexpressos nas culturas contendo PE (superior e centro) ou glicose (inferior) e pontos verdes os superexpressos em função da ausência de carbono (superior) ou da presença de glicose (centro e inferior).



**Figura 37.** Métricas gerais da análise de expressão diferencial par a par entre culturas de *Delftia sp.* sem carbono ou contendo PE (CPE), culturas contendo glicose ou PE (GPE) e culturas sem carbono ou contendo glicose (CG). MA plot (à esquerda) do logCPM em função do logFC representando valores de FDR acima (grafite) ou abaixo (vermelho) do *cutoff* de 0,25 e volcano plot (à direita)

do logFC em função do  $-\log_{10}(\text{FDR})$  representando os valores de  $\text{FDR} < 0,25$  acima (verde) e abaixo do *threshold*  $\log\text{FC} > 0,01$  (vermelho), além dos valores de  $\text{FDR} > 0,25$  (grafite). Pontos vermelhos no MA plot representam genes cuja expressão foi considerada alterada em função do estímulo (fonte de carbono). No volcano plot, pontos vermelhos representam os genes considerados superexpressos nas culturas contendo PE (superior e centro) ou glicose (inferior) e pontos verdes os superexpressos em função da ausência de carbono (superior) ou da presença de glicose (centro e inferior).



**Figura 38.** Métricas gerais da análise de expressão diferencial par a par entre culturas de *Stenotrophomonas sp.* sem carbono ou contendo PE (CPE), culturas contendo glicose ou PE (GPE) e culturas sem carbono ou contendo glicose (CG). MA plot (à esquerda) do logCPM em função do logFC representando valores de FDR acima (grafite) ou abaixo (vermelho) do *cutoff* de 0,25 e volcano plot (à direita) do logFC em função do  $-\log_{10}(\text{FDR})$  representando os valores de  $\text{FDR} < 0,25$  acima (verde) e abaixo do *threshold*

$\log_{2}FC > 0,01$  (vermelho), além dos valores de  $FDR > 0,25$  (grafite). Pontos vermelhos no MA plot representam genes cuja expressão foi considerada alterada em função do estímulo (fonte de carbono). No volcano plot, pontos vermelhos representam os genes considerados superexpressos nas culturas contendo PE (superior e centro) ou glicose (inferior) e pontos verdes os superexpressos em função da ausência de carbono (superior) ou da presença de glicose (centro e inferior).

Por constituírem as potenciais etapas limitantes do processo de biodegradação de PE, alguns genes foram analisados comparativamente em relação aos cenários metabólicos (PE, glicose e ausência de carbono), a fim de acessar possíveis padrões de expressão entre as diferentes condições de cultivo. Dentre estes encontram-se genes referentes a oxidorreduções extracelulares (**Figura 39**), estresse oxidativo (**Figura 40**) e nitrosoativo (**Figura 41**), hidrolases extracelulares (**Figura 42**), proteínas de membrana (**Figura 43**), transportadores (**Figura 44**; **Figura 45**; **Figura 46**) e oxidorreduções intracelulares (**Figura 47**). Com base nessas análises, alguns candidatos foram selecionados para futuros estudos mais aprofundados. No geral, infere-se que alguns genes são expressos durante os eventos de estresse nutricional e/ou oxidativo, enquanto outros aparentam ter sua expressão modulada pela presença de fontes de carbono assimiláveis, como a glicose e os produtos de degradação extracelular do PE. Esses padrões estão representados graficamente por meio de *heatmaps*, sendo possível inferir, assim, as diferenças nas expressões desses genes entre essas diferentes condições. Cabe ressaltar que genes que apresentem tonalidades em vermelho na coluna do meio e na direita apresentam maior expressão na presença de PE, enquanto na coluna da esquerda essa tonalidade representa uma maior expressão na glicose em relação à ausência de carbono (comparação entre condição nutricional “ótima” e limitação de carbono).<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> Dados genômicos e transcritômicos experimentalmente validados serão publicados conjuntamente a fim de descrever o metabolismo polietileno.

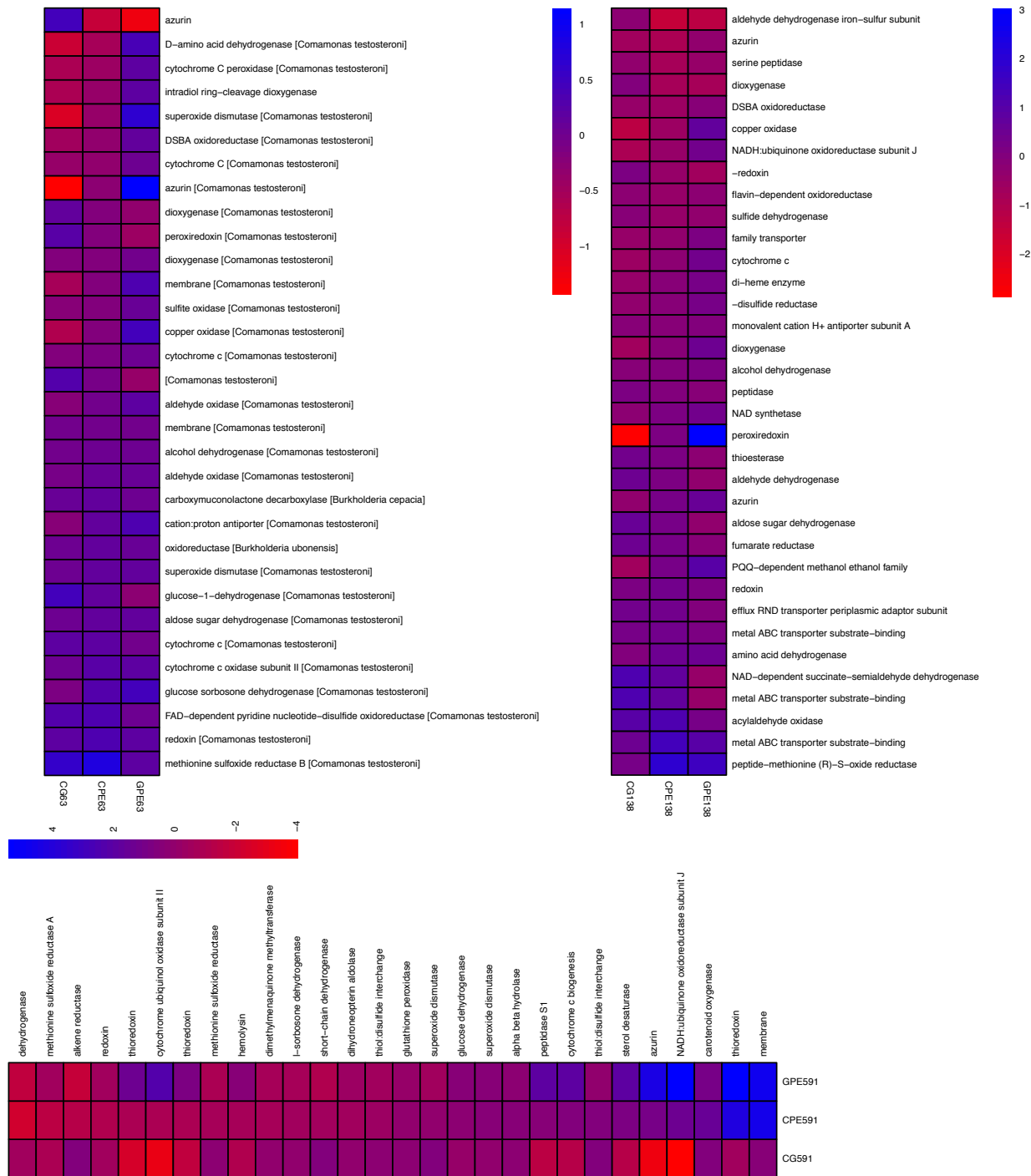
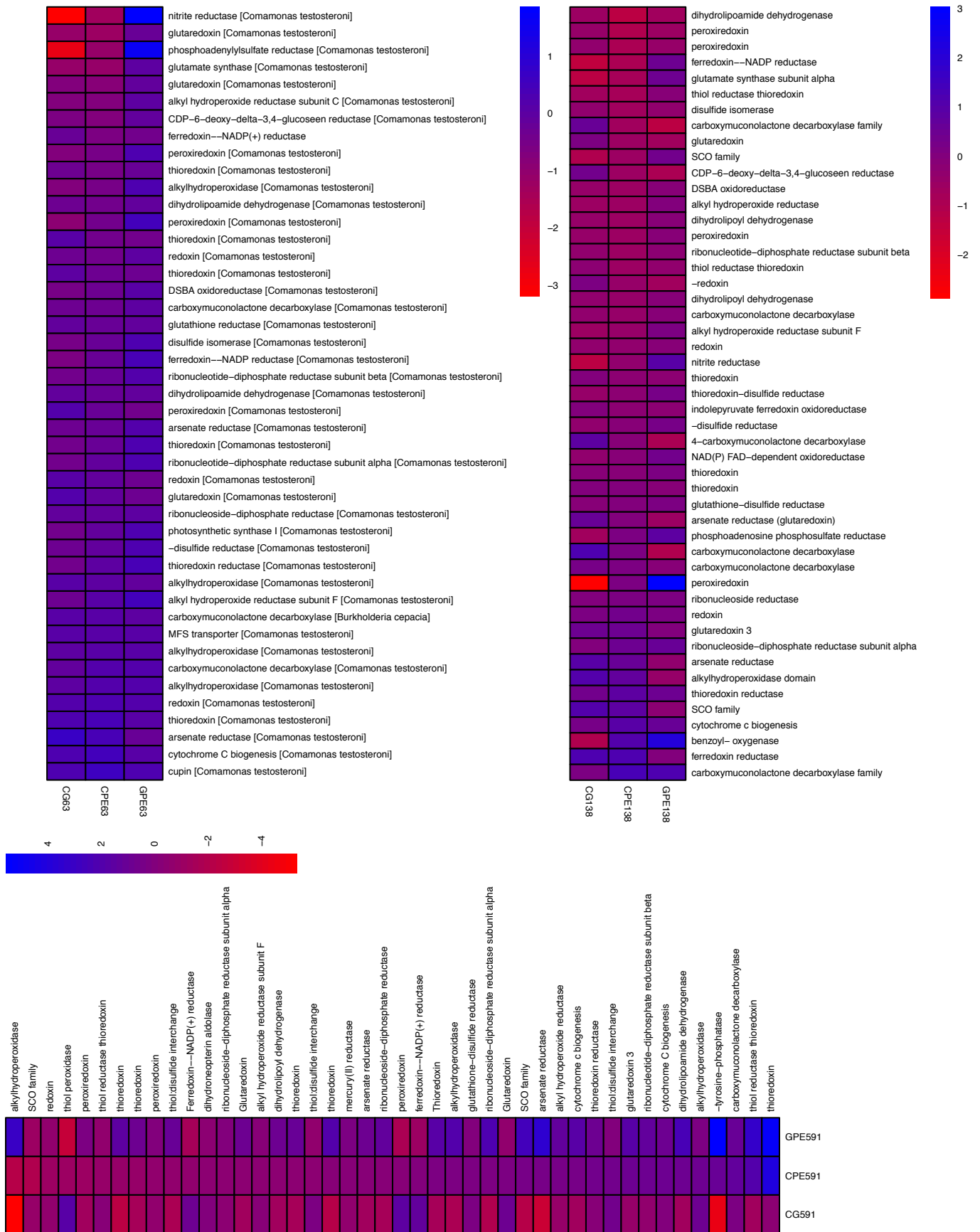
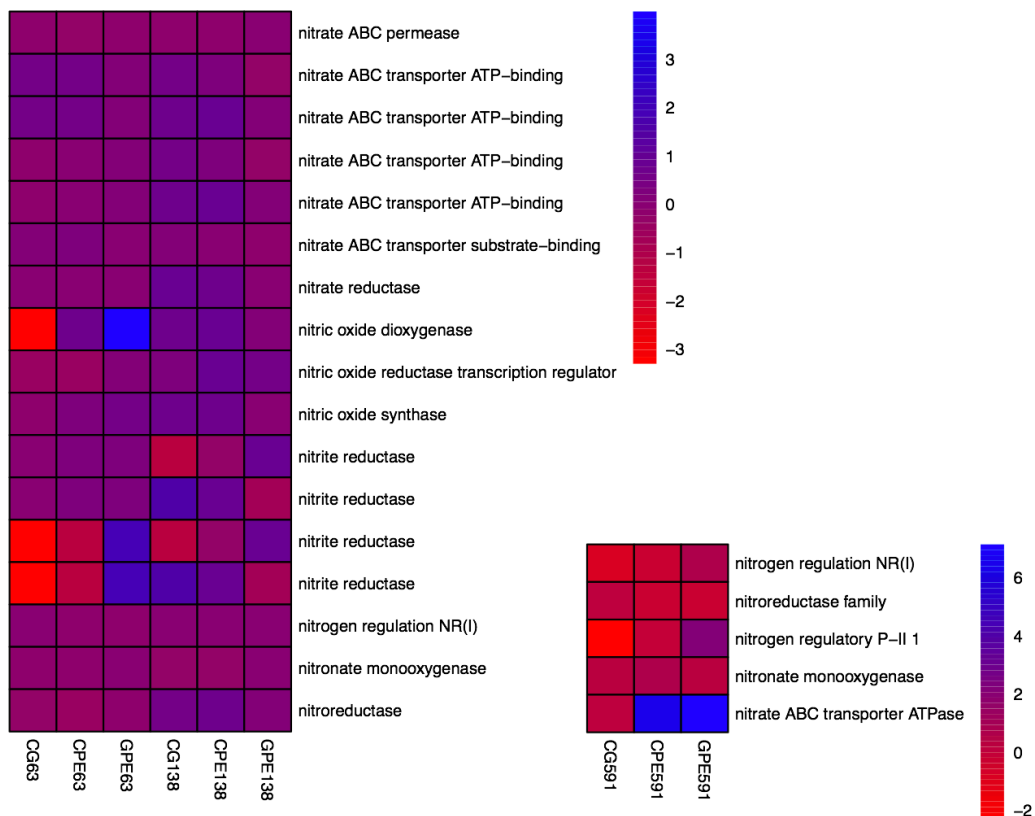


Figura 39. Heatmap da expressão de genes que codificam oxidorredutases extracelulares em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).



**Figura 40.** Heatmap da expressão de genes envolvidos no equilíbrio redox em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).



**Figura 41.** (Esquerda) Heatmap da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em *Comamonas* sp. (63) e *Delftia* sp. (138). (Direita) Heatmap da expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).



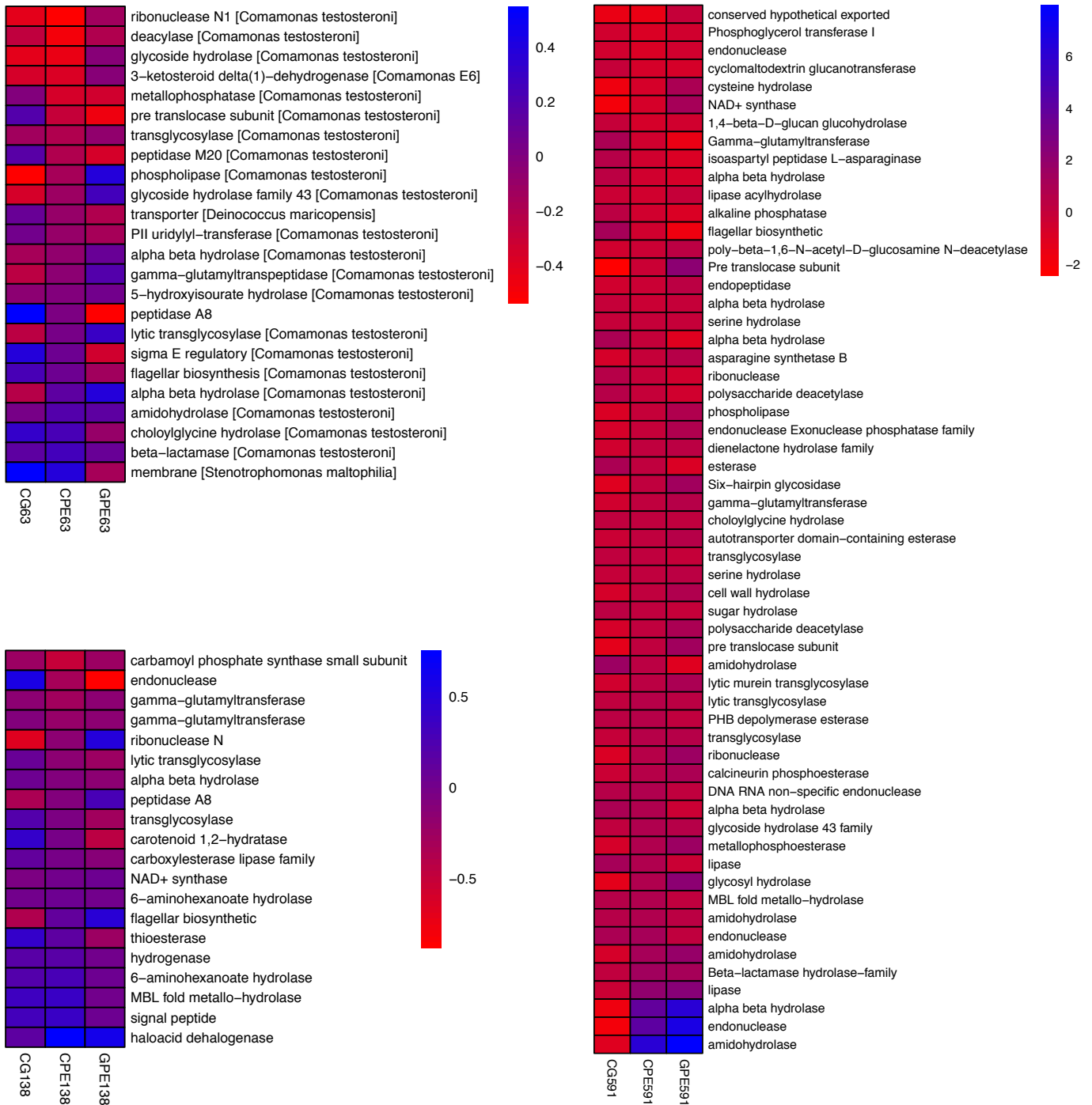


Figura 42. Heatmap da expressão de genes codificadores de hidrolases extracelulares em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).

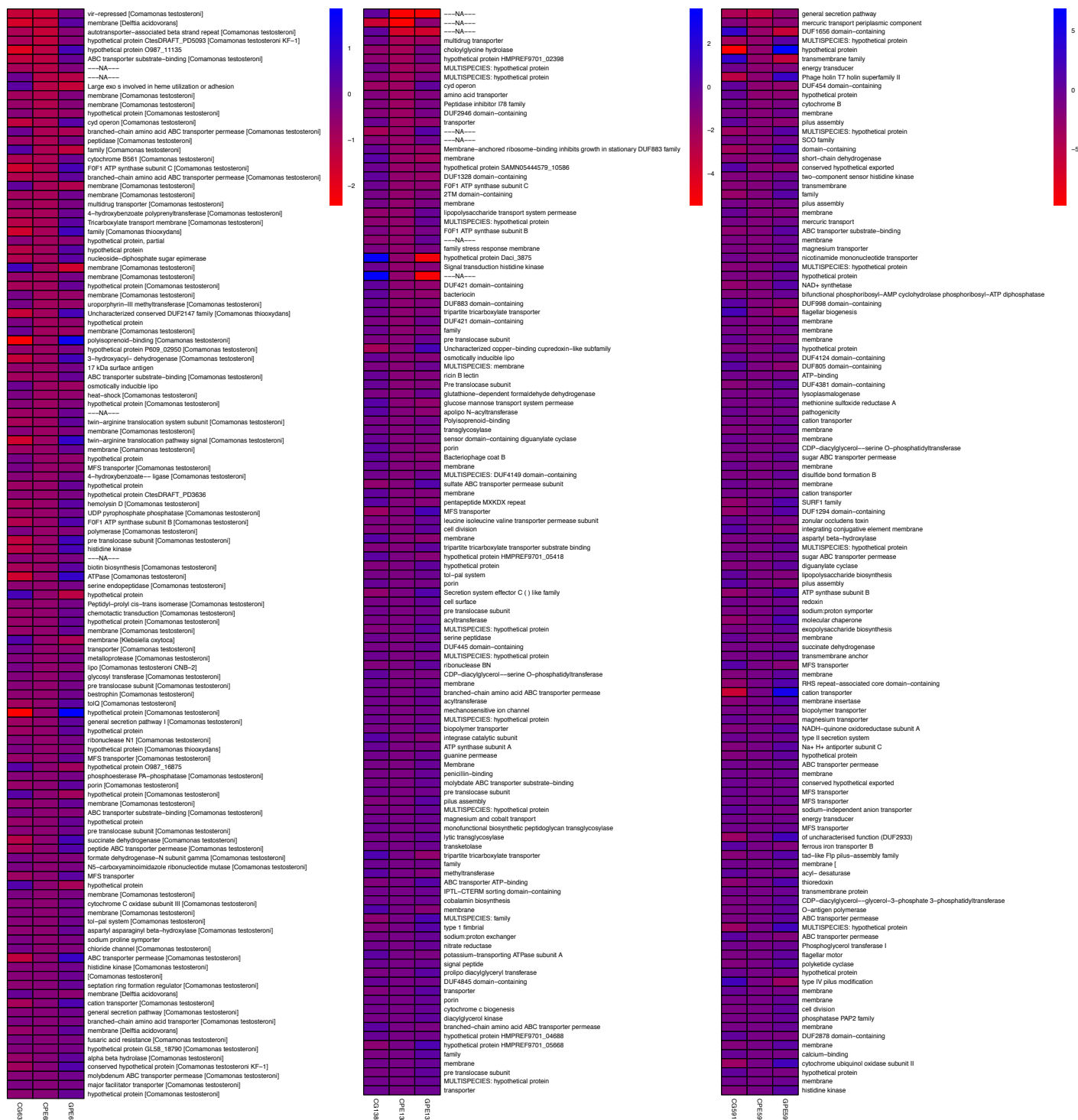


Figura 43. Heatmap da expressão de alguns genes que codificam proteínas transmembrana em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).

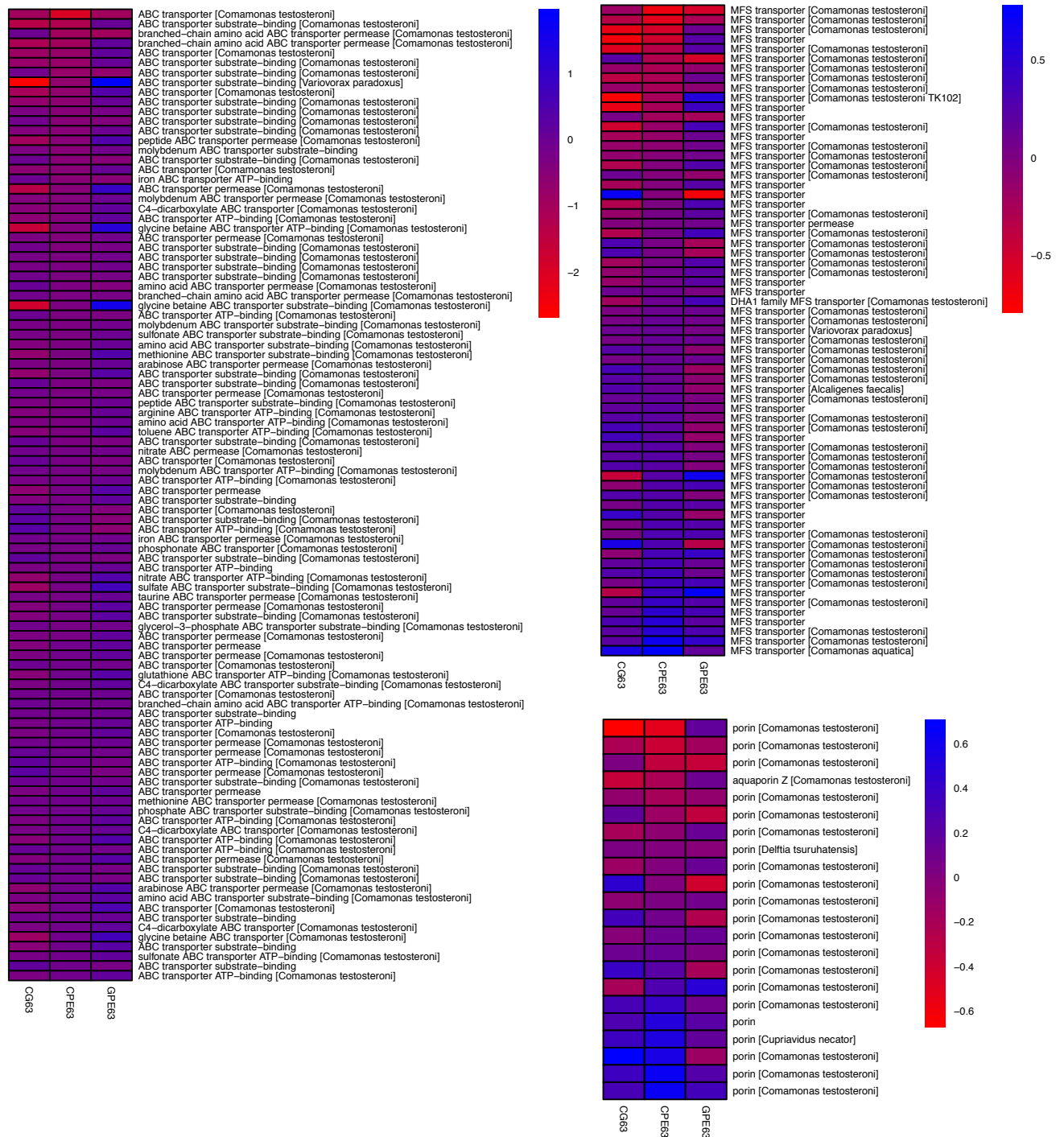
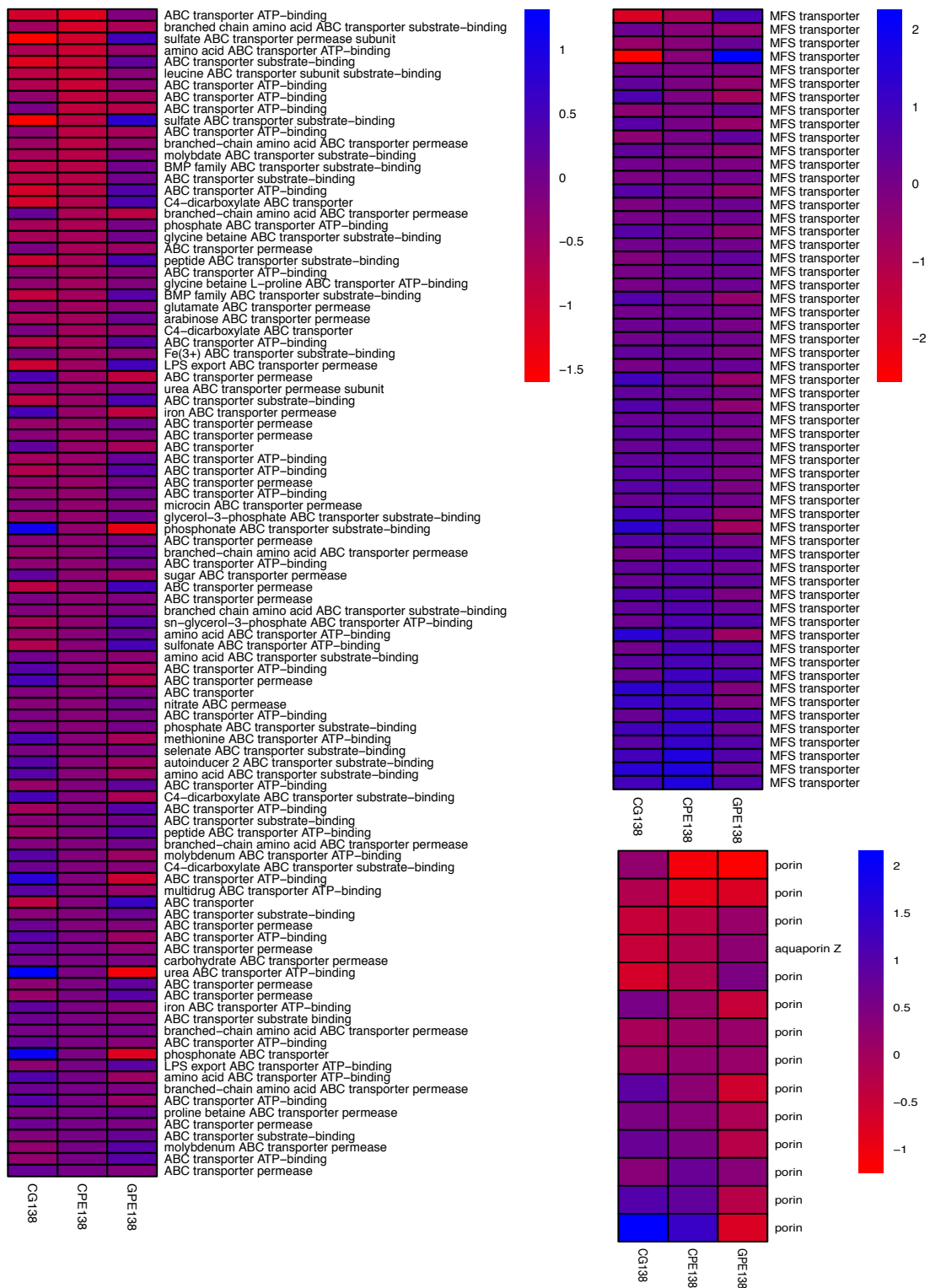


Figura 44. Heatmap da expressão de alguns dos genes que codificam as principais proteínas transportadoras em *Comamonas* sp. (63). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).



**Figura 45.** Heatmap da expressão de alguns dos genes que codificam as principais proteínas transportadoras em *Delftia* sp. (138). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).

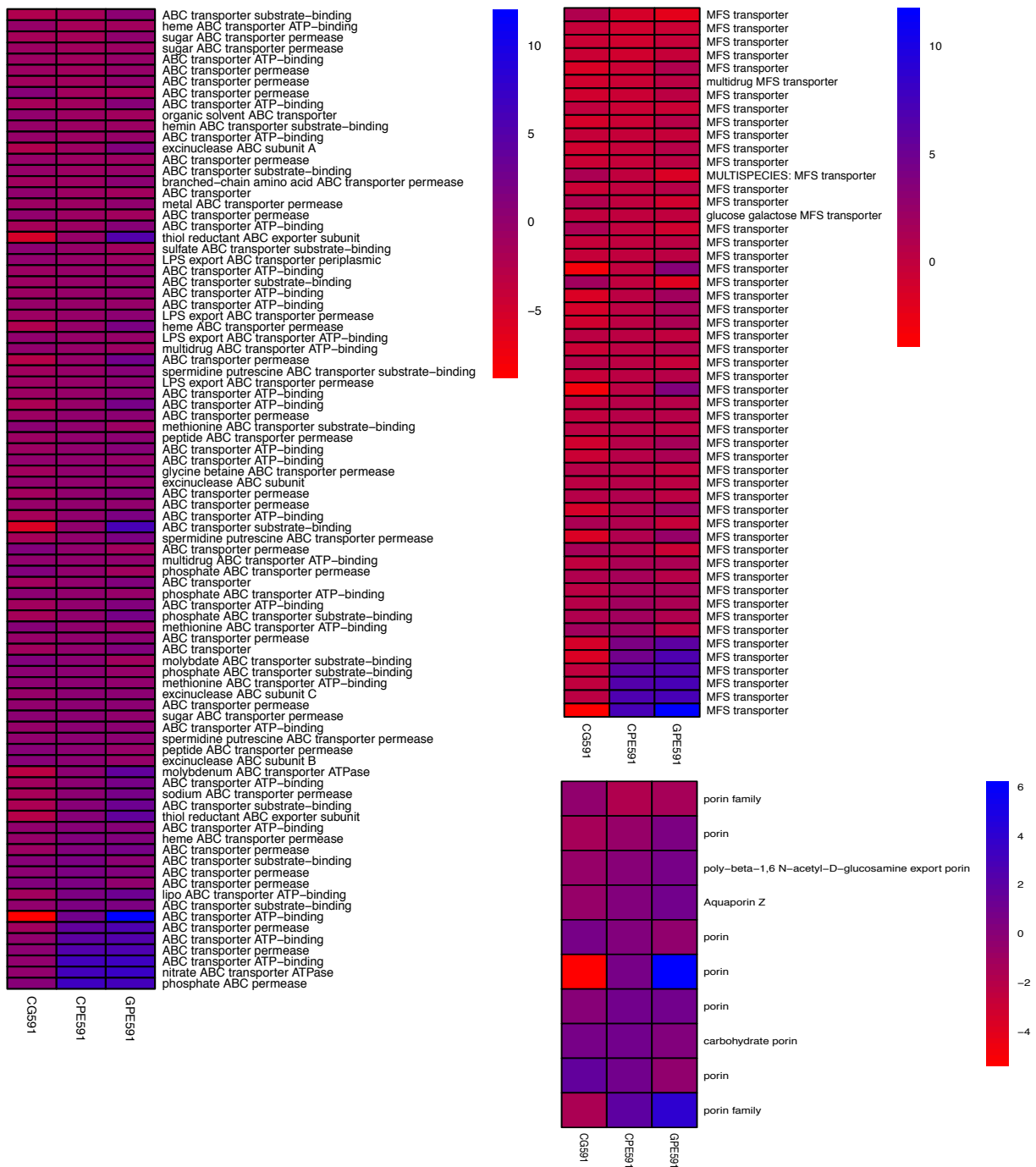


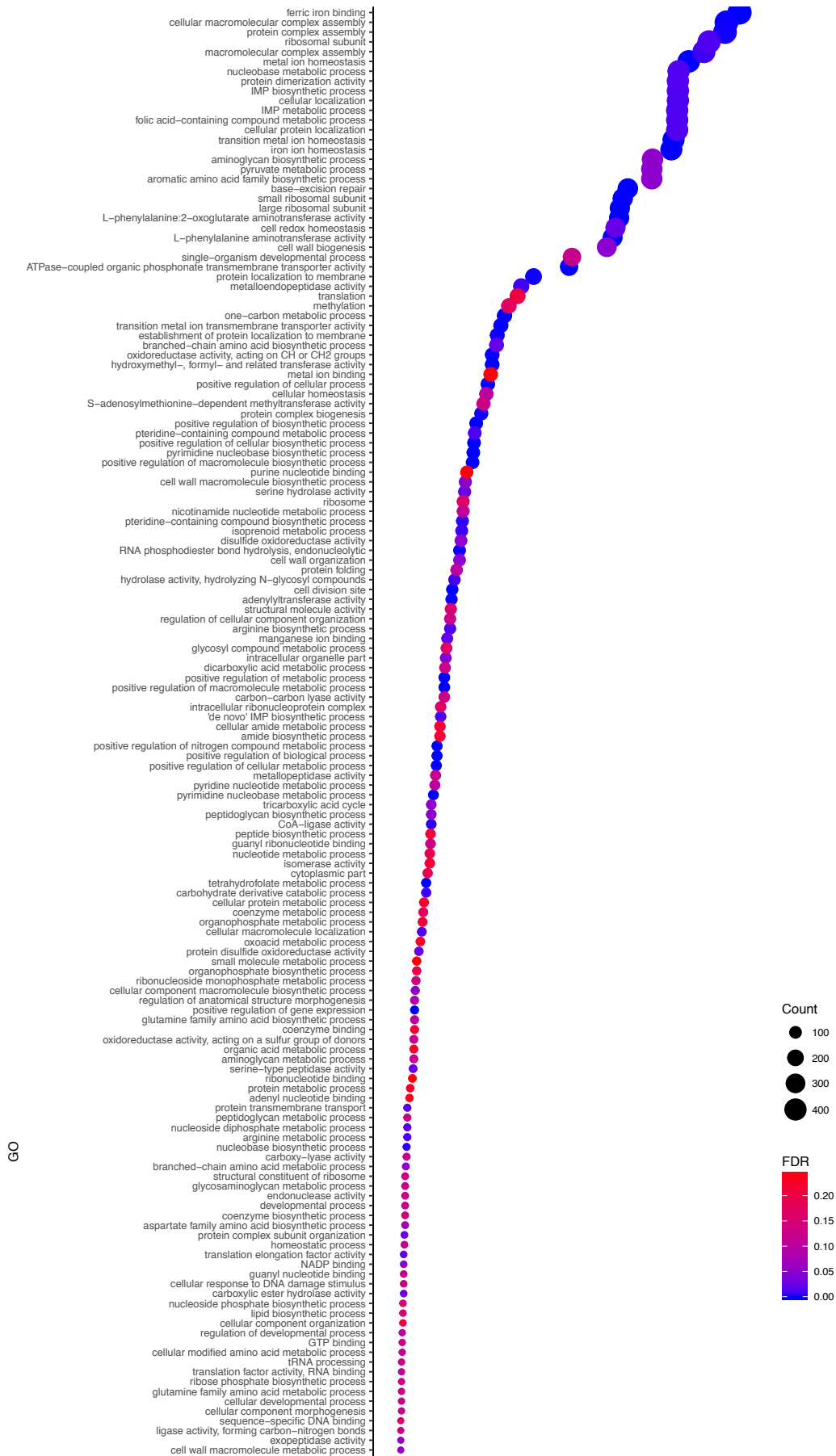
Figura 46. Heatmap da expressão de alguns dos genes que codificam as principais proteínas transportadoras em *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).



**Figura 47.** Heatmap da expressão de alguns genes que codificam oxidoredutases intracelulares em *Comamonas* sp. (63), *Delftia* sp. (138) e *Stenotrophomonas* sp. (591). O gradiente de cores representa os valores de logFC obtidos a partir das análises de expressão diferencial pareada entre: (i) ausência de carbono e presença de glicose (CG), (ii) ausência de carbono e presença de PE (CPE), (iii) presença de glicose e presença de PE (GPE).

Análises de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) foram realizadas com a finalidade de determinar a ocorrência de grupos de genes estatisticamente diferentes entre as diferentes condições de cultivo e caracterizar o perfil funcional destas. Essas análises, juntamente com a análise dos genes superexpressos na presença de PE, direcionaram o entendimento do metabolismo de PE por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp., e os resultados destas estão apresentados nas figuras a seguir (**Figura 48; Figura 49; Figura 50; Figura 51; Figura 52**). Similarmente, a mesma abordagem (i.e. GSEA) foi empregada para analisar as respostas metabólicas desses microrganismos à limitação de carbono, a fim de acessar o mecanismo de resposta microbiana ao fenômeno de *carbon starvation*. Para tanto, os genes superexpressos durante a limitação de carbono em relação ao PE e à glicose foram combinados e, sequentemente, utilizados como *input* para as análises de enriquecimento (**Figura 53; Figura 54; Figura 55**).

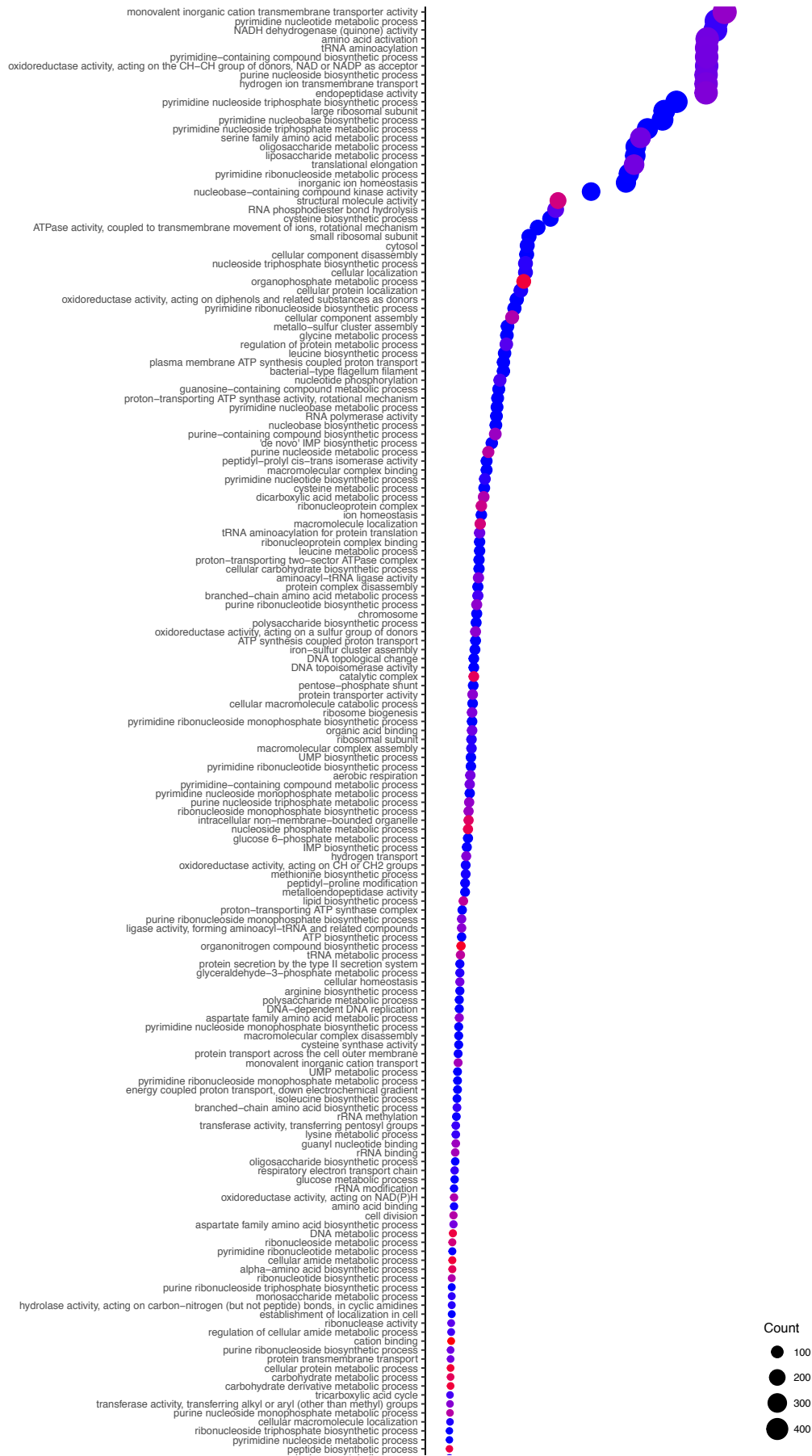
As principais vias metabólicas, inferidas a partir dos dados de expressão diferencial, foram acessadas por meio do *KEGG pathway maps* e as proteínas que não foram anotadas com base no *EC number* foram manualmente adicionadas aos mapas. Integrando-se os dados obtidos acerca da expressão dos genes nas culturas contendo PE, observou-se que as principais vias metabólicas envolvidas no processo de biodegradação de PE são referentes aos processos de degradação de ácidos graxos, ciclo do citrato, cadeia respiratória e metabolismo de butanoato, as quais estão relacionadas à oxidação de alcanos e outros derivados oxidativos e conversão destes a acetil-CoA para posterior oxidação completa a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O no ciclo do citrato. Então, os elétrons produzidos acarretarão, por meio da cadeia respiratória, a formação do gradiente eletroquímico necessário para a produção de ATP. O acetil-CoA produzido a partir da degradação dos ácidos graxos também é substrato para enzimas do metabolismo do butanoato, que resulta na síntese de polihidroxicanoatos (i.e. poliésteres) intracelulares.



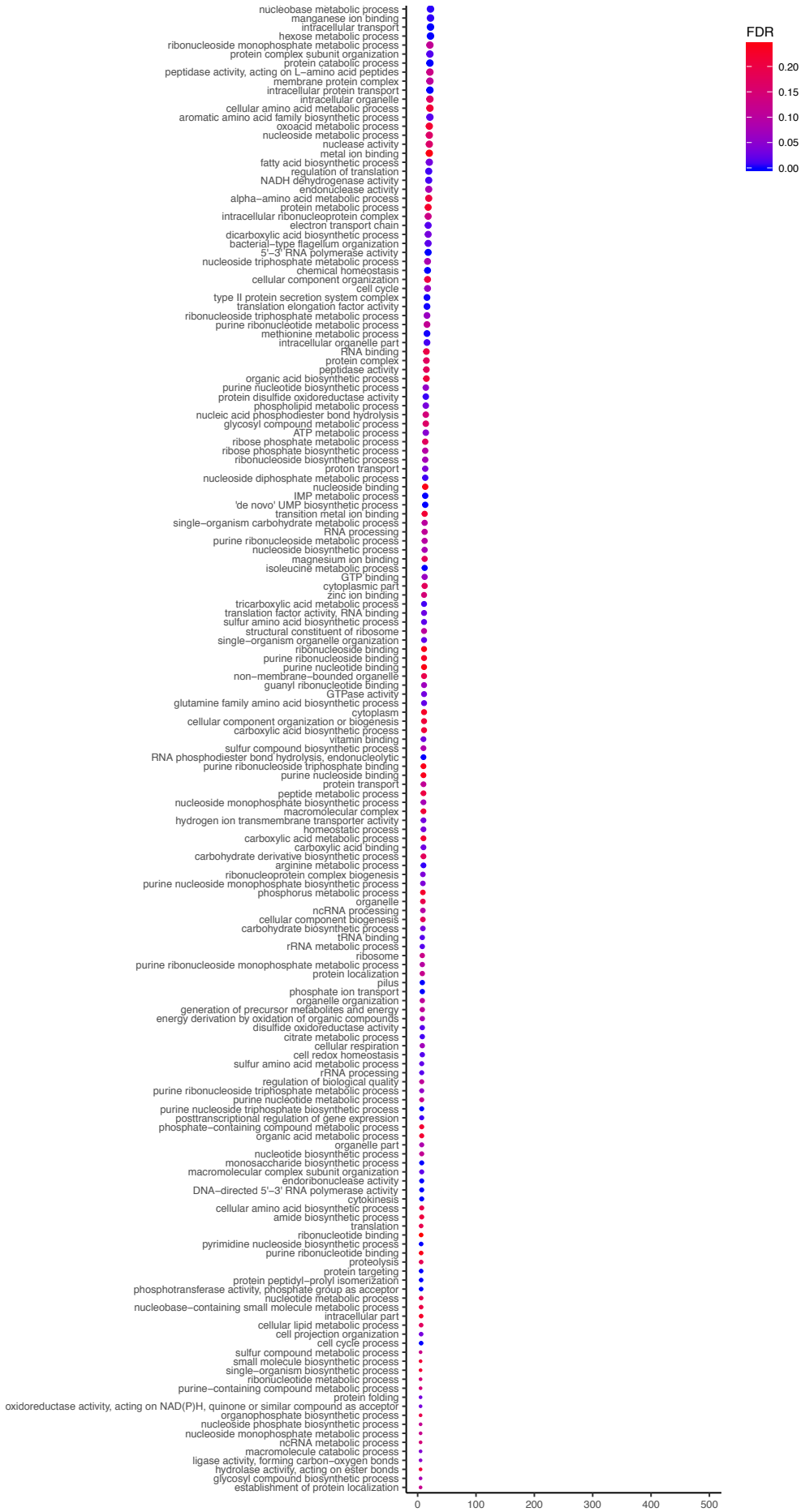




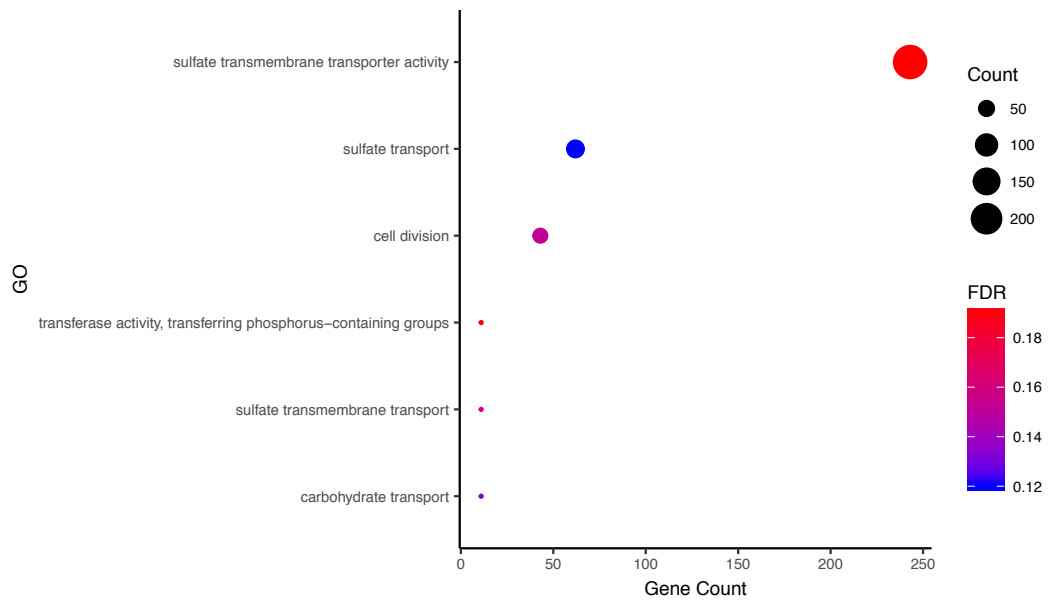
**Figura 48.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Comamonas* sp. contendo PE em contraste a culturas em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial. Não foram encontradas funções enriquecidas nas culturas de PE em relação às contendo glicose.



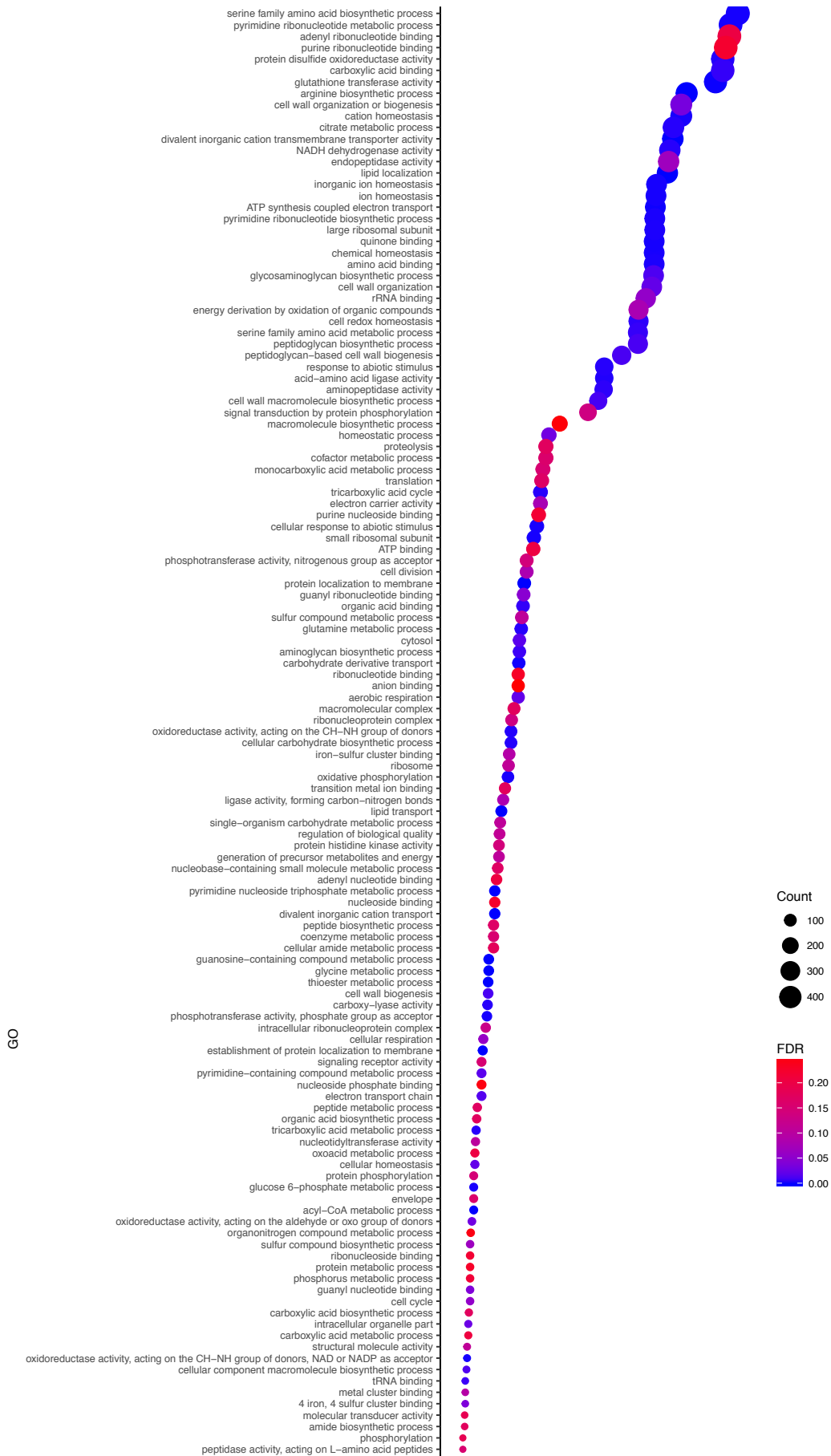
GO



**Figura 49.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Delftia* sp. contendo PE em contraste a culturas em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial.



**Figura 50.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Delftia* sp. contendo PE em contraste a culturas contendo glicose obtidas a partir da análise de expressão diferencial.



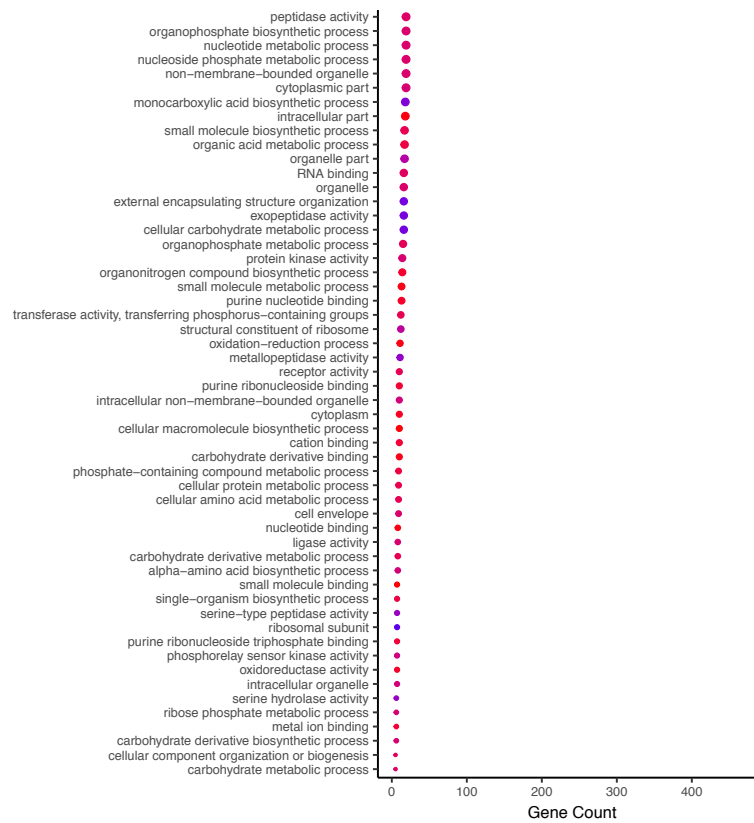
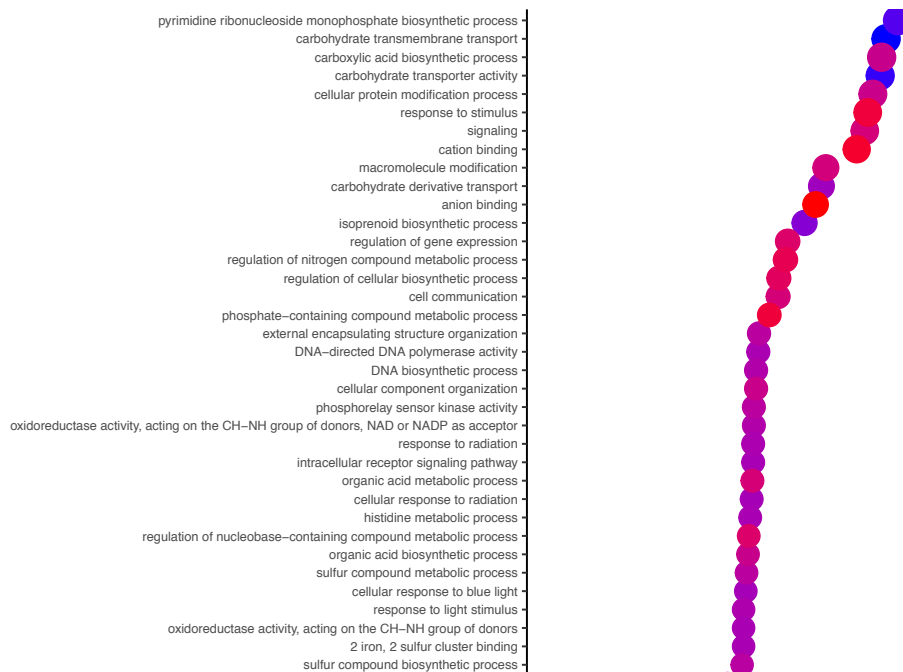


Figura 51. Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Stenotrophomonas* sp. contendo PE em contraste a culturas em limitação de carbono.



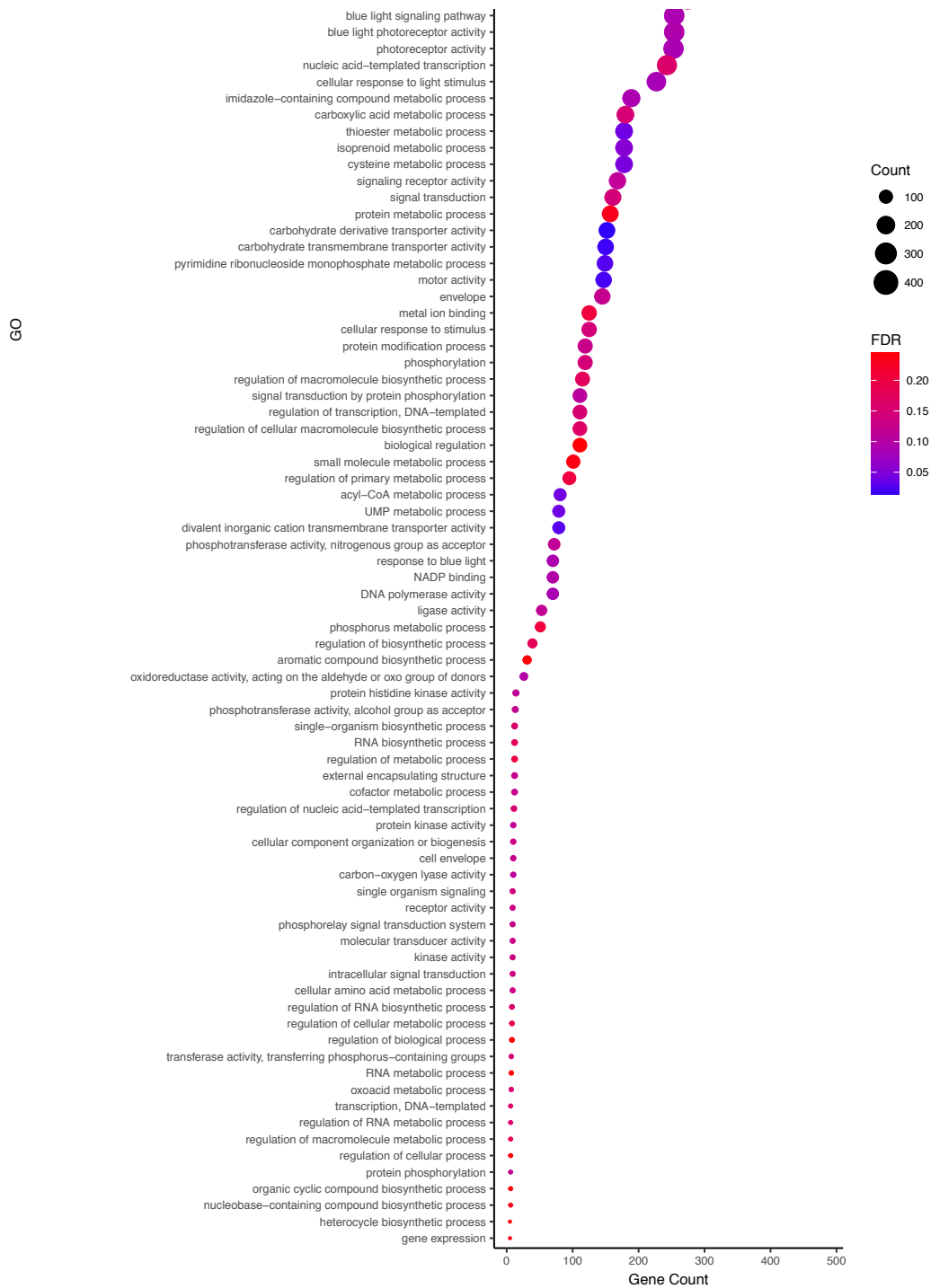
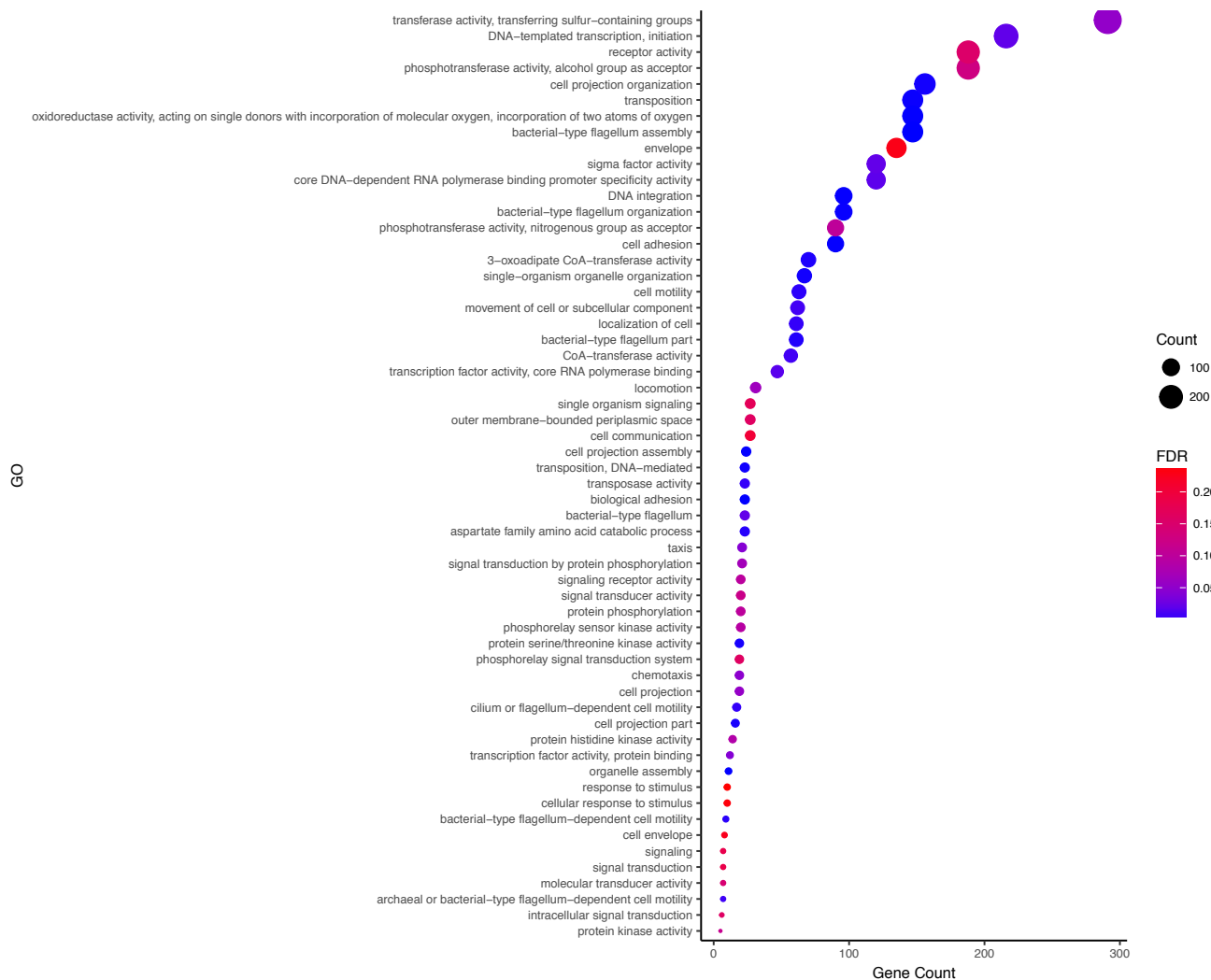
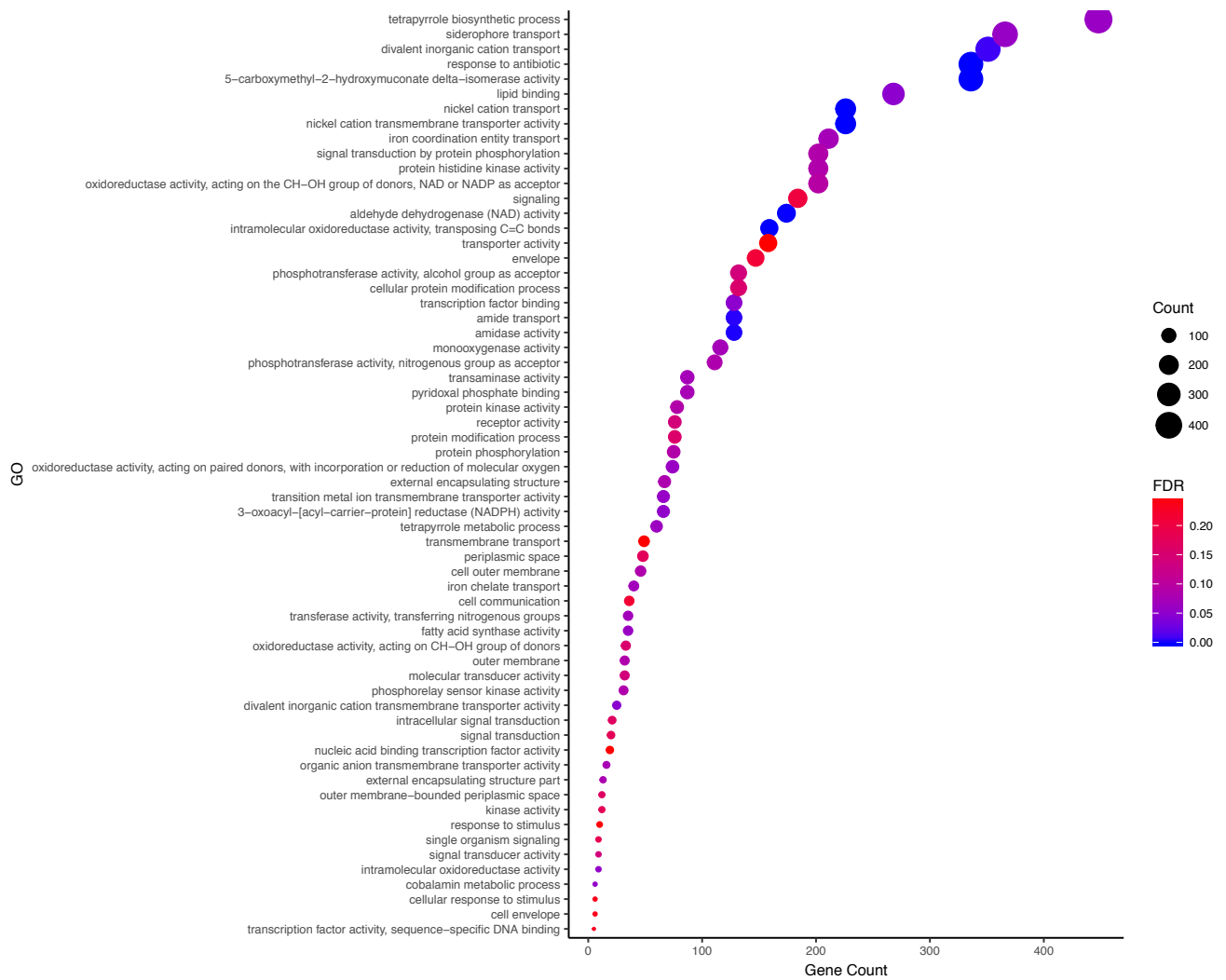


Figura 52. Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Stenotrophomonas* sp. contendo PE em contraste a culturas contendo glicose obtidas a partir da análise de expressão diferencial.



**Figura 53.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Comamonas* sp. em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial.





**Figura 54.** Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Delftia* sp. em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial.

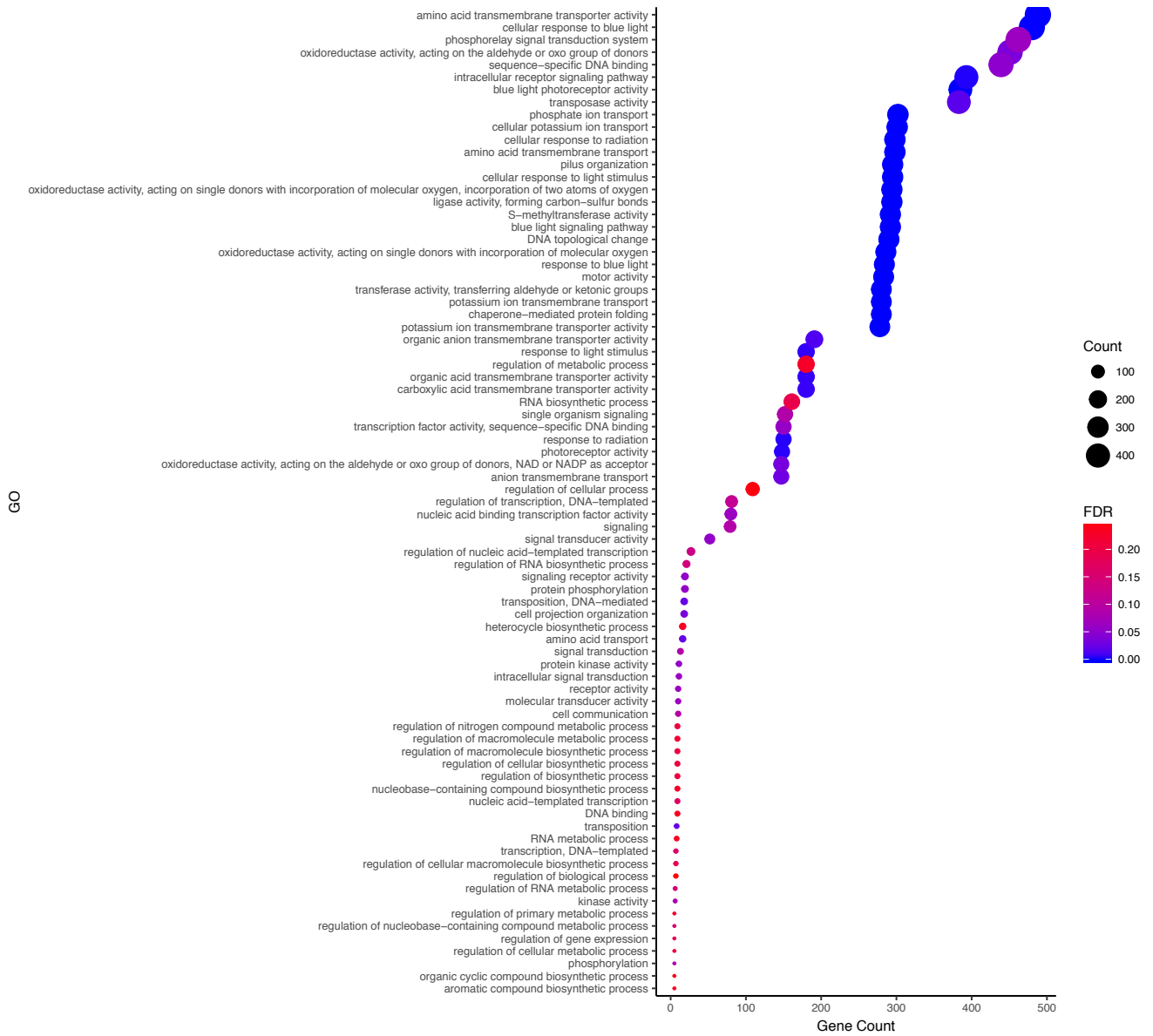


Figura 55. Análise de enriquecimento de grupos de genes (GSEA) representando todas as funções (GO) sobre representadas nas culturas de *Stenotrophomonas* sp. em limitação de carbono obtidas a partir da análise de expressão diferencial.

---

## Prospecção de microrganismos e caracterização físico-química dos filmes de PE biodegradados

---

Essa etapa do estudo contemplou o isolamento de 647 microrganismos e a subsequente seleção de 9 bactérias biodegradadoras de PE, além da caracterização topográfica e físico-química dos filmes biodegradados. Os microrganismos, compreendidos nos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas*, foram isolados a partir de debris plásticos descartados em solos do Cerrado. A identificação taxonômica e análise filogenética desses microrganismos foi acessada com base no sequenciamento dos genes 16S rRNA amplificados a partir do DNA total destes. As sequências resultantes foram depositadas no GenBank com os números de acesso: KU820878, KU820879, KU820880, KU820881, KU820882, KU820883, KU820884, KU820885 e KU820886.

Os resultados preliminares (Peixoto, 2013) refletem o grande potencial microbiano contido nos solos desse bioma, tendo em vista a ausência de relatos prévios na literatura sobre seleções com tão amplo número de microrganismos biodegradadores de PE identificados. Até o momento, não havia relatos a respeito do potencial de *Comamonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. para biodegradar PE, apesar da conhecida capacidade destas em degradar óleo mineral (Cerqueira et al., 2012). Por outro lado, outros polímeros sintéticos são passíveis de biodegradação por *Delftia* sp., confirmando o grande potencial dessa estirpe em relação à biodegradação de PE (Yoon et al., 2012). Isso reforça que a metodologia empregada foi bem-sucedida no que tange o isolamento de biodegradadores de PE. Ressalta-se, ainda, que esta é a primeira descrição de bactérias capazes de biodegradar PE livre de aditivos de tão alta massa molecular ( $191.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) que dispensem a necessidade de pré-tratamentos abióticos (e.g. irradiação UV).

O fenótipo de biodegradação de PE foi acessado por meio tanto da presença de viabilidade celular e atividade metabólica desses isolados em cultivos contendo esse polímero como única fonte de carbono, como da análise direta dos filmes biodegradados sob as perspectivas físico-química e topográfica. Diante da presença do insolúvel PE de altíssima massa molecular como única fonte de carbono, as células supostamente necessitam aderir na superfície deste a fim de promover modificações que acarretem a assimilação, culminando, então, na manutenção da viabilidade celular e da atividade metabólica. Devido às características físico-químicas do PE, as quais acarretam sua recalcitrância, a adesão celular é crítica para o processo de biodegradação e contribui para

promover as modificações moleculares (i.e. fragmentação e oxidação) necessárias à assimilação desse polímero, incluindo quebra de ligações, transformações químicas e estruturais e formação de novos grupos funcionais (Huang *et al.*, 1992; Orr *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2007). O limite proposto para a assimilação de alcanos é de apenas 500 g.mol<sup>-1</sup> e, nesse sentido, a adesão pode garantir o sucesso microbiano maximizando a concentração de enzimas secretadas, bem como de outras moléculas auxiliares, na superfície polimérica, aumentando a probabilidade da ocorrência de modificações moleculares. Além disso, esta garante que as células estão próximas o suficiente para assimilar os produtos de degradação eficientemente, suprimindo a demanda energética destas.

Durante a investigação do progresso temporal da adesão celular de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp., as micrografias revelaram notórios contrastes entre as culturas na ausência de fontes de carbono ou contendo PE (Figura 12, pg. 58). É razoável afirmar que a viabilidade dos biofilmes formados reflete o estado metabólico das células e a efetividade destas em obter a energia necessária para o funcionamento de suas maquinarias celulares. Caso o PE não fosse utilizado como fonte de carbono, a morte celular nessas aumentaria expressivamente. Embora células mortas possam caracterizar uma fonte de carbono consistente, as bactérias precisariam estar adjacentes a estas para utilizá-las como fonte de carbono, e, ainda assim, poucas células permaneceriam viáveis. Esse cenário é representado pelo controle negativo que consiste em culturas sem fontes de carbono contendo lâminas de vidro como substrato para adesão. Esse controle foi realizado para acessar o estado metabólico desses microrganismos em culturas sem a adição de fontes de carbono. Este também revela inferências sobre uma possível utilização de fontes de carbono armazenadas, as quais assistiriam à viabilidade celular durante a limitação de carbono.

Tendo em vista que a única diferença entre as culturas é a presença ou ausência de PE como única fonte de carbono, é possível acessar o impacto desse polímero sobre a manutenção da viabilidade celular. Embora o número de células aderentes divergiu qualitativamente entre as culturas incubadas com PE e os respectivos controles negativos, todas as culturas apresentaram uma proporção similar de células viáveis após 12 dias. No entanto, diferenças entre essas culturas emergiram após 15 dias de cultivo, as quais se tornaram ainda mais evidentes após 20 dias. Após este período, os filmes de PE apresentaram-se densamente colonizados por células viáveis com poucas células mortas observadas. A grande predominância de células viáveis nas culturas contendo PE sugerem que elas estão exitando na fragmentação desse polímero e na subsequente assimilação dos produtos gerados como fonte de carbono para suportar a biossíntese de macromoléculas e a produção de energia. Por outro lado, biofilmes constituídos principalmente por células mortas foram detectados ao longo de toda a superfície das lâminas de vidro nas culturas em limitação de carbono. Ainda, bactérias incubadas sem PE apresentaram-se aderidas a outras células em vez de à lâmina, além

de as células vivas estarem cercadas por debris celulares de bactérias mortas, sugerindo a utilização de células mortas como fonte de carbono.

Para avaliar o impacto de (i) meras interações eletrostáticas entre a superfície dos materiais (i.e. vidro e polietileno) e a membrana externa dos microrganismos na adesão microbiana e da (ii) adesão não direcionada pelo reconhecimento nutricional, estirpes sintéticas não biodegradadoras de PE de *E. coli* (gram negativa) e *B. subtilis* (gram positiva) foram incubadas nas mesmas condições que as estirpes aqui investigadas. Em contraste aos resultados obtidos para as estirpes de *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas*, as culturas de *E. coli* e *B. subtilis* não mostraram nenhuma relação entre a presença de PE e a viabilidade celular destas, já que biofilmes esparsos constituídos majoritariamente por células mortas foram observados em ambas as culturas após 20 dias de incubação.

Com base nos contrastes observados entre os cultivos na presença ou ausência de PE, após 20 dias ficou evidente a relação positiva entre esse polímero e a viabilidade celular desses microrganismos. Assim, a viabilidade celular a longo prazo dessas bactérias foi subsequentemente acessada a partir do aumento do período de cultivo para 90 dias (**Figura 13**, pg. 59). Após esse período, foram observados filmes de PE densamente colonizados por células viáveis com baixíssimo número de células mortas. Em contraste ao período de incubação comumente utilizado de 60 dias (Orr *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2014), a alta viabilidade celular de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. após 90 dias indica que essas estirpes permanecem viáveis mesmo após longos períodos nessas condições de cultivo, sem a necessidade de nenhuma suplementação extra, revelando grande potencial para aplicações em possíveis plantas industriais de biodegradação de plásticos.

No entanto, a possibilidade da ocorrência de biodegradação do PE é condicionada a modificações poliméricas extracelulares que acarretem a redução da massa molecular e a oxidação dos segmentos moleculares deste. De fato, uma grande variedade de enzimas participantes da degradação de PE foi reportada na literatura, confirmando o papel crítico vinculado a esses eventos (Santo *et al.*, 2013; Sen & Raut, 2015). Desse modo, a fragmentação oxidativa do PE consiste na primeira etapa da biodegradação, e pode ser decorrente tanto de fatores abióticos (e.g. irradiação) quanto bióticos (e.g. oxidorreduções) (Albertsson *et al.*, 1987; Albertsson & Karlsson, 1990; Shah *et al.*, 2008). Com exceção de um estudo recente que descreveu duas bactérias capazes de degradar PE de 86.000 g.mol<sup>-1</sup> não submetido a pré-tratados (Yang *et al.*, 2014), todas as bactérias biodegradadoras de PE necessitam da realização de tratamentos abióticos no PE para que estas sejam capazes de degradá-lo, os quais incluem irradiação UV e tratamentos químicos. Esses tratamentos resultam na redução da hidrofobicidade e da massa molecular, facilitando

a adesão microbiana e a assimilação de segmentos moleculares do material (Albertsson & Karlsson, 1990; Shah *et al.*, 2008). Nesse sentido, a descrição de microrganismos capazes tanto de promover essas modificações como de utilizar os produtos destas é extremamente nova e promissora no contexto na biodegradação de plásticos recalcitrantes.

A primeira etapa do mecanismo geral de degradação do PE é tipicamente a oxidação deste a partir da (i) formação de iniciais de macrorradicais ( $\bullet R$ ) e  $\bullet H$ , o que envolve a ativação do PE pela abstração de um átomo de H mediante o input energético ou a formação de complexos de transferência de carga (CTC) (Ogihara, 1963; Shilov & Shul'pin, 1997; Gugumus, 2002; Massey *et al.*, 2007; Kirillova *et al.*, 2009; Corrales *et al.*, 2012; Gardette *et al.*, 2013). Um complexo “efeito dominó” é iniciado pela formação do macroradical, resultando na (ii) formação de ligações cruzadas na estrutura do polímero ou na (ii') oxidação (i.e. interação com  $O_2$ , água, entre outras) dessa cadeia carbônica. Essa oxidação produz (iii) outras moléculas reativas que podem (iv) acarretar a formação de outros radicais e reiniciar o processo ou (iv') estabilizar-se na forma de grupos hidroxila, carbonila, carboxila ou nitro e, frequentemente, resultam na formação de insaturações (i.e. grupos vinílicos) (Ogihara, 1963; Albertsson & Karlsson, 1990; Stöver & Li, 1996; Szép *et al.*, 2004).

Os perfis espectroscópicos peculiares dos filmes de PE tratados bioticamente por 90 dias com *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. foram comparados aos submetidos a tratamentos abióticos (i.e. exposição a condições ambientais) por 90 dias e a filmes não tratados, a fim de investigar as modificações químicas induzidas por essas bactérias ou pelos fatores ambientais (**Figura 14**, pg. 61). Os picos de absorção destacados correspondem às principais modificações químicas do PE induzidas pelos tratamentos, como quebra de cadeia ( $915\text{--}905\text{ cm}^{-1}$ ;  $H_2C=C-$ ) e formação de grupos alcóxi ( $1026\text{ cm}^{-1}$ ,  $1090\text{ cm}^{-1}$ ; C-O), acila ( $1220\text{ cm}^{-1}$ ; C-O), nitro ( $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ; N-O), vinileno ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ;  $-C=C-$ ) e carbonila ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ; C=O), revelando notórias diferenças entre as degradações biótica e abiótica.

O espectro de IR dos filmes abioticamente tratados indica a ocorrência de quebra de cadeia (dobramento  $=C-H$ ,  $905\text{ cm}^{-1}$ ) e formação de carbonilas (estiramento C=O,  $1715\text{ cm}^{-1}$ ) (**Figura 14**, pg. 61), o que sugere a ocorrência de dois possíveis mecanismos clássicos de fotodegradação: reações Norrish tipo I e Norrish tipo II (Albertsson & Karlsson, 1990; Orr *et al.*, 2004). Após a oxidação inicial do polímero ( $R-(CH=O)-R$ ), este sofre a reação Norrish tipo I, que produz macrorradicais carbonila e alquila mediante a quebra homolítica do esqueleto carbônico do PE. Considerando-se que o FTIR não detecta a presença de radicais, o resultado dessa reação é inferido a partir do pico de absorção em  $1715\text{ cm}^{-1}$  relacionado à presença de grupos carbonila (**Figura 14**, pg. 61). No entanto, macrorradicais carbonila e alquila podem estabilizar-se em ácidos carboxílico ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ) e álcool ( $1000\text{--}$

1150  $\text{cm}^{-1}$ ), respectivamente, mediante a interação com íons hidroxil (OH) provenientes da dissociação de moléculas de água. Radicais alquila também podem ser convertidos a radicais vinila após a abstração de um H de um grupo  $\text{CH}_2$  terminal, resultando na dupla ligação em posição terminal observada em 905  $\text{cm}^{-1}$  (Albertsson & Karlsson, 1990).

Alternativamente, os picos de absorção em 905  $\text{cm}^{-1}$  e 1715  $\text{cm}^{-1}$  também sugerem a ocorrência de um mecanismo adicional: reação Norrish tipo II, a qual resulta na formação simultânea de grupos carbonila e vinila a partir da quebra heterolítica do PE oxidado (Albertsson & Karlsson, 1990). Tendo em vista que o PE abioticamente tratado não foi exposto apenas a modificações químicas encadeadas pela radiação UV, mas aos vários fatores físicos e químicos relacionados às condições ambientais (e.g. alta variação de temperatura e de umidade, desgaste mecânico, chuva), espera-se que mecanismos químicos adicionais estejam envolvidos no processo de degradação/fotodegradação abiótica.

Filmes tratados bioticamente, por sua vez, apresentaram um perfil de absorção distinto como consequência do ambiente químico gerado nas culturas a partir do metabolismo microbiano, em especial a eventos relacionados a transporte transmembrana e sistemas de secreção e excreção de compostos e moléculas. Os filmes de PE incubados com as bactérias revelaram a formação de álcoois, éteres, ácidos carboxílicos e ésteres, como sugerido pela presença de bandas de absorção relacionadas ao estiramento C–O de grupos alcóxi e acila (**Figura 14**, pg. 61) (Jeon & Kim, 2013). Ademais, a hidroxilação inferida a partir do pico em 1000–1150  $\text{cm}^{-1}$  relacionado à formação de grupos alcóxi (C–O) pode ser uma evidência da hidrólise do PE oxidado. Esses grupos também podem ser formados a partir da estabilização de peroxiradicais. Devido à baixa entalpia de dissociação da ligação O–O de hidroperóxidos (R–O–OH), é improvável que picos de absorção na região compreendida entre 1000–1150  $\text{cm}^{-1}$  representem grupos peróxi (Massey *et al.*, 2007). Apesar de hidroperóxidos serem produtos clássicos da degradação oxidativa de PE, estes decompõem-se rapidamente acarretando a formação de grupos hidroxila e carbonila, bem como de radicais hidroxil, todos relacionados a espécies químicas detectadas no espectro FTIR dos filmes tratados (Albertsson & Karlsson, 1990; Gugumus, 2002; Gardette *et al.*, 2013).

De acordo com estudos anteriores, filmes de PE biodegradados apresentam um pico de absorção intenso em 1640  $\text{cm}^{-1}$  representando o estiramento C=C (Ogihara, 1963; Albertsson & Karlsson, 1990; Gardette *et al.*, 2013; Harisson *et al.*, 2014). Ainda não está claro o modo pelo qual os microrganismos induzem a formação de grupos vinílicos (R–C=C–R) no PE, mas essa modificação química aparenta ser um evento bastante relevante no processo de biodegradação, indicando, inclusive, a ocorrência de quebra da cadeia carbônica polimérica deste (Ogihara, 2013). Especula-se que o complexo ambiente químico decorrente do

metabolismo microbiano em adição aos reagentes do meio de cultura induz a formação de radicais (e.g. CTC) e uma das possíveis configurações destes são grupos vinílicos (Hoffman, 1996). Adicionalmente, esses grupos também podem ser decorrentes da desidrogenação do PE (Jeon & Kim, 2013).

Intrigantemente, uma extensiva formação de grupos nitro (NO<sub>2</sub>), nunca antes relacionada a fenômenos bióticos, ocorreu em todos os filmes bioticamente tratados, refletida na presença de expressivos picos de absorção na região entre 1500–1600 cm<sup>-1</sup> (**Figura 14**, pg. 61). Esse mesmo efeito foi descrito como resultado do tratamento abiótico do PE a partir da exposição deste a uma atmosfera de dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) (Ogihara, 1963). Como esses três gêneros são reportados por participarem de fenômenos envolvendo reações de nitrificação e desnitrificação, (Bellini *et al.*, 2013; Matsuno *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2015; Zhang & Zhou, 2016), especula-se que óxido nítrico (NO) seja sintetizado por esses microrganismos e difunde-se pela membrana externa destes para a interface entre as células e o PE. No meio extracelular, o NO é oxidado pelo O<sub>2</sub> ao reativo radical NO<sub>2</sub> ( $2 \bullet\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{NO}_2$ ), o qual ataca a molécula de PE acarretando a formação de grupos nitro (C–O–N=O) (Ogihara, 1963). Devido à intensidade dos picos de absorção referentes a esses grupos (**Figura 14**, pg. 61), é provável que as reações que resultem nessa modificação oxidativa representem importantes mecanismos de degradação dessas bactérias específicas, especialmente pelo fato de acarretarem a redução da hidrofobicidade e da massa molecular.

A análise em escala micrométrica da topografia do PE (**Figura 15**, pg. 62) revelou a deterioração superficial dos filmes bioticamente tratados, a qual foi muito mais expressiva do que a observada dos filmes abioticamente tratados. Isso pode ser decorrente da ação de enzimas extracelulares ou proteínas transmembrana que fragmentem o PE reduzindo a massa molecular deste, o que permite a posterior assimilação desses fragmentos produzidos. Além disso, o crescimento microbiano na superfície do material também promove a degradação mecânica deste, sendo, assim, outra explicação plausível para o desgaste observado. Este resultado foi confirmado pelas análises do polímero em nanoescala, as quais indicam a formação de profundas cavidades após a atuação microbiana (**Figura 16**, pg. 63). Essas análises nanométricas revelaram também uma grande variação nos parâmetros quantitativos de rugosidade, principalmente em relação aos filmes sujeitos ao tratamento biótico, o que reforça a ocorrência da degradação polimérica. As modificações topográficas dos filmes tratados com essas bactérias podem ser decorrentes da fragmentação microbiana do PE seguida da assimilação dos produtos, enquanto as variações observadas nos polímeros abioticamente tratados são consequência de ligações cruzadas e da fragilização do material (Szép *et al.*, 2004).

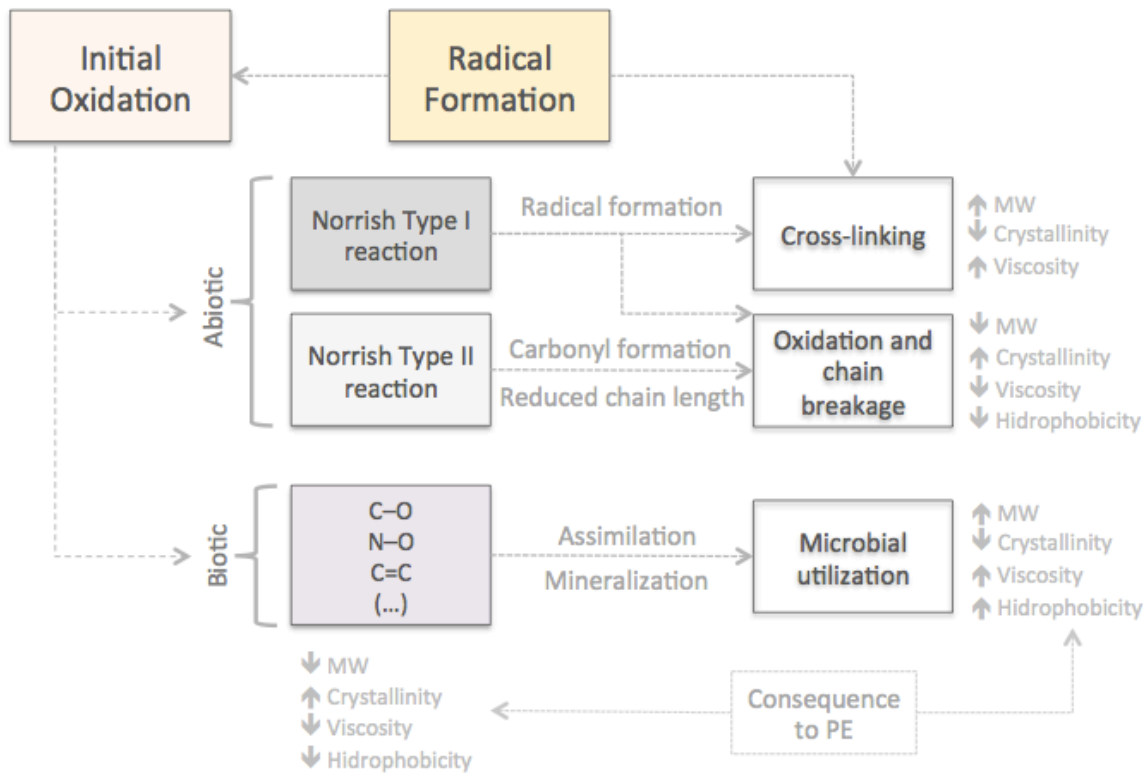


Similarmente, as imagens de fase dos polímeros tratados sugerem significativa redução da redução da massa molecular. Como reportado na literatura, a degradação do PE influencia diretamente a massa molecular média deste (Charlesby *et al.*, 1958; Jeon & Kim, 2013; Su, 2013). A biodegradação do PE acarreta a redução da área da fração viscosa no material, a qual está relacionada a cadeias carbônicas de menor massa molecular, visto que estratégias metabólicas microbianas (e.g. enzimas secretadas) resultam na quebra e oxidação do polímero permitindo a assimilação dos fragmentos produzidos. A simultânea ocorrência de produção e consumo dos fragmentos de baixa massa molecular acarretam, finalmente, o aumento da massa molecular média devido aos eventos assimilação e mineralização dessas moléculas menores, o que aumenta a proporção das regiões elásticas relativas a fragmentos de maior massa molecular (**Figura 17**, pg. 64). Apesar de fatores abióticos também causarem a redução da massa molecular do polímero, similarmente observou-se o aumento da proporção de regiões elásticas nos filmes a estes submetidos. Esse efeito é consequente da vasta formação de ligações cruzadas ocasionada pela produção de radicais (i.e. macroradicaís) durante o processo de degradação abiótica. Estas não apenas compensam pela redução da massa molecular decorrente da quebra da cadeia polimérica, como também diminuem a flexibilidade desta, culminando na redução da área viscosa do material (Magonov *et al.*, 1997; Szép *et al.*, 2004; Nanda *et al.*, 2010). Ressalta-se, ainda, que esses dados são confirmados pela análise dos ângulos de fase, que revelam uma substancial alteração nas fases do PE após ambos os tratamentos biótico e abiótico.

A fragmentação e a assimilação dos produtos desta por parte dos microrganismos também é reforçada pelos resultados referentes à espectroscopia Raman (**Figura 18**, pg. 66). A redução da fração de interfase é consistente com a literatura, já que essa fração corresponde a regiões mais desordenadas em escala atômico-molecular, as quais implicam a presença de moléculas relativamente menores que não se arranjam de forma de cristalina e, portanto, o acesso enzimático a essas moléculas é facilitado (Rull *et al.*, 1993). Como resultado do tratamento abiótico dos filmes de PE, observou-se apenas um discreto aumento no conteúdo cristalino em contraste ao grande aumento esperado em virtude da fragmentação polimérica, já que não há consumo microbiano dos fragmentos de cadeia curta os quais acumular-se-iam no material. Isso fornece mais uma evidência para a ocorrência de ligações cruzadas ao longo da estrutura do PE, que resultam no aumento da massa molecular média deste de maneira consistente com os dados de viscoelasticidade (**Figura 17**, pg. 64). A redução da fração cristalina induzida por *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. sugere a assimilação de fragmentos de baixa massa molecular. Por sua vez, *Stenotrophomonas* sp. induziu um aumento considerável no conteúdo cristalino. No entanto, não é possível inferir se isso é devido à quebra mais eficiente de PE ou ao consumo

mais lento dos fragmentos produzidos no processo de degradação extracelular. A **Figura 56** representa esquematicamente o resumo dos efeitos da degradação biótica e abiótica de PE.

No geral, os resultados sugerem que *Delftia* sp. aparenta apresentar a maior capacidade degradativa, seguida por *Comamonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. Os dados de FTIR revelaram que esses microrganismos empregam estratégias metabólicas distintas, evidenciadas pelas diferenças nos números de onda e nas intensidades dos picos de absorção (**Figura 14a**, pg. 61). No entanto, os índices calculados indicam que *Delftia* sp. induz as maiores modificações químicas no PE sob as condições descritas (**Figura 14b**, pg. 61). Os parâmetros de nanorrugosidade (**Figura 16**, pg. 63) também indicam essa estirpe como maior indutora da deterioração superficial quando comparada a *Comamonas* sp. e *Stenotrophomonas* sp. Embora *Comamonas* sp. tenha apresentado a redução mais substancial da área viscosa (**Figura 17**, pg. 64), a maior área viscosa resultante do tratamento do filme de PE com *Delftia* sp. pode ser consequência da alta eficiência dessa estirpe durante a quebra e assimilação do polímero, o que é reforçado pela menor impacto nas frações cristalina e amorfa do polímero (**Figura 18**, pg. 66).



**Figura 56.** Efeitos dos tratamentos biótico e abiótico nas propriedades físico-químicas do PE. O mecanismo de degradação inicia-se a partir da (i) formação de radical decorrente de input de energia ou de complexos de transferência de carga (CTC), que acarretam a (ii) formação de ligações cruzadas ou a (ii') oxidação inicial da molécula. Ambos os fatores bióticos e abióticos reduzem a hidrofobicidade e a massa molecular do PE, aumentando, portanto, a cristalinidade e a fluidez (relacionada ao comportamento viscoelástico do polímero) do material. No entanto, a degradação abiótica decorrente da reação Norrish tipo I aparenta induzir a formação de radicais, contribuindo para as subsequentes ligações cruzadas que são formadas ao longo da molécula, o que aumenta a massa molecular média e, conseqüentemente, reduz a cristalinidade e a fluidez do polímero. Em um primeiro momento, esses microrganismos reduzem a massa molecular e a hidrofobicidade do material devido à fragmentação oxidativa induzida pela maquinaria metabólica destas. Isso favorece a subsequente assimilação dos fragmentos produzidos a fim de suprir suas demandas energéticas. Como resultado da mineralização desses fragmentos, observa-se o aumento da massa molecular média e a diminuição da cristalinidade e fluidez do PE devido à maior concentração de moléculas maiores ao longo do material.

Após décadas de pesquisa, as estratégias metabólicas empregadas por microrganismos biodegradadores na mineralização de PE ainda são muito pouco conhecidas. Uma vez ocorrida a quebra e oxidação do polímero no meio extracelular, foi proposto que os fragmentos gerados são assimilados e oxidados a CO<sub>2</sub> por meio da  $\omega$ -oxidação e/ou da  $\beta$ -oxidação (Albertsson *et al.*, 1987; Albertsson *et al.*, 1988). Recentemente, uma investigação em nível transcritômico e lipidômico confirmou o envolvimento da  $\beta$ -oxidação nesse processo por meio da conversão intracelular desses fragmentos a ácidos graxos (Gravouil *et al.*, 2017). No entanto, o metabolismo microbiano é caracterizado por extrema complexidade, o que dificulta a descrição completa de todos os possíveis produtos, que compreendem os mais diversos grupos funcionais, e das rotas metabólicas envolvidos no processo de biodegradação do PE.

No presente trabalho, a genômica funcional aliada a dados experimentais possibilitou a compreensão do processo biodegradativo em nível celular a partir da investigação dos mecanismos moleculares desses distintos microrganismos, propondo potenciais mecanismos que participam ativamente ou passivamente do metabolismo de PE. Estudos em nível genômico viabilizam a descrição do potencial degradativo contido no genótipo de cada biodegradador (i.e. *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp.), enquanto análises em nível transcritômico revelam os genes efetivamente expressos em resposta a determinados estímulos e condições. Essas abordagens permitiram não apenas identificar potenciais candidatos (e.g. enzimas e transportadores) possivelmente envolvidos nesse fenótipo, como também fornecer importantes indícios sobre os possíveis produtos gerados em cada etapa e as vias metabólicas que compreendem essas reações. Além disso, essa estratégia subsidiará investigações experimentais direcionadas, a fim de confirmar-se o envolvimento desses mecanismos metabólicos no processo de biodegradação de PE. Sob uma avaliação integrativa em relação aos dados experimentais e análises *in silico*, os resultados sugerem que esses microrganismos empregam estratégias metabólicas clássicas para uma finalidade bastante singular: degradação de plásticos recalcitrantes. Para tanto, esse trabalho propõe não apenas o conhecido envolvimento de oxidorreduções extracelulares para viabilizar a fragmentação oxidativa extracelular desse polímero, como também a importante atuação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), que simulam os efeitos de tratamentos abióticos no PE. Essa pode caracterizar uma potencial estratégia utilizada por esses microrganismos que os torna passíveis de utilizar o PE como fonte de carbono sem a necessidade de prévios tratamentos abióticos facilitadores. Ressalta-se que, até o presente momento, não há descrições na literatura acerca da

potencial atuação dessas espécies reativas no processo de biodegradação, revelando o caráter promissor desses microrganismos no contexto da biodegradação de PE (Figura 65, pg. 154).

### *Produção e efeito de espécies reativas de nitrogênio (RNS) no contexto da biodegradação de PE*

Com base nos espectros de FTIR dos filmes de PE não-tratados e submetidos a tratamentos biótico ou abiótico, observou-se a singular formação de grupos nitro nas amostras biodegradadas (Figura 14, pg. 61,  $1550\text{ cm}^{-1}$ ). Embora tenha sido reportada para o PE exposto a uma atmosfera de dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), essa modificação oxidativa ainda não fora descrita em processos biológicos (Ogihara, 1963). Isso indica a surpreendente coparticipação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) na biodegradação de PE. Esse fenômeno aparenta desempenhar uma função-chave nesse processo, tendo em vista o substancial pico de absorção referente aos grupos nitro nos espectros de IR dos filmes de PE biodegradados. A formação desses grupos funcionais reduz a hidrofobicidade e acarreta a fragmentação do polímero, que são os dois principais obstáculos para a ocorrência da biodegradação. Além disso, o fenômeno também enfatiza a plasticidade, versatilidade e complexidade do metabolismo microbiano, de modo que moléculas relativas a diferentes respostas metabólicas podem atuar em sinergia em um determinado processo celular tendo em vista a não-compartimentalização dos processos celulares. Desse modo, hipotetiza-se que esses microrganismos oxidem amônia ( $\text{NH}_4$ ), que é a única fonte de N presente no MMM, a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e, subsequentemente, reduzam o nitrito a óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) (Figura 19, pg. 68; Figura 23, pg. 72) (Zumft, 1997). O NO produzido difunde-se pela membrana externa para o meio extracelular, onde reage espontaneamente com o  $\text{O}_2$  em virtude da alta reatividade desse radical, resultando na formação do radical dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ). Tendo em vista o contato direto entre a bactéria e a superfície do PE (i.e. adesão microbiana ao substrato), esse radical ataca o polímero, resultando, então, na formação dos grupos nitro na cadeia carbônica do PE ( $\text{C-O-N=O}$ ) (Figura 57).

Nesse contexto, alguns mecanismos moleculares microbianos podem acarretar a produção de NO: nitrificação, denitrificação, quimiodenitrificação e síntese de NO (Figura 23, pg. 72). A nitrificação consiste na síntese de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a partir da amônia e, durante as etapas iniciais desta, o microrganismo oxida amônia a nitrito, comumente por meio do intermediário hidroxilamina, liberando NO como subproduto ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{HNO} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{NO}_2^-$ ) (Pilegaard, 2013). Apesar de a nitrificação autotrófica mediada pela amônia monooxigenase ser a mais bem elucidada, uma grande variedade de bactérias heterótrofas também é capaz de atuar nesse processo oxidativo por meio de diferentes mecanismos (Robertson & Kuenen, 1988; Wood, 1990; Daum *et al.*, 1998; Wrage *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2013). Assim, a produção de nitrito na presença de amônia como

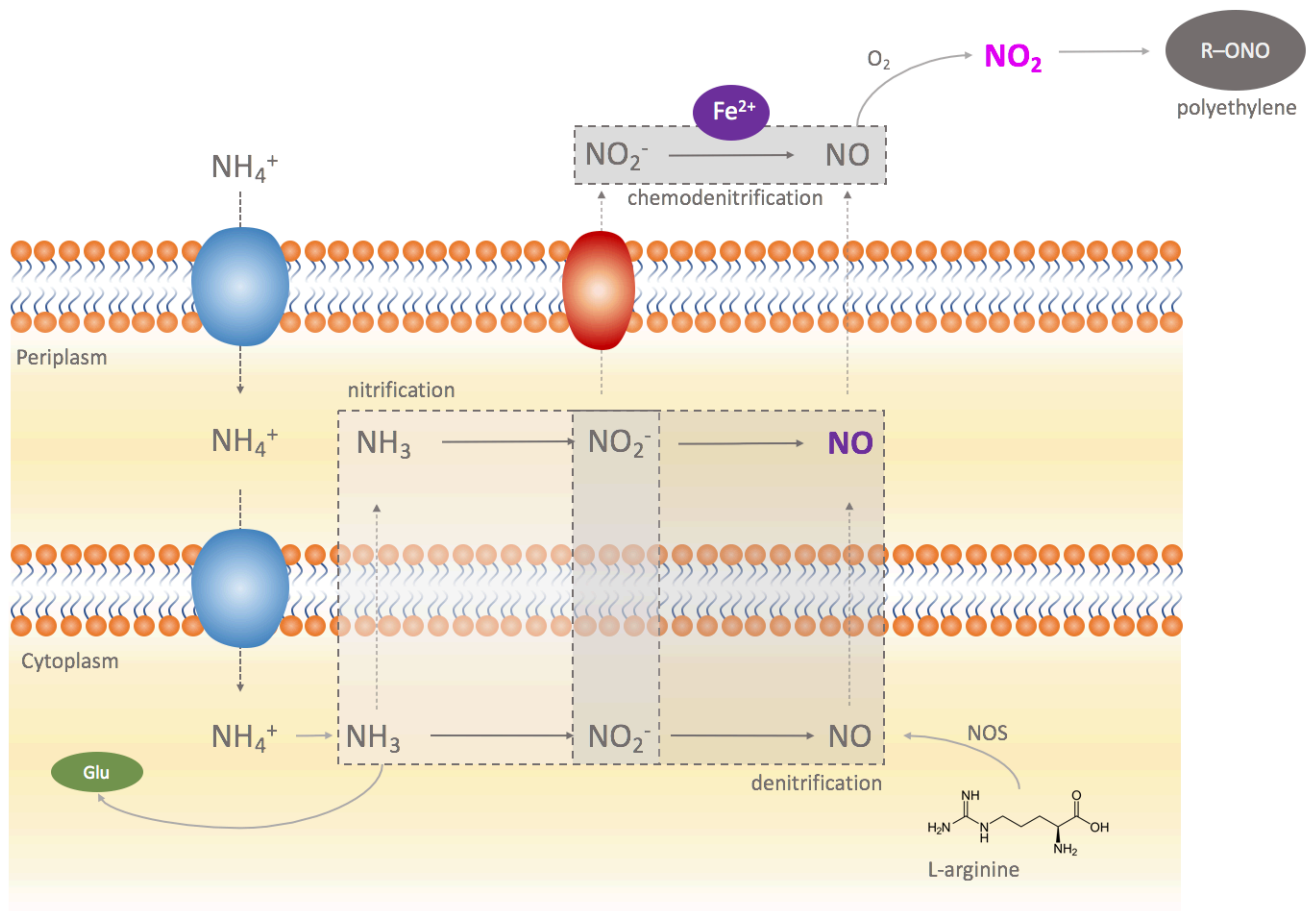
única fonte de nitrogênio (**Figura 19**, pg. 68) sugere que essas estirpes sejam capazes de oxidar amônia, o que as caracteriza como potenciais nitrificadores heterótrofos. Especula-se que este seja um dos processos críticos para a subsequente produção de NO. Ademais, a baixa influência relativa da reação de Fenton para a oxidação de amônia (**Figura 21**, pg. 70) quando comparada à produção biótica de nitrito (**Figura 19**, pg. 68; **Figura 21**, pg. 70) revela que essa oxidação potencialmente ocorre via catálise enzimática. Isso é ainda reforçado pela formação de nitrito a partir de amônia observada nos ensaios enzimáticos realizados com extratos livres de células ser consistente com a produção observada nas culturas dessas bactérias (**Figura 22**, pg. 71). Além disso, o NO também pode ser produzido após a protonação do nitrito em pH ácido a ácido nitroso (HNO<sub>2</sub>), o qual se decompõe em diferentes óxidos de nitrogênio, como o NO e o NO<sub>2</sub> (Pereira *et al.*, 2013). Desse modo, é provável que ambos os mecanismos biótico e abiótico atuem em sinergia para a promoção dessa oxidação e a consequente formação de nitrito.

Durante a desnitrificação ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \uparrow \rightarrow \text{N}_2\text{O} \uparrow \rightarrow \text{N}_2 \uparrow$ ), que compreende a redução do nitrato a gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), o NO é formado a partir da redução do nitrito catalisada, geralmente, por nitrito redutases dissimilatórias. Dentre estas, foram descritas a NirS, ou citocromo cd<sub>1</sub>, e a NirK, homotrímero do tipo multi-cobre, que participam da redução anaeróbia de nitrito (Chen & Strous, 2013). No entanto, nitrificadores heterotróficos também são capazes de realizar essas reduções em condições aeróbias, o que indica o potencial dessas estirpes em efetuar os processos compreendidos pelo metabolismo de nitrogênio (Robertson & Kuenen, 1990; Pilegaard, 2013). De fato, o cultivo desses microrganismos na presença de nitrito como única fonte de nitrogênio sugere a ocorrência da redução do nitrito a NO (**Figura 24**, pg. 74). No entanto, os resultados também sugerem que a quimiodesnitrificação ( $\text{NO}_2^- + \text{Fe}^{2+} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} \uparrow + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ ) possa constituir um importante mecanismo para a produção de NO a partir da redução abiótica do nitrito (**Figura 25**, pg. 75), o que foi constatado inclusive por meio da detecção desse radical com DAF-FM (Robertson & Kuenen, 1990; Pilegaard, 2013).

A produção de NO na presença de nitrato como única fonte de nitrogênio sugere também a potencial atuação da nitrato redutase na produção de NO nessas culturas (**Figura 24**, pg. 74). Considerando-se a instabilidade do NO, que é um radical livre gasoso de curta duração e altamente difusível, a detecção direta deste é bastante capciosa e potencialmente problemática (Tiso & Schechter, 2015). No entanto, a alta produção de nitrito nas culturas de *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. é uma importante evidência da atividade da nitrato redutase nesses microrganismos (**Figura 19**, pg. 68). Outra possível estratégia para a formação de NO é descrita por meio do mecanismo de atuação de óxido nítrico sintases, as quais catalisam a síntese direta desse composto a partir da L-arginina ( $2 \text{ L-arginine} + 3\text{NADPH} + 4\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{ L-citrulline} + 2\text{NO} \uparrow + 3\text{NADP}^+ + 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Crane *et al.*, 2010). A

presença de L-arginina como única fonte de nitrogênio acarretou expressiva produção de NO nas culturas dos 3 microrganismos (Figura 24, pg. 74), revelando não apenas a presença dos genes codificadores dessa enzima nos genomas destes, como também que esse possa constituir outro importante mecanismo de formação desse radical.

A análise conjunta desses resultados sugere que a alta formação de grupos nitro em *Delftia* sp. e *Comamonas* sp. provavelmente é decorrente da atuação simultânea desses vários mecanismos de síntese de NO (Figura 57; Figura 58). Isso é reforçado pelas análises dos genes ativos nas culturas desses três microrganismos que será discutida a seguir. Adicionalmente, evidências na literatura indicam que o metabolismo de nitrogênio em *Comamonas testosteroni* também relaciona-se à maior estabilidade de seus biofilmes, garantindo até mesmo a viabilidade prolongada e sobrevivência das células em microambientes presentes nestes (Wu *et al.*, 2015). Desse modo, reações compreendidas no metabolismo de nitrogênio podem revelar uma complexa estratégia metabólica com impacto em diferentes alvos celulares, consistindo em um dos possíveis fatores que acarretam a sobrevivência dos isolados de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. na presença de PE como única fonte de carbono e a consequente capacidade dessas bactérias em degradar, assimilar e mineralizar esse polímero sintético. Essa estratégia pode indicar uma adaptação bastante particular e promissora desses isolados, também fornecendo suporte ao distinto potencial destes para o processo de biodegradação de plásticos, tendo em vista que esse efeito oxidativo induzido por microrganismos não havia sido descrito até o presente trabalho.



**Figura 57.** Mecanismo sugerido para a formação biótica de grupos nitro na molécula de PE induzida pelo metabolismo microbiano. Primeiramente a amônia é assimilada assistida por transportadores presentes nas membranas externa e plasmática da célula gram negativa e, em seguida, oxidada a nitrito, o que consiste na primeira etapa da nitrificação. Na denitrificação, o nitrito formado é então reduzido a NO. Adicionalmente, o no pode ser sintetizado a partir da L-arginina. Ressalta-se que essas reações são mediadas por catálise enzimática. Mecanismos de redução abiótica de nitrito também contribuem para a produção de NO (quimiodenitrificação). No meio extracelular, o NO, que se difunde livremente pelas membranas microbianas, é oxidado ao radical  $\text{NO}_2$ , que ataca o PE resultando na formação de grupos nitro.

### *Mecanismos de resposta à limitação de carbono*

Diante das características físico-químicas do PE, as quais impedem a imediata assimilação das moléculas constituintes deste, as bactérias cultivadas na presença desse polímero como única fonte de carbono inicialmente acionam mecanismos celulares



sensoriais e de resposta à limitação de carbono (Orr *et al.*, 2004). Esse cenário metabólico está representado nas culturas de *Comamonas sp.*, *Delftia sp.* e *Stenotrophomonas sp.* na ausência de fontes de carbono (Figura 53, pg. 114; Figura 54, pg. 115; Figura 55, pg. 116), revelando, assim, possíveis mecanismos metabólicos utilizados por estas durante os eventos de limitação nutricional. Microrganismos apresentam mecanismos eficientes para responder a alterações ambientais, o que majoritariamente é mediado por redes regulatórias globais que atuam geralmente em nível transcricional. Essa regulação é dirigida por sistemas celulares constituídos por receptores e mecanismos de transdução de sinal, os quais detectam estímulos ambientais e os transmitem ao citosol (Shimizu, 2013). Nesse sentido, observa-se nessas culturas o enriquecimento de genes que codificam quinases e mecanismos de fosforilação (e.g. *phospho-relay*), além do enriquecimento de funções relacionadas à transdução de sinal, possíveis mediadores de respostas a essa condição de estresse.

A escassez nutricional implica a ativação de mecanismos em nível celular que resultem em uma maior eficiência na captação de nutrientes. Esses mecanismos estão refletidos no enriquecimento de genes relacionados a sistemas de transporte, quimiotaxia e motilidade observados nas culturas em limitação de carbono, o que também acarreta a maior sensibilidade e um maior engajamento da célula em relação a internalizar e localizar escassas e potenciais fontes energéticas no ambiente (Sanin *et al.*, 2003; Shimizu, 2013; Garai *et al.*, 2016). Esses sistemas de reconhecimento e assimilação de nutrientes são mantidos constantemente ativos, tendo em vista seu papel crítico na manutenção da viabilidade microbiana, e o reconhecimento de potenciais fontes de carbono ativa respostas metabólicas praticamente instantâneas (Kolter *et al.*, 1993). Como descrito na literatura, em *Vibrio sp.*, sistemas de transporte de glicose e aminoácidos são induzidos durante a limitação de carbono, o que é consistente com o enriquecimento de genes a estes relacionados observados em *Stenotrophomonas sp.* (Albertson *et al.*, 1990; Kolter *et al.*, 1993).

A presença de genes relativos ao componente celular periplásmico e membrana externa não apenas reflete uma estratégia microbiana que visa ao transporte mais eficiente em decorrência da redução da proporção do conteúdo citoplasmático e aumento da razão área/volume, como também à economia do balanço energético celular (Kolter *et al.*, 1993; Sanin *et al.*, 2003). *Stenotrophomonas sp.* também revelou possíveis mecanismos de alteração topológica do DNA, a qual também está relacionada à economia energética por meio da redução da taxa de transcrição, e a sobre representação de genes referentes a proteínas de ligação ao DNA atuantes na proteção deste (Kolter *et al.*, 1993). Mecanismos de resposta à radiação também se mostraram sobre representados, o que, em conjunto às características de proteção ao DNA, pode sugerir que esses mecanismos também regulem a resposta à limitação de carbono. Além disso, a resposta à limitação de carbono em bactérias gram-negativas reportadamente envolve a modificação do envelope celular, possivelmente justificando o enriquecimento de genes relacionados a esse componente

celular (Kjelleberg, 1993). Essas modificações possivelmente refletem a necessidade de proteção e a consequente tendência a isolar o ambiente intracelular do estresse ambiental. Em *E. coli* foram reportadas a alteração da composição dos ácidos graxos de membranas e a modificação da estrutura do peptidoglicano, as quais implicam, respectivamente, uma menor fluidez da membrana e uma maior resistência a autólise (Kolter et al., 1993). Apesar de essas modificações específicas não terem sido investigadas nas culturas dos biodegradadores de PE, essas possibilidades podem ainda direcionar estudos posteriores acerca dos possíveis mecanismos de resposta ao estresse nutricional.

Algumas estratégias metabólicas podem, ainda, promover maior capacidade adaptativa durante a limitação de carbono, resultando na manutenção da viabilidade celular durante essa condição de estresse. Sistemas de comunicação celular, cujos genes estão enriquecidos nas culturas em limitação, são reportados por participarem dessas respostas ao induzirem a repressão do consumo de nutrientes para aumento de biomassa e o subsequente uso desses nutrientes remanescentes para retardar a morte celular (Phaiboun *et al.*, 2015). Em outras palavras, a limitação de carbono acarreta a interrupção da fase exponencial de crescimento para a subsequente entrada na fase estacionária (Sanin et al., 2003). A transposição de elementos genéticos, que também se apresenta enriquecida nas condições descritas, é uma das respostas adaptativas ao estresse e permite que novos traços evoluam no sentido de conferir vantagens metabólicas ao microrganismo (Lamrani *et al.*, 1999; Ilves *et al.*, 2001). De fato, é reportado que culturas bacterianas em limitação nutricional por longos períodos geram mutantes que apresentam maior *fitness*, caracterizando o fenótipo GASP (do inglês, *growth advantage in stationary phase*), o que aumenta a probabilidade de manutenção da viabilidade celular nessas condições (Finkel, 2006; Phaiboun *et al.*, 2015). Desse modo, em um primeiro momento a célula “priorizaria” a manutenção da viabilidade e, após períodos mais longos de limitação, mutantes GASP emergem nas culturas, conferindo vantagens adaptativas em relação a essa condição (Phaiboun *et al.*, 2015).

Tendo em vista que esse sistema coordenado de resposta ao estresse nutricional prioriza a manutenção de funções relacionadas à aquisição de nutrientes, as células microbianas respondem rapidamente à presença de carbono no meio e reiniciam o ciclo de crescimento (Kolter et al., 1993). Especula-se que as moléculas relacionadas à fragmentação oxidativa do PE (i.e. oxidorreduções e espécies reativas) participem ativamente, mesmo que em menor taxa, dessa modificação gradual e, eventualmente, os fragmentos são produzidos. Em seguida, esses fragmentos são reconhecidos e assimilados pelas células em estresse nutricional, acarretando a entrada destas no ciclo de crescimento, aumentando, assim, a eficiência de degradação extracelular do PE decorrentes da maior taxa de respiração celular e maior síntese proteica. Isso é reforçado pelo fato de as

modificações químicas demandarem muito tempo para que possam ser detectadas no espectro FTIR, o que é seguido por um aumento “súbito” na intensidade das bandas de absorção observado após os três meses de cultivo.

### *Mecanismo geral proposto para o metabolismo de PE*

Nos estágios iniciais das culturas contendo PE, é provável que as células microbianas atuem respostas ao estresse nutricional por limitação de carbono em virtude das características físico-químicas do PE, as quais impedem a imediata assimilação desse polímero. Nesse contexto, a primeira etapa necessária para o processo de biodegradação é a fragmentação extracelular do polímero, a qual proporcionará a disponibilização de moléculas assimiláveis que supram as demandas energéticas celulares. Para tanto, a molécula de PE precisa ser ativada (i.e. abstração de um átomo de H) e oxidada por meio da atuação de espécies reativas ou de enzimas da classe das oxidoredutases. Essa etapa é crítica para o processo de biodegradação, tendo em vista que acarreta a redução da massa molecular e da hidrofobicidade do PE. Por esse motivo, o estudo dos mecanismos de fragmentação oxidativa do PE no ambiente extracelular são cruciais para o entendimento do metabolismo desse polímero sintético, já que estes caracterizam etapas limitantes do processo metabólico.

Ao todo, as estirpes caracterizadas de *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* apresentam respectivamente 75, 81 e 54 genes correspondentes a oxidoredutases extracelulares. Todos estes são expressos nas culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. contendo PE, mas *Stenotrophomonas* sp. expressou apenas 31 dos 54 genes codificados em seu genoma. Ademais, 26 desses genes estão presentes e expressos tanto em *Comamonas* sp. quanto em *Delftia* sp., o que suscita a possibilidade de que alguns mecanismos degradativos potencialmente congruentes possam justificar parcialmente as similaridades observadas entre as modificações químicas induzidas por essas bactérias no PE, conforme os dados revelados no espectro FTIR (Figura 14, pg. 61). Isso é reforçado por *Stenotrophomonas* sp. apresentar apenas sete desses genes comuns, sendo que, de fato, o perfil químico do PE tratado com esta estirpe é consideravelmente diferente e revela uma aparente menor efetividade degradativa desta quando comparada àquela dos outros dois microrganismos. No entanto, esses sete genes também estão expressos nas culturas desse organismo contendo PE, sugerindo que possam ser participantes do processo de biodegradação. Embora sejam necessários desenhos experimentais para avaliar o efeito degradativo de cada uma dessas oxidoredutases extracelulares sobre o PE, algumas destas parecem desempenhar funções relevantes nesse processo quando analisadas em paralelo às modificações químicas sofridas

pelos materiais. Integrando-se ao contexto químico, outro importante fator que as tornam promissoras é estarem sendo substancialmente expressas nas culturas contendo PE quando comparadas às outras culturas (glicose e ausência de carbono).

A oxidação biótica de n-alcanos (e.g. parafinas), a qual direciona o entendimento da oxidação de PE, ocorre a partir da formação de álcoois (i.e. álcool) seguida de aldeídos (i.e. alcanal) que, finalmente, serão utilizados para a síntese de ácidos graxos e posteriormente oxidados por meio da  $\beta$ -oxidação (Cheshire *et al.*, 2012). Apesar de o PE estar exposto a uma grande complexidade de moléculas capazes de gerar uma variada cascata de modificações químicas neste, pode-se assumir que essa “escada oxidativa” seja um dos importantes mecanismos oxidativos atuantes, direcionando a busca por enzimas capazes de catalisar reações a partir desses produtos (e.g. álcool e alcanal). De acordo com o espectro FTIR dos filmes biodegradados, a relevante formação de grupos C–O derivados de álcoois (**Figura 14a**, pg. 61, 1000–1150  $\text{cm}^{-1}$ ) pode justificar a intensa expressão de genes que codificam a enzima álcool desidrogenase com atuação extracelular nas culturas desses microrganismos. A atividade destas, por sua vez, estaria envolvida com a oxidação de alcanóis a aldeídos, que são substratos para a síntese de ácidos graxos por meio da também expressa e exportada para o meio extracelular aldeído desidrogenase. Os ácidos graxos de cadeia longa poderiam, então, ser assimilados por meio de transportadores específicos e oxidados no ambiente citosólico por meio da  $\beta$ -oxidação por intermédio da ligase de ácido graxo de cadeia longa, cujo gene codificador apresenta-se superexpresso nas culturas contendo PE. Além disso, a enzima álcool desidrogenase também catalisa a oxidação de alcanos a alcanóis, o que consiste em outro potencial mecanismo para a oxidação do PE (Tieves *et al.*, 2016).

No entanto, de acordo com os dados experimentais, que refletem a grande variedade de espécies químicas formadas no PE mediante os tratamentos, vários eventos moleculares aparentam atuar simultânea e conjuntamente. A análise dos transcritomas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. também revelou a substancial expressão do gene que codifica uma enzima com atividade de cobre-oxidase extracelular de aproximadamente 460 aminoácidos nas culturas contendo PE. Enzimas dessa classe atuam na catálise de oxidações utilizando centros de cobre como aceptores de elétrons, a exemplo das lacases, que são naturalmente envolvidas da degradação de compostos aromáticos, mas cuja participação na oxidação no processo de biodegradação de PE foi extensivamente descrita (Bento *et al.*, 2005; Santo *et al.*, 2013). Ambas as estirpes também apresentam uma abundante expressão de duas dioxigenases de aproximadamente 270 aminoácidos, as quais catalisam a oxidação do substrato mediante a incorporação de um dióxigênio, além de também estarem notadamente relacionadas à degradação de hidrocarbonetos e compostos aromáticos (Bugg, 2003). Oxidases ligadas ao FAD contendo 1304 aminoácidos também se enquadram nesse contexto. Um exemplo de enzima dessa classe é a vanilil-álcool oxidase, que reconhece uma vasta gama de compostos fenólicos e está envolvida com a degradação de

metabólitos secundários da degradação da lignina (substrato natural de lacases). Similarmente, também foram observadas duas salicilato monooxigenases (aproximadamente 400 aminoácidos), que participam da degradação de inúmeros compostos aromáticos, e três desidrogenases de cadeia curta (250 aminoácidos). Adicionalmente, *Comamonas* sp., por sua vez, também apresenta outros genes que codificam potenciais participantes do processo degradativo extracelular como a intradiol *ring-cleavage* dioxigenase (298 aminoácidos), duas oxidoreduases (302 e 255 aminoácidos) e a fenol-2-monooxigenase (636 aminoácidos). Dentre os 13 potenciais participantes da modificação extracelular de PE identificados em *Comamonas* sp. e *Delftia* sp., 9 não foram totalmente caracterizados com base nos bancos de dados, podendo estes, assim, constituir estratégias degradativas ainda não descritas. Isso os caracteriza como inéditos e potenciais candidatos à oxidação e fragmentação do PE e, posteriormente, o efeito desses 13 candidatos nas propriedades físico-químicas do polímero sintético será investigado de maneira específica e aprofundada.

Ademais, *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. expressam o gene codificador da enzima extracelular 2-alcenal redutase, a qual está relacionada à degradação de aldeídos insaturados (2-alcenal) e atua na desintoxicação celular de lipídeos contendo aldeídos derivados de peróxidos em plantas (Yin *et al.*, 2010). A formação desses lipídeos está intimamente relacionada a danos celulares causados por estresse ambiental (e.g. radiação e calor), acarretando a síntese de enzimas sequestradoras de aldeídos como a aldeído desidrogenase, que é superexpressa pelos três microrganismos na presença de PE, e a aldeído redutase (Ma *et al.*, 2007). Além de ser um indicio da presença massiva de espécies reativas, que são a principal consequência do estresse ambiental, essa enzima pode estar relacionada à modificação química do polímero sintético. Tendo em vista a natureza hidrofóbica do seu substrato natural, que é quimicamente similar a possíveis produtos de degradação do PE, e considerando-se a grande presença de insaturações e a formação de C=O de aldeídos alifáticos (**Figura 14a**, pg. 61, 1720 – 1740  $\text{cm}^{-1}$ ) nos PE biodegradados, é possível que essa enzima atue da modificação extracelular polimérica resultando na formação das insaturações observadas no espectro FTIR (**Figura 14a**, pg. 61, 1640  $\text{cm}^{-1}$ ). No entanto, não é possível definir se esse processo está relacionado à redução da massa molecular do polímero, o que requer investigações mais aprofundadas.

Conforme mencionado anteriormente, além da aldeído desidrogenase, as três estirpes também apresentaram uma relevante expressão de um gene referente a uma álcool desidrogenase extracelular. Traçando-se um paralelo com o metabolismo de parafinas (i.e. PE de cadeia extremamente curta), esses alcanos são primeiramente oxidados a álcool por meio da álcool desidrogenase e, em seguida, a aldeídos por meio da aldeído desidrogenase, mecanismo preconizado na síntese de ácidos graxos (Ji *et al.*, 2013). De acordo com o espectro FTIR, é notória não apenas a vasta presença de ligações C–O derivadas de álcoois (**Figura 14a**, pg. 61, 1000 – 1150  $\text{cm}^{-1}$ ), como também, embora em menor grau, de ligações C=O aldeídicas (**Figura 14a**, pg. 61,

1740  $\text{cm}^{-1}$ ). Isso pode sugerir que essas enzimas desempenhem um papel importante na degradação extracelular do PE previamente oxidado, contribuindo para as etapas oxidativas secundárias que possam acarretar a produção de fragmentos assimiláveis. De qualquer maneira, essas enzimas são fundamentais para o processo metabólico desse polímero, já que irão mediar a síntese de ácidos graxos no ambiente extracelular, os quais serão assimilados e gerarão energia para a maquinaria microbiana mediante a  $\beta$ -oxidação.

Em virtude da diferença entre os genes codificadores de oxidoredutases extracelulares de *Stenotrophomonas* sp. em relação às outras duas estirpes, tendo em vista que apenas o gene que codifica uma desidrogenase de cadeia curta foi um potencial candidato em comum entre esses três microrganismos, optou-se por fazer uma análise daquela à parte destas. Esse microrganismo expressa consideravelmente os genes que codificam as enzimas 2-octaprenil-3-metil-6-metóxi-1,4-benzoquinol hidroxilase (393 aminoácidos), 2-octaprenil-6-metoxifenil hidroxilase (402 aminoácidos) e uma monoxigenase da família COQ6 (392 aminoácidos), que são pertencentes à via do metabolismo de ubiquinonas e terpenóides, especializadas na catálise da oxidação de compostos aromáticos complexos. Também estão expressos os genes que codificam desidrogenase (425 aminoácidos) e NADH desidrogenase (426 aminoácidos), esterase (78 aminoácidos) reportada no metabolismo de ácidos graxos de longa cadeia, glutatona peroxidase (189 aminoácidos) e kinurenina 3-monoxigenase (447 aminoácidos). Adicionalmente, *Stenotrophomonas* sp. expressa o gene da alceno redutase extracelular (371 aminoácidos), o que poderia contribuir para a redução das insaturações provocadas pela estabilização da ativação do PE e por outros efeitos dos tratamentos bióticos deste, reduzindo, portanto, o conteúdo de duplas ligações conforme observado no espectro FTIR (**Figura 14a**, pg. 61,  $\text{C}=\text{C}$  stretching).

Além do importante papel desempenhado pelas oxidoredutases extracelulares, outro mecanismo crucial para a fragmentação oxidativa do PE no ambiente extracelular é a atuação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Existem diversas fontes de espécies reativas no contexto metabólico, tanto que a própria célula dispõe de diversos mecanismos para neutralizar os efeitos prejudiciais e deletérios à integridade microbiana. A formação biótica de RNS é mediada pela produção de óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ), a partir do qual são produzidas outras moléculas dotadas de elevada reatividade, como o dióxido de nitrogênio ( $\bullet\text{NO}_2$ ), o peroxinitrito ( $\text{NO}_3^-$ ) e o íon nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ). A aerobiose não apenas favorece a formação de  $\text{NO}$  e seus derivados, como também resulta na formação de subprodutos de oxigênio altamente reativos (ROS), como o superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radicais hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), decorrentes da atividade de redução do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) das enzimas da cadeia respiratória (Cabiscol Català *et al.*, 2000). Além disso, as ROS são importantes subprodutos da atuação de

oxidorreduções durante a transferência de elétrons do O<sub>2</sub> para outros substratos, sendo, portanto, produzidas em função da atividade redox (Srinivasan & Avadhani, 2012; Zhao & Drlica, 2014; Imlay, 2015). Adicionalmente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado por meio da atividade metabólica microbiana é uma potencial fonte de radicais hidroxil (●OH) por meio da reação de Fenton a partir da oxidação do Fe<sup>2+</sup>, um dos metais disponíveis nos meios de cultura utilizados (Zhao & Drlica, 2014). Por sua vez, o NO é produzido por meio da atividade de enzimas como a óxido nítrico sintase e a nitrito redutase, cujos genes apresentam-se substancialmente expressos nas culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. contendo PE.

Os potenciais alvos biológicos de ROS são o DNA, RNA, proteínas e lipídeos, os quais são muito afetados quando a concentração desses compostos ativos é elevada a níveis acima da capacidade de defesa da célula, caracterizando, assim, o estresse oxidativo. Os lipídeos são os maiores alvos desses radicais, os quais acarretam a peroxidação dessas moléculas resultando na redução da fluidez da membrana e na acentuada desestabilização de proteínas a esta ancoradas. Esses lipídeos peroxidados são degradados a uma grande variedade de produtos, a exemplo dos aldeídos que, conforme mencionado acima, acarretam efeitos tóxicos no ambiente celular, podendo modificar moléculas como proteínas por apresentarem alta reatividade (Frankel, 1987; Cabiscol Català *et al.*, 2000). Isso gera uma reação em cascata, pois esses produtos gerados atacam outras macromoléculas intracelulares, amplificando, assim, o efeito oxidativo das ROS. Por sua vez, os danos no DNA impedem a replicação por meio da ampla formação de lesões ao longo da molécula, o que inclui a quebra da dupla fita, ligações cruzadas a outras moléculas e formação de adutos nas bases nitrogenadas e na desoxirribose. Esses danos moleculares ao material genético podem, inclusive, ser consequentes do efeito da lipoperoxidação (Łuczaj & Skrzydlewska, 2003, Carvalho, 2001). O efeito dos radicais livres em nível proteico resulta na perda de funções destas por induzirem a formação de ligações cruzadas a outras moléculas, a oxidação de sulfidrilas, a redução de ligações dissulfeto, a modificação de grupos prostéticos e centros metálicos e a fragmentação da cadeia polipeptídica (Cabiscol Català *et al.*, 2000). Similarmente, RNS, embora constituam mecanismos de defesa e sejam importantes moléculas sinalizadoras da célula microbiana, são tóxicas quando em alta concentração por interagirem com proteínas contendo grupos heme, ferro ou cobre como ligantes, além de formarem o potente e reativo oxidante ácido peroxinitroso. As RNS reagem com vários componentes celulares e seus efeitos incluem lesões no DNA e na membrana além da inibição da cadeia respiratória (Rogstam *et al.*, 2007). Desse modo, as funções celulares são severamente comprometidas, o que resulta na perda de viabilidade microbiana caso não haja um eficiente mecanismo de controle do estresse oxidativo e nitrosoativo.

Para contrapor o efeito deletério proveniente de ROS, a célula sintetiza enzimas de desintoxicação, como a superóxido dismutase e a peroxidase, e moléculas antioxidantes, como a glutatona, NADH/NAPH e metabólitos secundários (e.g. carotenoides

e terpenóides) (Cabiscol Català *et al.*, 2000). De fato, os genes que codificam essas enzimas bem como as relacionadas à síntese desses metabólitos secundários estão substancialmente expressos nas culturas das três estirpes na presença de PE. Isso caracteriza mais uma evidência da alta produção dessas espécies reativas. Adicionalmente, a degradação de alcanos é reportadamente indutora da expressão desses genes como consequência da alta produção de ROS durante as atividades oxidativas relacionadas à  $\beta$ -oxidação (Kato *et al.*, 2009). Essas estirpes também expressam diversos genes que codificam enzimas contendo domínios funcionais com atividade peroxidase, como peroxiredoxinas e carboximuconolactona descarboxilases, envolvidas respectivamente no metabolismo do importante antioxidante glutatona e na degradação de compostos aromáticos (Ornston, 1966; Masip *et al.*, 2006.). Acredita-se que essa alta expressão de genes de defesa ao estresse oxidativo seja consequência da alta produção de ROS nessas culturas. A superóxido dismutase catalisa a partição do radical  $\bullet\text{O}_2^-$  em  $\text{O}_2$  ou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que por sua vez sofre a ação de peroxidases (e.g. catalase) durante a oxidação de substratos produzindo  $\text{H}_2\text{O}$ . As peroxidases também podem ser atuantes na oxidação do polímero sintético, resultando na formação de hidroxilas alcoólicas neste (Figura 14a, pg. 61, 1000 – 1150  $\text{cm}^{-1}$ ). Além disso, estas enzimas são reportadas por acarretar grande redução da massa molecular do PE em culturas de fungos lignolíticos (Iiyoshi *et al.*, 1998).

Hipotetiza-se que essa alta produção de ROS possa ser acarretada pela grande atividade de oxidorreduções na oxidação do PE e pela intensa atividade da cadeia respiratória devido à alta disponibilidade de átomos de carbono sendo oxidados a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  no ciclo do ácido cítrico, e retroalimenta esse sistema por acarretar a fragmentação oxidativa desse polímero, disponibilizando um total ainda maior de fragmentos assimiláveis. Outro possível mecanismo de formação de ROS é decorrente da significativa concentração de metais no meio de cultura que podem atuar como CTCs (complexos de transferência de carga). Ademais, metais redox-ativos, como ferro e cobre, atuam como catalisadores em reações oxidativas, acarretando, inclusive, a produção de ROS (Ercal *et al.*, 2001). Cabe ressaltar que, em culturas de *Stenotrophomonas* sp. contendo glicose, a expressão de genes relativos a proteínas de defesa ao estresse oxidativo foi ainda maior do que a observada nas culturas contendo PE. Isso sugere uma maior produção de ROS nessas culturas, o que pode estar relacionado a uma melhor eficiência metabólica induzida por essa fonte de carbono central do metabolismo, o que é consistente com o esperado, já que seu perfil de expressão assemelhou-se ao observado durante a limitação de carbono. Além disso, isso reforça que a origem dessas espécies químicas esteja também relacionada à eficiência metabólica, que acarreta maior taxa de atividade respiratória e oxidativa em nível celular.

O efeito direto desses radicais no contexto da biodegradação é semelhante ao efeito do tratamento abiótico do PE, no qual a cadeia carbônica é ativada dando origem a uma série de reações sequenciais que resultam tanto na ativação de outras



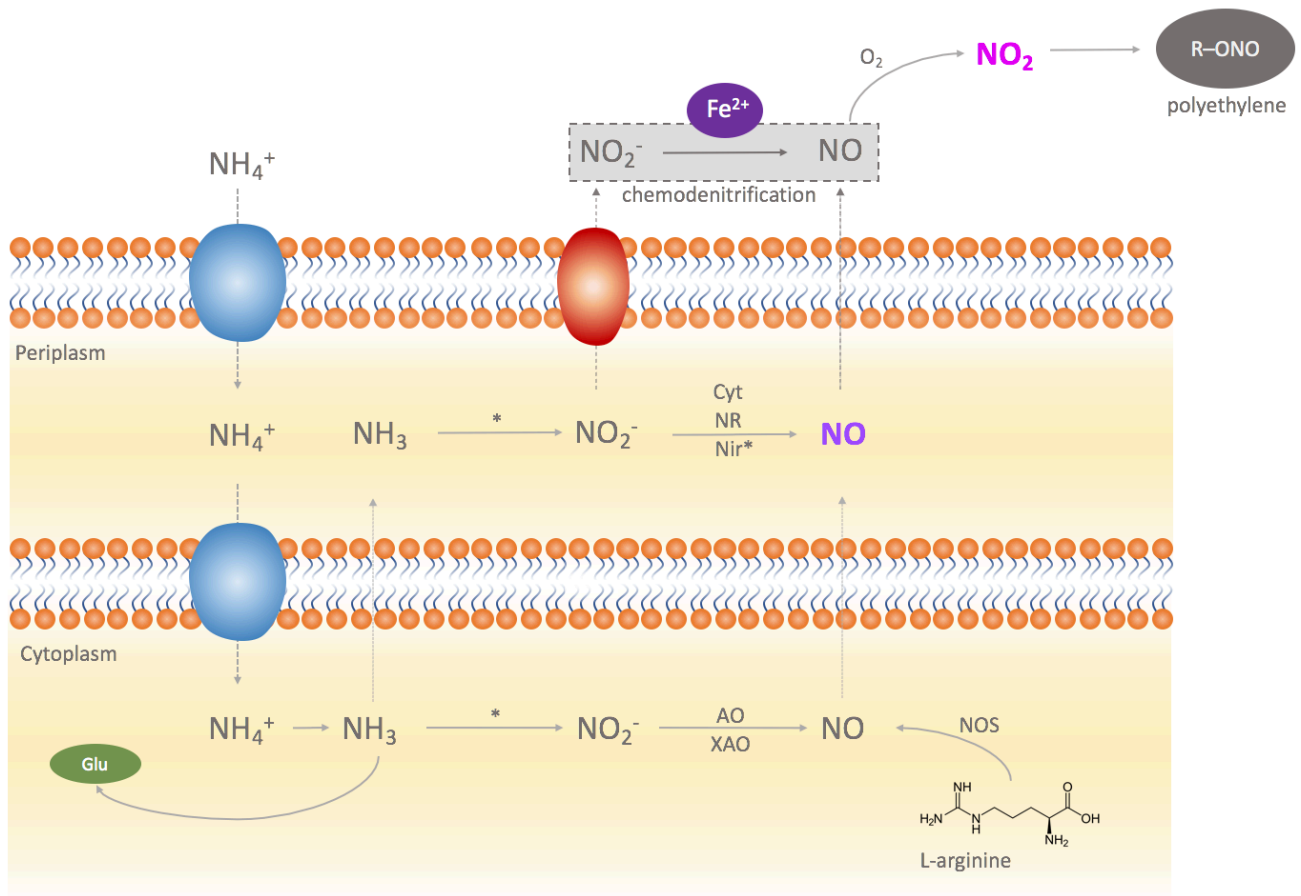
porções da molécula, como também na estabilização dos radicais alquila em espécies químicas de maior grau de oxidação (e.g. insaturações, cabonilas, nitro), podendo ou não acarretar a quebra da cadeia polimérica. ROS podem estar envolvidas com a formação de grupos alcóxi no polímero (**Figura 14a**, pg. 61, 1000 – 1150  $\text{cm}^{-1}$ ), que podem ser produzidos pelo ataque do radical hidroxil ou de peróxidos, cujo produto é imediatamente estabilizado a C–O por possuir ligações O–O de baixa entalpia de dissociação (Massey *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2017). Essas espécies também justificariam a formação de ligações C=O (**Figura 14a**, pg. 61, 1700 – 1750  $\text{cm}^{-1}$ ) por um mecanismo semelhante ao da foto oxidação (Albertsson & Karlsson, 1990) e de grupos vinileno mediante a desidrogenação de  $\text{CH}_2$  (**Figura 14a**, pg. 61, 1640  $\text{cm}^{-1}$ ), bem como a quebra da cadeia polimérica evidenciada pela presença de grupos vinila (**Figura 14a**, pg. 61, 905  $\text{cm}^{-1}$ ).

Na presença de  $\text{O}_2$ , o NO produzido pelas células (**Figura 23**, pg. 72) é rapidamente oxidado ao radical  $\text{NO}_2$  que, por apresentar altíssima reatividade, ataca a cadeia carbônica do PE, acarretando a formação de grupos nitro (**Figura 14a**, pg. 61, 1550  $\text{cm}^{-1}$ ; **Figura 58**). As principais enzimas reportadas por estarem envolvidas na produção de NO são a óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a síntese de L-citrulina e NO a partir da L-arginina, e a nitrito redutase (Nir), que catalisa a redução do nitrito a NO em bactérias denitrificadoras (Wrage *et al.*, 2001; Crane *et al.*, 2010; Pilegaard, 2013). Adicionalmente, o NO também pode ser gerado como subproduto da oxidação da amônia a nitrito em bactérias nitrificadoras, bem como abioticamente a partir da quimiodenitrificação (**Figura 25**, pg. 75) (Pilegaard, 2013). A elevada expressão de genes codificadores de óxido nítrico dioxigenases reforça a relevante produção de NO nas culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp., visto que essas enzimas estão relacionadas à desintoxicação de NO ( $2 \text{ NO} + 2 \text{ O}_2 + \text{NAD(P)H} \rightarrow 2 \text{ NO}_3^- + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+$ ). Adicionalmente, a formação de peroxinitrito ( $\text{NO}_3$ ) nas culturas acarreta a liberação dos radicais  $\bullet\text{NO}$  e  $\bullet\text{OH}$  a partir da decomposição deste (Richeson *et al.*, 1998). Similarmente, radicais alquilperóxidos ( $\bullet\text{RO}_2$ ) potencialmente produzidos nas culturas dessas bactérias reagem com o NO formando o instável intermediário peroxinitrito, o qual decompõe-se produzindo  $\text{NO}_2$  e radicais alcóxi ( $\bullet\text{RO}$ ) caracterizando outra potencial fonte de  $\text{NO}_2$  e outros radicais ( $\bullet\text{RO}_2 + \text{NO} \leftrightarrow \text{ROONO} \rightarrow \bullet\text{RO} + \text{NO}_2$ ) (Calvert, 2008).

De fato, o gene que codifica a enzima óxido nítrico sintase apresentou-se expresso nas culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp., mas não foi possível confirmar a presença deste no genoma de *Stenotrophomonas* sp., o que é surpreendente tendo em vista que essa estirpe apresentou significativa produção de NO de acordo com os dados experimentais (**Figura 23**, pg. 72). Apesar disso, as culturas de *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. na presença de L-arginina como única fonte de nitrogênio apresentaram uma relevante produção de NO, indicando a presença e expressão de genes codificadores de óxido nítrico sintase

(Figura 24, pg. 74). Embora não tenham sido anotados genes codificadores de nitrito redutases em *Stenotrophomonas* sp., foi observada a alta expressão de um gene genericamente classificado com a função de cobre oxidase periplasmática (608 aminoácidos), que poderia corresponder a uma nitrito redutase devido à similaridade entre os domínios conservados compartilhada por essas enzimas. Uma vasta gama de enzimas também pode apresentar atividade de nitrito redutase, incluindo heme globinas, enzimas contendo molibdênio, NOS e componentes da cadeia respiratória (Shiva, 2013).

Em contrapartida, também foram encontrados nos três microrganismos genes expressos que codificam uma ubiquinol oxidase com funções de citocromo e domínio de ligação ao cobre, um citocromo C com domínio de ligação ao cobre, cobre oxidases e citocromos contendo centros redox tipo heme, que são consistentes com nitrito redutases, além de uma formato desidrogenase com atividade de nitrato redutase em *Stenotrophomonas* sp. (Chen & Strous, 2013). Esta estirpe também apresentou a expressão de genes codificadores de NADH-quinona oxidoreductase com sítios de ligação ao molibdênio consistentes com os genes de nitrato redutases, as quais também catalisam a redução do nitrito a NO. Por sua vez, os genes codificadores da nitrato redutase em *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. apresentaram considerável expressão nas culturas contendo PE (Figura 40, pg. 98). Paralelamente, a aldeído oxidase e xantina oxidase, cujos genes também apresentam-se substancialmente expressos nessas culturas, apresentam alta similaridade estrutural com a nitrito redutase e também estão relacionadas à redução do nitrito a NO em condições aeróbias, o que as caracteriza como outras possíveis fonte de produção de NO (Figura 58) (Li *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2009; Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Essas diferenças na expressão de genes relacionados à produção de NO podem caracterizar uma explicação plausível para a maior efetividade de *Comamonas* sp e, principalmente, de *Delftia* sp., a qual apresenta um maior número desses genes expressos, na modificação oxidativa de PE referente à formação de grupos nitro. Ademais, todas as estirpes apresentaram elevada expressão de azurinas e molibdopterinas nas culturas contendo PE, que são cofatores da nitrito redutase e nitrato redutase, respectivamente (Shoun *et al.*, 1998).



**Figura 58.** Mecanismo proposto para a modificação oxidativa extracelular de PE mediada por espécies reativas de nitrogênio (RNS) em bactérias gram negativas. Cyt: citocromo, NR: nitrato redutase, Nir: nitrito redutase, AO: aldeído oxidase, XAO: xantina oxidase, NOS: óxido nítrico sintase. (\*) Reações mediadas por enzimas potenciais que não foram identificadas. Ressalta-se que *Delftia* sp. apresenta o maior número de genes coficadores dessas enzimas expressos nas culturas com PE, seguida por *Comamonas* sp. Esses genes não foram observados no genoma anotado de *Stenotrophomonas* sp., com exceção de potenciais genes codificadores de enzimas contendo domínios funcionais similares.

Embora não esteja diretamente relacionada à produção ou aos efeitos das RNS, a enzima nitronato monoxigenase apresenta potencial para atuar na degradação de possíveis produtos gerados por meio destas. Essa enzima, expressa por *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. na presença de PE, apresenta nitroalcanos como substrato da resultante produção de nitrito e acetaldeído. Diante do fato de todas as três estirpes serem produtoras de nitrito, conforme revelado pelos dados experimentais (Figura 19, pg. 68), a potencial atuação dessa enzima no processo degradativo de PE está refletida no fato de que a reação por

esta catalisada pode ser uma importante fonte desse composto nas culturas desses organismos. Ainda, essa atividade retroalimenta a síntese de NO, que pode ser produzido abioticamente a partir do nitrito por meio da quimiodenitrificação ( $\text{NO}_2^- + \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ \rightarrow \bullet\text{NO} + \text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ ), e acarreta a formação do  $\text{NO}_2$ . Paralelamente, também se observou a superexpressão de nitroreduases, que participam na ativação de nitrocompostos. Nitroreduases do tipo II catalisam a redução de um elétron na presença de oxigênio, produzindo um radical nitro que reage com o  $\text{O}_2$  formando um superóxido e regenerando o grupo nitro em ciclo redox fútil que apresenta um papel importante na formação de radicais livres (De Oliveira *et al.*, 2010). Tendo em vista o efeito das espécies reativas de nitrogênio (RNS) proposto nesse trabalho, um dos possíveis mecanismos de produção de nitro compostos é a partir da nitratação de alcanos por radicais livres (e.g. NO,  $\text{NO}_2$ ), o que acarreta na fragmentação do alcano gerando uma mistura do alcano original com moléculas nitradas de inúmeros tamanhos de cadeia (e.g. nitrometano, nitroetano e nitropropano) (Markofsky, 2000). Sobretudo, isso sugere que o efeito oxidativo das RNS nessas estirpes possa implicar uma consequência mais abrangente do que a redução da hidrofobicidade e massa molecular, permitindo inclusive que as células utilizem os produtos gerados e classificando esse mecanismo de fragmentação oxidativa como uma promissora e diferencial estratégia degradativa.

De modo geral, radicais livres, como ROS e RNS, podem acarretar a abstração de  $\bullet\text{H}$  da cadeia carbônica do PE (i.e. ativação) provocando sua posterior oxidação, o que é facilitado pela presença de duplas ligações ou grupos carbonila adjacentes (Albertsson & Karlsson, 1990). Uma vez que o polímero tenha sido ativado, uma complexa variedade de modificações oxidativas pode ocorrer, resultando tanto na redução da massa molecular (**Figura 17**, pg. 64) como na formação dos diferentes grupos oxidados conforme exposto no espectro FTIR (**Figura 14**, pg. 61). Propõe-se que as modificações oxidativas mediadas por ROS e RNS apresentam um papel chave na ativação do PE, e a alta produção destas pode ser fundamental para que essas espécies sejam capazes de biodegradar esse polímero recalcitrante sem a necessidade de pré-tratamentos. Essas inferências são consistentes com os dados experimentais, que revelam o grande impacto das espécies reativas na modificação do perfil químico do PE (**Figura 25**, pg. 75; **Figura 26**, pg. 76). ROS/RNS induzem não apenas a oxidação do polímero, como também a redução da massa molecular deste. Esse efeito oxidativo é ainda potencializado pelo crescimento microbiano sobre a superfície do material, o que resulta na exposição de porções mais internas do polímero a todos esses agentes oxidativos (**Figura 15**, pg. 62).

Após a ocorrência de eventos moleculares que acarretem a oxidação do PE, enzimas hidrolíticas também podem apresentar um papel importante na fragmentação extracelular do PE (**Figura 42**, pg. 99). A partir da etapa inicial de oxidação polimérica, na qual são produzidos grupos funcionais como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e nitro (**Figura 14**, pg.

61), o PE torna-se particularmente mais susceptível a reações de quebra por hidrólise devido a esse fenômeno de oxidação parcial (Gewert *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento de PE com água destilada por 1 ano resultou na formação de álcoois ( $-OH$ ) e cetonas ( $=O$ ) na estrutura deste sem a ocorrência de redução na massa molecular e, conseqüentemente, sem a formação de ésteres ou ácidos carboxílicos ( $O=C-O$ ), os quais resultam da fragmentação oxidativa do polímero (Massey *et al.*, 2007). Com isso, foi estabelecido que as espécies químicas decorrentes da ionização da água (i.e.  $OH^-$  e  $O_2^-$ ) abstraem o  $\bullet H$  do PE (i.e. ativação) por meio desses CTCs produzindo um macroradical alquila ( $\bullet R$ ), que então reage com os íons  $OH^-$  e/ou  $O_2^-$  originando, respectivamente, grupos  $-OH$  e  $-OH/=O$  na cadeia polimérica (Massey *et al.*, 2007). Nesse sentido, a atuação de hidrolases poderia não apenas catalisar a fragmentação do PE previamente oxidado, como também catalisar a oxidação não-fragmentativa deste.

Com base nos resultados obtidos (Figura 42, pg. 99), infere-se que *Stenotrophomonas* sp. apresenta o maior potencial hidrolítico em relação ao meio extracelular. Desta foram selecionados 16 genes candidatos para investigações posteriores, enquanto de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. foram selecionados 3 e 5, respectivamente. Esses genes foram selecionados com base na reação catalisada pela enzima que estes codificam, como esterases,  $\alpha$ - $\beta$ -hidrolases, lipases e hidrolases que atuam em ácidos carboxílicos e compostos aromáticos. Interessantemente, observou-se a expressão de alguns genes referentes a nucleases extracelulares, o que pode ser uma evidência da formação de biofilmes devido ao importante papel desempenhado pelo DNA extracelular (eDNA) na estrutura destes (Jakubovics *et al.*, 2013; Okshevsky & Meyer, 2015). Tendo em vista o caráter aniônico do DNA, que é um quelante de vários cátions, e seu potencial na restrição da difusão de nutrientes e outros compostos, especula-se que a fragmentação dessas moléculas possa ser interessante no sentido de otimizar a atividade metabólica das células e a aquisição de nutrientes a partir do meio (Okshevsky & Meyer, 2015). Além disso, também se observa o potencial dessas estirpes para a degradação de amido e celulose, o que é bastante interessante sob a perspectiva biotecnológica.

*Stenotrophomonas* sp. também expressa o gene que codifica a enzima polihidroxibutirato (PHB) despolimerase extracelular, especialmente na presença de PE. O polihidroxibutirato é um polímero da classe dos polihidroxialcanoatos (PHA), ou poliésteres, frequente associado a grânulos de reserva de carbono e energia em bactérias. Curiosamente, as três estirpes possuem em seus genomas os genes referentes ao metabolismo de butanoato (i.e. butirato) envolvidos na síntese e degradação desses polímeros de reserva (Figura 59). Todavia, é improvável que esses polímeros sejam potenciais fontes de carbono durante a limitação nutricional realizada no presente estudo, tendo em vista que dados experimentais revelam expressiva morte celular após 15 dias

de incubação na ausência de fontes de carbono (Figura 12, pg. 58). Microrganismos sintetizam esses polímeros durante períodos de alta disponibilidade de nutrientes e, principalmente, durante a fase estacionária (Quelas *et al.*, 2016). Como as células são previamente cultivadas em meio nutriente (vide seção 3 da metodologia) apenas pelo tempo necessário para o aumento de biomassa decorrente da divisão celular, acredita-se que esse polímero não seja estocado, o que é consistente com os dados experimentais das culturas em meio mínimo na ausência de carbono.

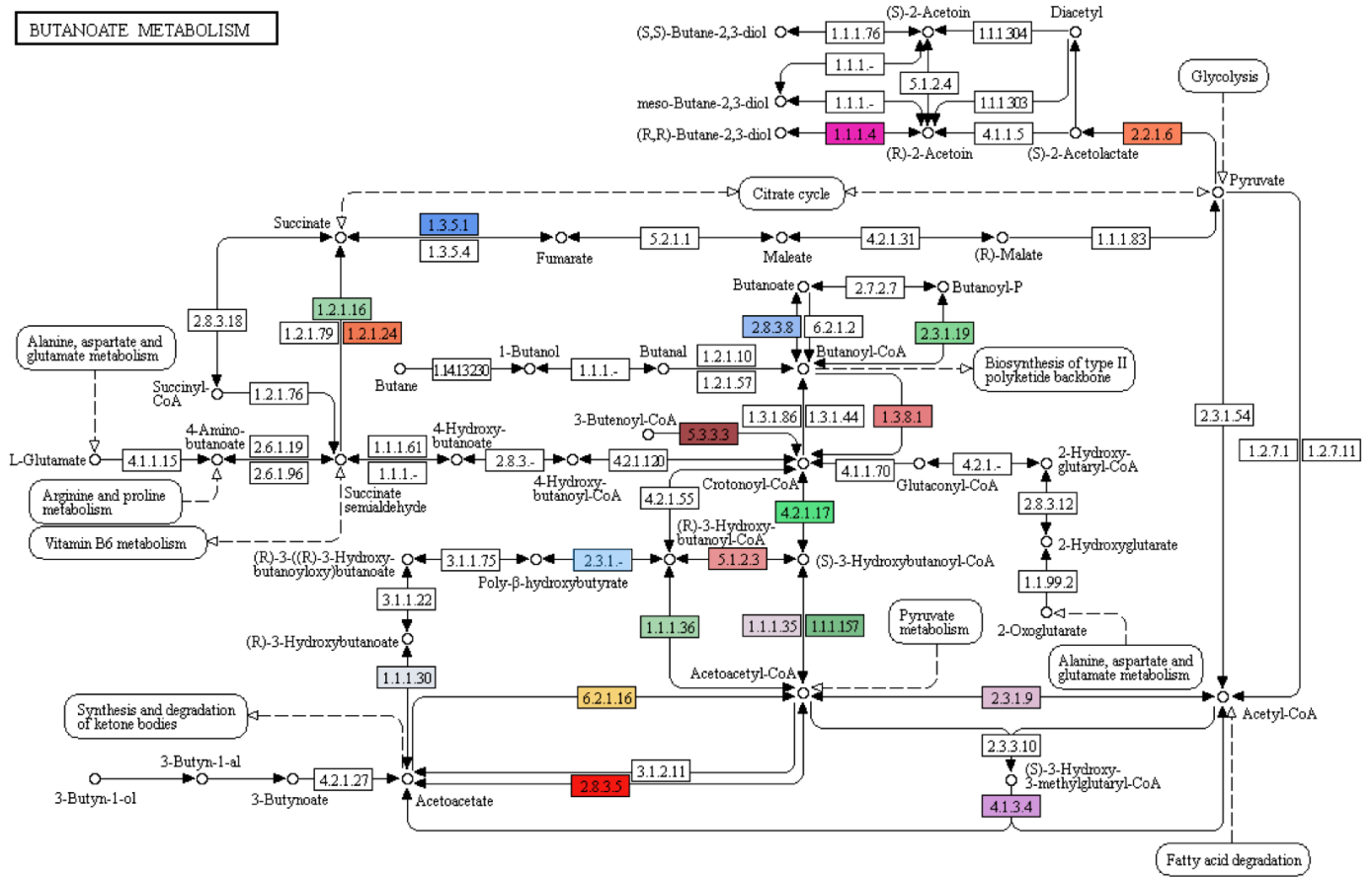


Figura 59. Mapa metabólico do metabolismo de butanoato, obtido por meio do banco de dados KEGG, representando os genes expressos por *Comamonas sp.*, *Delftia sp.* e *Stenotrophomonas sp.* nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000).

A improvável participação desse composto na manutenção da viabilidade celular nessas culturas é ainda reforçada pelo fato de a PHB despolimerase codificada pelo gene expresso por *Stenotrophomonas sp.* ter atividade essencialmente extracelular.

Ademais, nas culturas de *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. contendo PE foi observada a superexpressão de genes que codificam fasinas, proteínas que assistem na formação de grânulos de poliésteres, e a expressão de genes que codificam a polihidroxialcanoato sintase, enzima que catalisa a síntese desse polímero de reserva. Isso é mais uma evidência da efetividade dessas bactérias em assimilar abundantemente os fragmentos de PE. Os eventos de síntese e de degradação dos grânulos intracelulares de poliésteres são precisamente orquestrados, já que a ocorrência simultânea destes seria energeticamente desvantajosa (Taidi *et al.*, 1995). Desse modo, a potencial ocorrência desse evento biossintético descartaria uma possível utilização desse polímero, além de sugerir que os ácidos graxos provenientes da fragmentação do recalcitrante PE também caracterizam blocos de construção de plásticos biodegradáveis (i.e. PHA) por meio do intrincado metabolismo desses microrganismos. De fato, existem relatos acerca de fenômenos similares em bactérias degradadoras de lignina, que utilizam os compostos aromáticos produzidos a partir desta como substrato para a síntese de polihidroxialcanoatos. Esses resultados suscitam o grande potencial biotecnológico dessas estirpes, no que tange a síntese de plásticos biodegradáveis, uma área emergente com vastas possíveis aplicações (Numata *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016).

Não obstante o momento preciso em que as células iniciam o processo de adesão ao PE não tenha sido estimado, sabe-se que esta etapa é crucial e ocorre nos estágios iniciais das culturas dos três microrganismos (Figura 12, pg. 58). Isso promove o contato necessário para que os fragmentos sejam produzidos e assimilados eficientemente (Hua & Wang, 2014; Peixoto *et al.*, 2017). Ademais, ROS e RNS biologicamente produzidas, por serem espécies químicas bastante instáveis, apresentam um efeito local e instantâneo, o qual não seria observado caso não houvesse contato entre as células e o alvo (Cabiscol Català *et al.*, 2000). O crescimento microbiano na superfície do material também promove a fragmentação mecânica deste, contribuindo para o processo biodegradativo. Diante do exposto, as três estirpes expressam genes relacionados à adesão e formação de biofilme na presença do PE. Dentre estes estão genes que codificam pilinas, adesinas, ganchos flagelares, fimbrias, proteínas de membrana especializadas na adesão celular e síntese de componentes da matriz extracelular e de sinalizadores como o c-di-GMP (Flemming *et al.*, 2016; Valentini & Filloux, 2016). Dados experimentais revelaram genericamente a produção de biosurfactantes pelas três estirpes na presença de PE (Figura 27, pg. 77). Surfactantes podem modificar as propriedades físicas da interface entre as células e a hidrofóbica estrutura do PE, assistindo na adesão celular e na biodegradação do polímero. Os principais biosurfactantes sintetizados por bactérias são glicolipídeos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos, ramnolipídeos, glicopeptídeos e ácidos orgânicos (Khire, 2010; Kurata *et al.*, 2016). De fato, a adição de polissorbato (i.e. Tween 60) a culturas de *Brevibacillus borstelensis* em PE

promoveu um aumento significativo na adesão microbiana à superfície do polímero, indicando o caráter relevante desses compostos para a formação de biofilmes e, conseqüentemente, para o processo degradativo (Hadad *et al.*, 2005).

Uma vez que o PE tenha sido fragmentado e oxidado, os produtos desses processos podem então ser assimilados pela célula a fim de gerar energia para a maquinaria microbiana. No geral, o transporte de substratos pela membrana celular pode ocorrer por (i) transporte passivo, (ii) transporte passivo facilitado ou (iii) transporte ativo. A internalização dos fragmentos também pode ser facilitada pelos biosurfactantes, como lipopeptídeos, glicopeptídeos e flavolipídeos (Lima *et al.*, 2011). Apesar de não terem sido investigados, as três estirpes apresentam uma alta expressão de genes que codificam lipopeptídeos e glicopeptídeos de baixa massa molecular, o que se enquadraria na possível síntese de surfactantes. Além disso, também aparentam estar engajadas na síntese de ácidos orgânicos, a exemplo do ácido biliar. Enquanto alguns hidrocarbonetos lineares ou aromáticos de baixa massa molecular entram nas células por difusão passiva, moléculas maiores requerem uma proteína que assista nesse processo, podendo ou não haver o consumo de ATP. Isso é corroborado pelo fato de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. serem bactérias gram negativas, e, portanto, a fração polissacarídica do lipopolissacarídeo constituinte (LPS) da membrana externa promover uma barreira a moléculas hidrofóbicas (Hua & Wang, 2014). Assim, assume-se que, para a assimilação dos fragmentos de degradação do PE, essas estirpes utilizem proteínas transportadoras, sendo descartado o transporte por difusão passiva. Entretanto, especula-se que, devido à grande variedade de possíveis produtos de degradação extracelular, a assimilação dos fragmentos deva ocorrer por meio de diferentes transportadores. De fato, uma grande variedade de genes referentes a proteínas transportadoras, incluindo porinas, transportadores ABC (*ATP binding cassette*) e transportadores MFS (*major facilitator superfamily*) (**Figura 44**, pg. 101; **Figura 45**, pg. 102; **Figura 46**, pg. 103), apresentou relevante expressão nas culturas contendo PE. Além disso, também foi observada a expressão de uma NADH desidrogenase com atividade transportadora. Esses resultados são consistentes com um recente estudo do transcrito de bactérias biodegradadoras de PE, o qual sugeriu que proteínas dessas famílias de transportadores provavelmente desempenham uma função crucial na internalização desses compostos (Gravouil *et al.*, 2017).

No ambiente intracelular, os fragmentos resultantes da complexa atividade degradativa extracelular deverão ser convertidos a substratos que efetivamente possam gerar energia química para a maquinaria microbiana. Diante da grande complexidade de funções químicas em que esses fragmentos possam ser categorizados, estima-se que uma vasta gama de enzimas possa atuar nesse processo de aporte energético. No entanto, este mecanismo é mediado por sucessivas oxidações, até que toda a cadeia carbônica do fragmento seja convertida a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O no ciclo do ácido cítrico, acarretando o transporte de elétrons pelas



enzimas da cadeia respiratória para a consequente síntese de ATP a partir do gradiente eletroquímico gerado. Nesse contexto, a atuação de oxidases intracelulares é primordial para conectar os fragmentos assimilados à entrada no ciclo do ácido cítrico, ou seja, para possibilitar a conversão destes a acetil-CoA. O metabolismo de alcanos de cadeia curta, aceito como diretriz para o estudo do metabolismo de PE, inicia-se pela síntese de ácidos graxos a partir desses hidrocarbonetos por meio da oxidação sequencial a álcool, alcano e, finalmente, ácido carboxílico (**Figura 60; Figura 61**) (Albertsson & Karlsson, 1990; Cheshire *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013). As três estirpes expressam substancialmente os genes codificadores das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase intracelulares e *Stenotrophomonas* sp., ainda, expressa o gene referente à alcano monoxigenase, enzima dependente de flavina que catalisa a hidroxilação terminal de alcanos (**Figura 47**, pg. 105, “LLM class flavin-dependente oxidorreductase”). Em contrapartida, *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. expressam genes relacionados à NAD(P) oxidorreductases FAD-dependentes com atividade de monoxigenase e à rubredoxina (**Figura 47**, pg. 105), que participa da transferência de elétrons durante essa oxidação, além de vários genes codificadores de monoxigenases genericamente classificadas. Genes que codificam o citocromo P450 com atividade de monoxigenase e dioxigenase estão expressos por essas duas estirpes, principalmente nas culturas contendo PE, e são reportados por constituírem um dos possíveis mecanismos de oxidação de alcanos a álcoois (Ji *et al.*, 2013). A participação de dioxigenases FAD-dependentes nessa reação oxidativa também foi reportada, e os três microrganismos expressam genes relacionados a essas enzimas (Ji *et al.*, 2013).

A assimilação de fragmentos oxidados é procedida por sucessivas oxidações intracelulares, de modo que os grupos funcionais presentes nestes orquestrarão as subseqüentes reações a serem catalisadas pelas respectivas enzimas e, portanto, a entrada destes no ciclo oxidativo intracelular (**Figura 61**). De acordo com os dados experimentais (**Figura 14**, pg. 61), os grupos funcionais contendo oxigênio presentes nesses fragmentos incluem álcoois, aldeídos, ésteres, cetonas e ácidos carboxílicos, que são os respectivos substratos da álcool desidrogenase, aldeído desidrogenase, esterases, monoxigenase e ligase de ácido graxo de cadeia longa (**Figura 60**) (Ji *et al.*, 2013). À exceção das esterases, que são hidrolases, e das ligases, todas essas enzimas, incluindo o citocromo P450, são classificadas como oxidorreductases, sendo todas codificadas por genes superexpressos nas culturas contendo PE (**Figura 47**, pg. 105). Outras oxidases intracelulares cujos genes também estão ativos incluem proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (e.g. superóxido dismutase, peroxidases e redoxinas), citocromos, monoxigenases, dioxigenases, acil-CoA desidrogenase (catálise da primeira etapa da  $\beta$ -oxidação) e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (catálise da terceira etapa da  $\beta$ -oxidação) (**Figura 61**). As reações da  $\beta$ -oxidação reduzem dois átomos de carbono da cadeia do fragmento a

cada ciclo, e estas serão sucessivamente repetidas até que todos os átomos de carbono do fragmento assimilado sejam convertidos a moléculas de acetil-CoA.

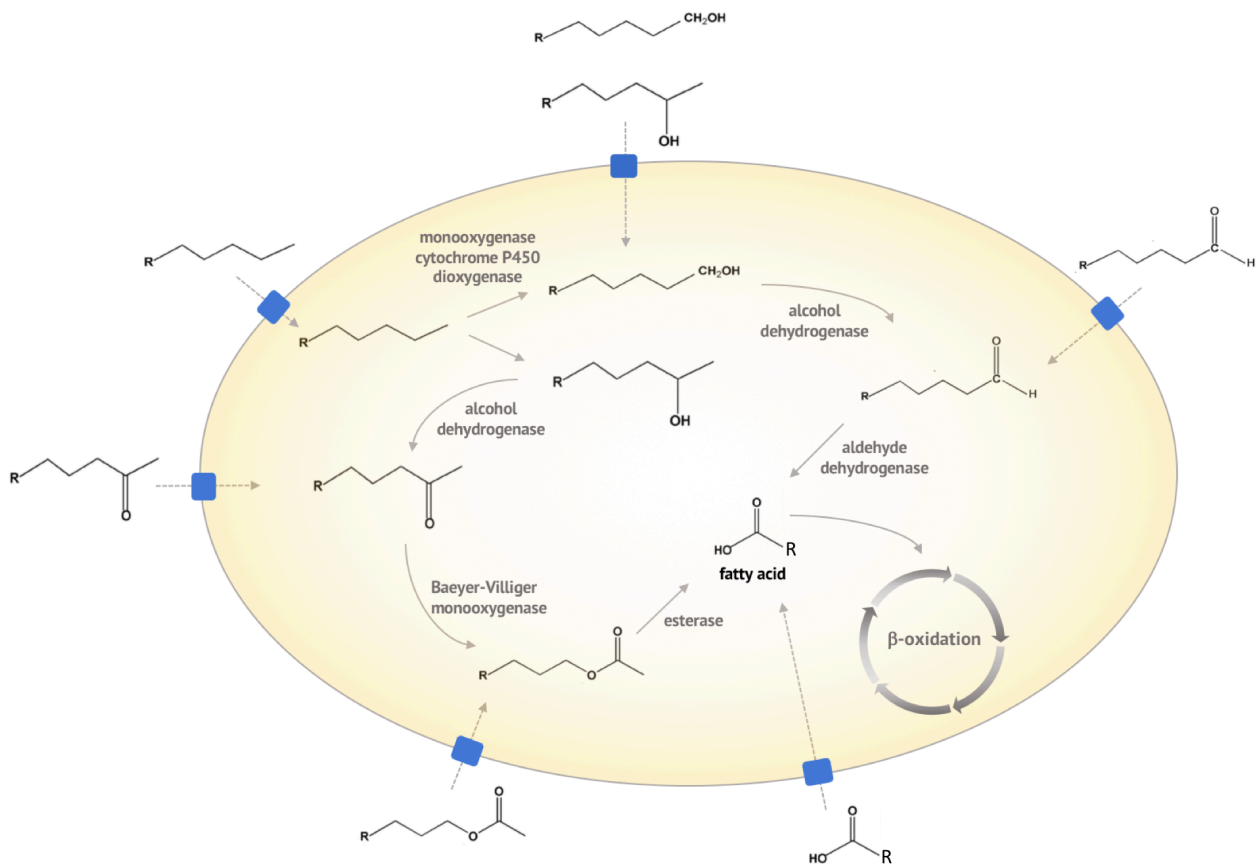


Figura 60. Representação esquemática da assimilação microbiana de fragmentos derivados da oxidação extracelular do PE e das principais enzimas envolvidas na conversão intracelular destes a ácidos graxos (adaptado de Ji *et al.*, 2013).

Os fragmentos assimilados contendo grupos nitro, por sua vez, podem sofrer a ação de nitroreduzases, nitropropano dioxigenases e nitronato monooxygenases intracelulares, além do citocromo P450, cujos genes apresentam-se consideravelmente expressos nas culturas contendo PE. Estas catalisam, respectivamente, a oxidação de nitroalcanos a amidas primárias, a compostos carbonila correspondentes e nitrito, a aldeídos e nitrito e a compostos correspondentes e NO, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Kido & Soda, 1984; Wackett *et al.*, 1989; Francis *et al.*, 2005; De Oliveira *et al.*, 2010). Adicionalmente, o papel da glicose oxidase e D-aminoácido oxidase na oxidação de nitroalcanos também foi reportado, embora a eficiência dessa reação seja inferior ao da nitropropano oxidase na oxidação de nitroalcanos também foi reportado, embora a eficiência dessa reação seja inferior ao da nitropropano oxidase

dioxigenase (Kido & Soda, 1984). Desse modo, após a remoção do grupo nitro, as cadeias carbônicas resultantes também podem ser substrato para a síntese de ácidos graxos e a subsequente  $\beta$ -oxidação, semelhantemente ao discutido em relação às cadeias com grupos funcionais contendo oxigênio.

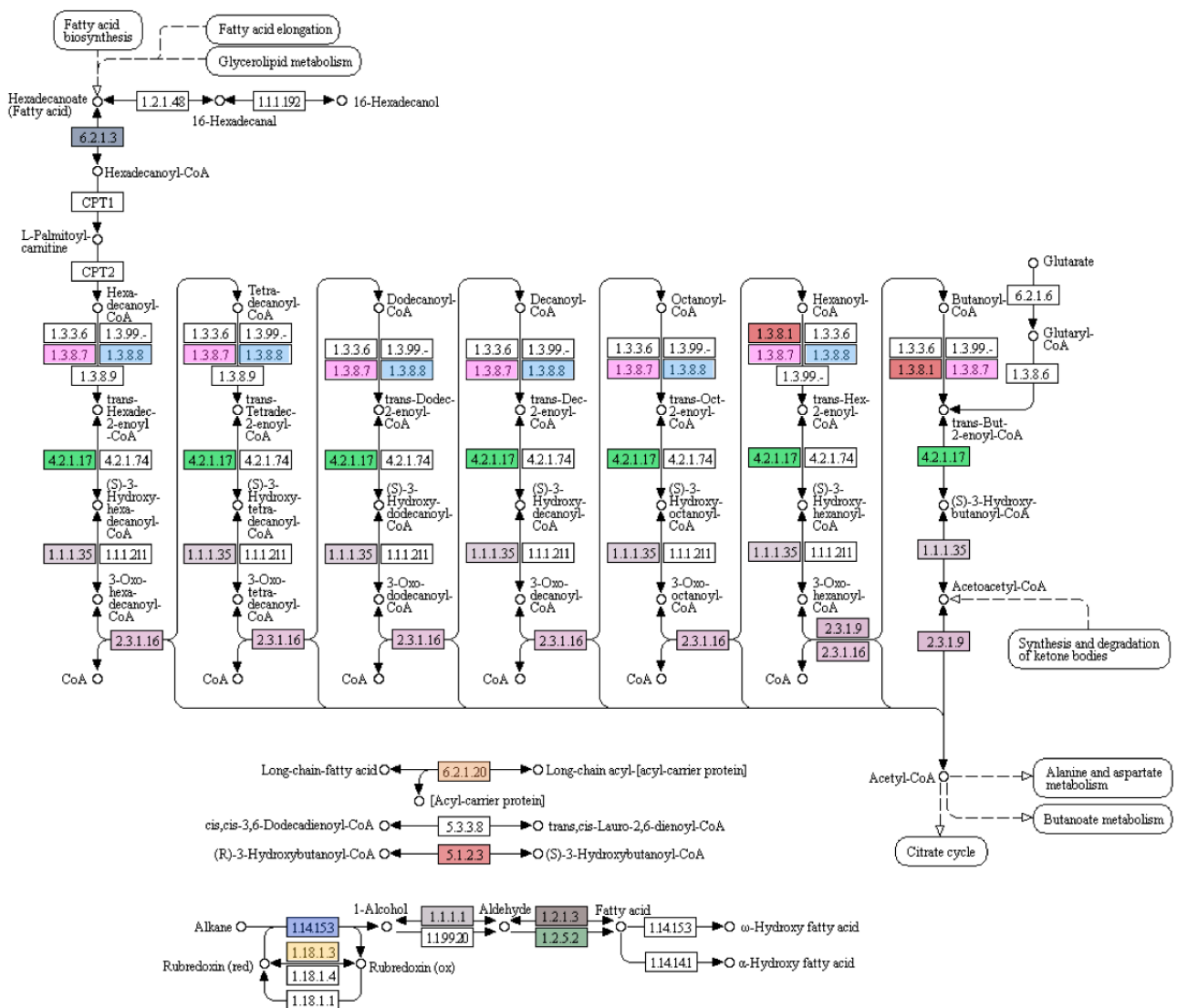


Figura 61. Mapa metabólico da degradação de ácidos graxos, obtido por meio do banco de dados KEGG *pathway maps*, representando-se em cores os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000).

O acetil-CoA sintetizado a partir dos fragmentos de PE assimilados na  $\beta$ -oxidação é o alicerce químico entre o processo de biodegradação e a efetiva produção de energia química na célula. No ciclo do citrato (Figura 62), o acetil-CoA é condensado ao oxaloacetato produzindo citrato e CoA em uma reação catalisada pela citrato sintase (EC 2.3.3.1). Durante as reações subsequentes, outros intermediários do ciclo são produzidos, como o oxoglutarato, que é precursor do metabolismo de aminoácidos e do ascorbato e aldarato, e o próprio oxaloacetato, que é regenerado na última etapa do ciclo e, após a conversão deste a fosfoenolpiruvato, pode promover a gliconeogênese permitindo a síntese de açúcares para reações biossintéticas intracelulares (Kelly & Hughes, 2001). Cada ciclo dessa via metabólica consome, então, acetato (i.e. acetil CoA) e  $H_2O$  e produz três moléculas de NADH, uma de ATP e duas de  $CO_2$ .

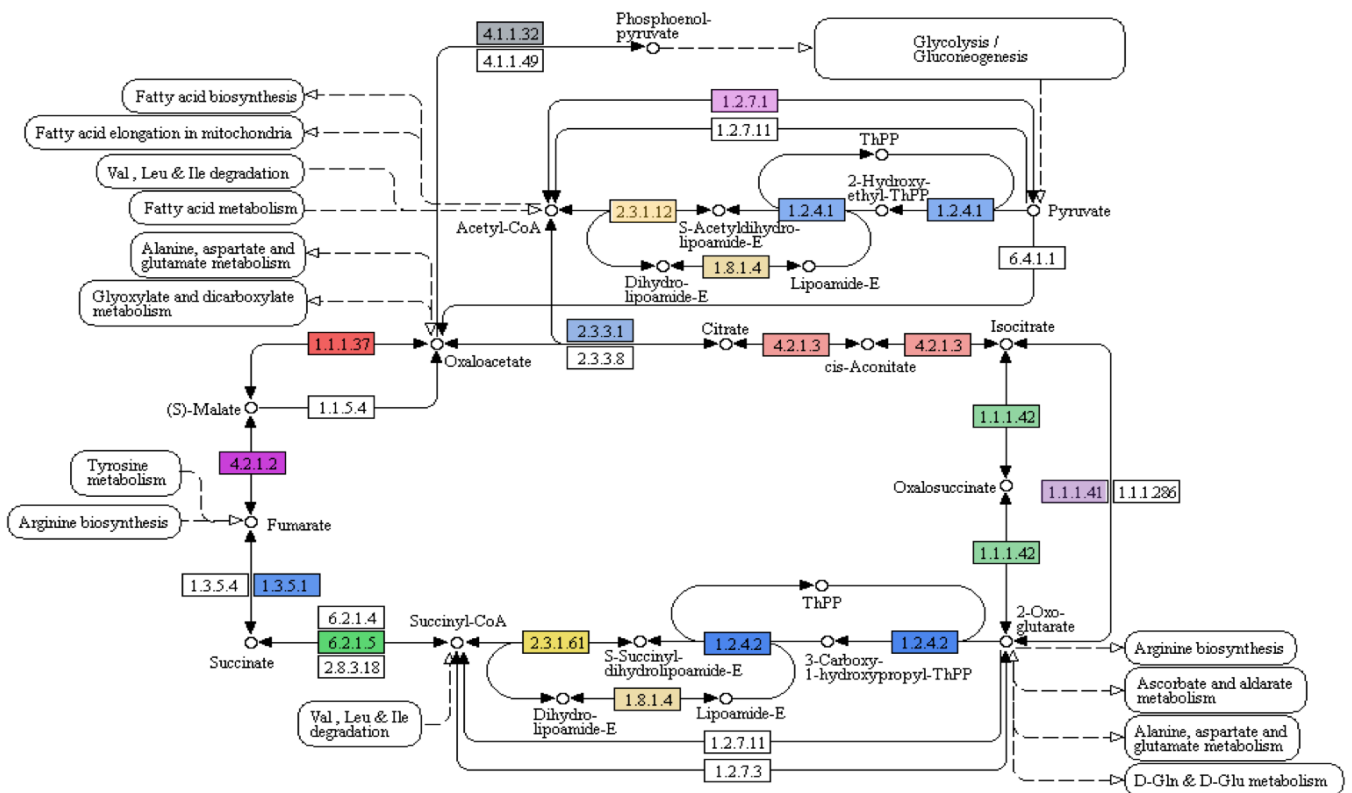
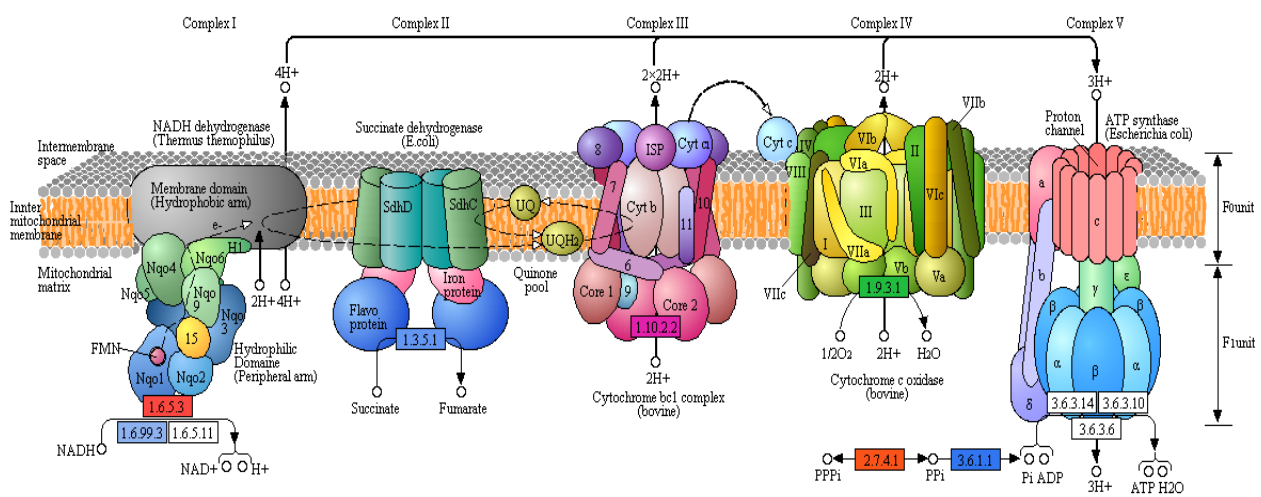


Figura 62. Mapa metabólico do ciclo do citrato, obtido por meio do banco de dados KEGG *pathway maps*, representando-se em cores os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000).

Em seguida, o NADH resultante do ciclo do ácido cítrico intermediará a síntese de ATP a partir da fosforilação oxidativa. Durante a respiração aeróbica, os elétrons (i.e. hidrogênio) do NADH serão transferidos ao oxigênio por meio da NADH desidrogenase, succinato desidrogenase e citocromos, cujos genes apresentam-se substancialmente expressos nas culturas contendo PE dos três microrganismos. Com isso, o NAD<sup>+</sup> é regenerado e, para cada par de elétrons transferido, a contribuição para a força próton motiva é de 10 prótons (H<sup>+</sup>), que são liberados no periplasma a partir das reações catalisadas pelo complexo I (NADH desidrogenase/ubiquinona), complexo III (citocromo c) e complexo IV (oxidase terminal) da cadeia respiratória e direcionam a síntese de ATP pela ATP sintase (Figura 63) (Chen & Strous, 2013). Diante do potencial para nitrificação heterótrofa e denitrificação aeróbica apresentado por esses organismos, que é suportado pela produção de nitrito e NO na presença de amônia como única fonte de carbono (Figura 19, pg. 68; Figura 23, pg. 72) e pelas descrições de membros desses gêneros na literatura (Patureau *et al.*, 1996; Heylen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Chen & Strous, 2013; Wu *et al.*, 2015), enfatiza-se o importante acoplamento dessas reações àquelas catalisadas pelas enzimas da cadeia respiratória (Figura 64). A denitrificação e a respiração aeróbica compartilham a mesma maquinaria respiratória central, de modo que parte dos elétrons carreados pelo NADH são transferidos à nitrito e nitrito redutase por meio do complexo I, ubiquinona/ubiquinol, complexo III e citocromo c, favorecendo a redução do nitrito a NO (Chen & Strous, 2013).



**Figura 63.** Mapa metabólico da fosforilação oxidativa (cadeia respiratória), obtido por meio do banco de dados KEGG, representando os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE (Kanehisa & Goto, 2000).

Embora a anotação tenha revelado a presença apenas dos genes codificadores de nitrito redutase ferredoxina e NADP(H) (catálise da síntese de amônia a partir do nitrito) em *Comamonas* sp. e *Delftia* sp., observa-se a expressão, nas três bactérias, de genes anotados como citocromo oxidase (528 aminoácidos), citocromo c oxidase (556 aminoácidos) e citocromo d terminal oxidase (528 aminoácidos) que contém sítios de ligação a heme, ferro e metais, consistentes com a nitrito redutase dissimilatória produtora de óxido nítrico (NirS, 568 aminoácidos). Adicionalmente, enzimas da cadeia respiratória, como citocromo c, complexo III e complexo IV, também são potenciais redutoras de nitrito a NO, e os genes que as codificam apresentam elevada expressão nas culturas contendo PE (Sparacino-Watkins *et al.*, 2014). Por sua vez, os genes que codificam a nitrato redutase, enzima da classe das molibdopterinas oxidoredutases que catalisa a primeira reação da denitrificação (redução do nitrato a nitrito), tanto a periplasmática quanto a citosólica, estão expressos em todas as culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp., o que pode ser decorrente da expressão constitutiva desses genes, uma vez que a produção nitrato não foi constatada nessas culturas (Patureau *et al.*, 1996). Ademais, cabe ressaltar que foi observada a redução do nitrato a nitrito nas culturas das três estirpes (**Figura 20**, pg. 69), revelando que inclusive *Stenotrophomonas* sp. apresenta a nitrato redutase ativa. Essa alta expressão dos genes codificadores de nitrato redutase também pode caracterizar mais uma possível fonte intracelular de NO, tendo em vista o potencial dessas enzimas em também atuar na catálise da redução de nitrito a NO (Meyer *et al.*, 2005). Assim, enquanto os fenômenos relacionados à fosforilação oxidativa constituem as etapas finais no processo de biodegradação, estes também reiniciam esse processo por meio da produção de uma grande variedade de ROS e RNS que participarão das etapas iniciais de fragmentação oxidativa, retroalimentando a biodegradação de PE e resultando em um ciclo intrincado e robustamente orquestrado de etapas metabólicas desempenhadas por esses microrganismos (**Figura 65**).

NITROGEN METABOLISM

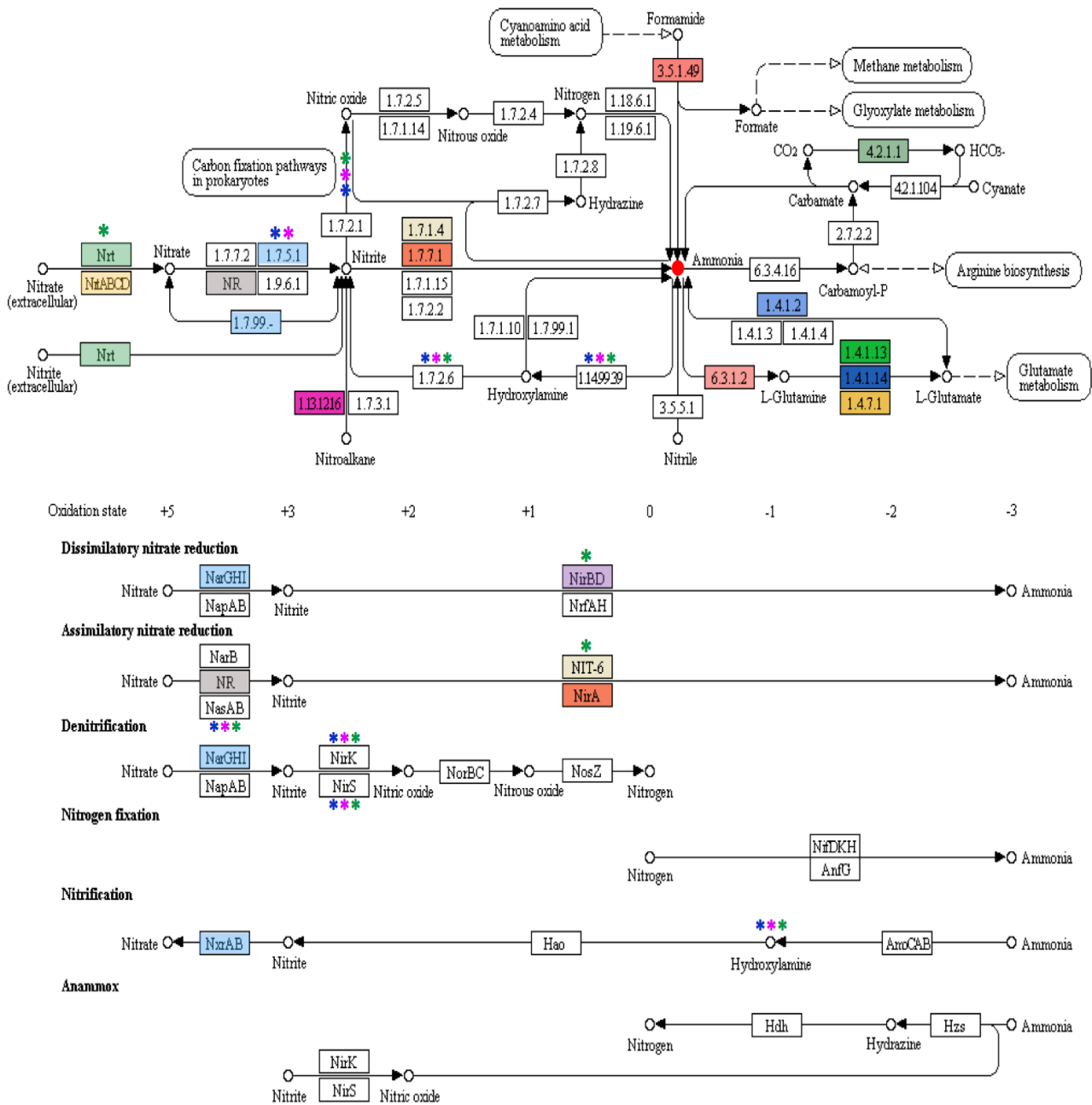


Figura 64. Mapa metabólico do metabolismo de nitrogênio, obtido por meio do banco de dados KEGG, representando os genes expressos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. nas culturas contendo PE. Genes não confirmados porém potencialmente presentes e expressos estão destacados (\*) para cada organismo (*Comamonas* sp. em azul, *Delftia* sp. em magenta e *Stenotrophomonas* sp. em verde). EC numbers presentes apenas nas culturas de *Comamonas* sp. e *Delftia* sp. estão preenchidos em cinza. O círculo vermelho representa a fonte de nitrogênio disponível nas culturas. Ademais, a produção de nitrito e óxido nítrico foi confirmada experimentalmente bem como a ausência da produção significativa de nitrato (Kanehisa & Goto, 2000).

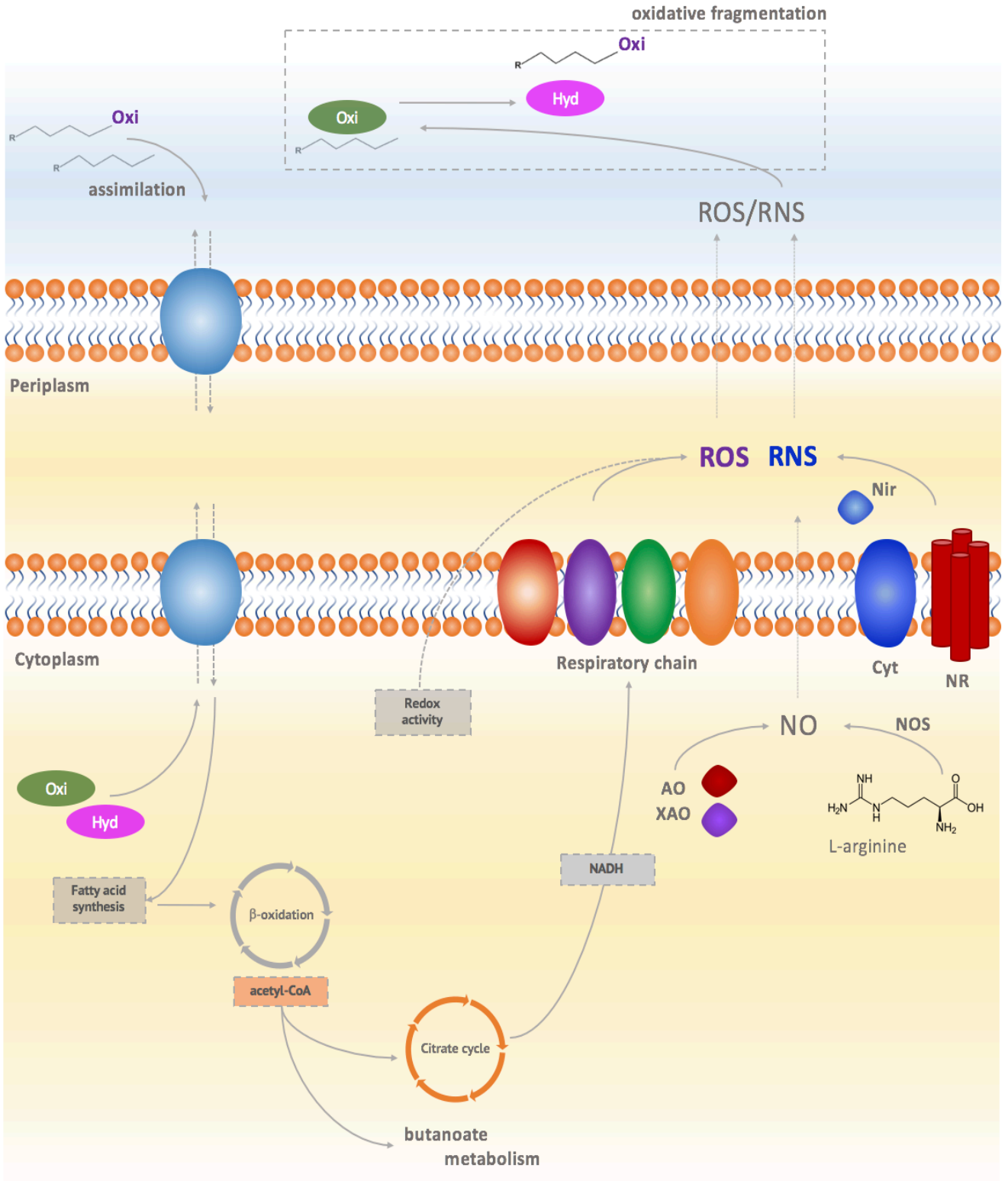


Figura 65. Mecanismo proposto para o metabolismo de PE por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. O processo inicia-se pela fragmentação oxidativa extracelular do PE mediada por oxidoreduases secretadas (Oxi) e por espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Adicionalmente, hidrolases (Hyd) extracelulares podem catalisar outras fragmentações nos



alcanos previamente oxidados (R-Oxi). Alcanos de massa molecular reduzida e/ou oxidados são assimilados por meio de proteínas transportadoras e porinas. No meio intracelular, esses fragmentos são submetidos a sucessivas reações oxidativas resultando na síntese de ácidos graxos. Estes são oxidados por meio da  $\beta$ -oxidação produzindo acetil-CoA, intermediário do ciclo do citrato e do metabolismo de butanoato, o qual acarreta a síntese de poliésteres de reserva. O NADH produzido no ciclo do citrato intermediará a síntese de ATP a partir da fosforilação oxidativa catalisada pelas enzimas da cadeia respiratória. Estas, por sua vez, juntamente com as enzimas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, à síntese de NO e à atividade redox intracelular, acarretam a formação de diversas ROS e RNS, retroalimentando o processo degradativo.

### *Mecanismos metabólicos induzidos por PE*

Diante da visão geral metabólica da biodegradação de PE, algumas vias e produtos gênicos parecem ser fortemente influenciadas pela presença desse polímero como fonte de carbono e energia, revelando importantes *insights* acerca do processo (Figura 66). A presença de viabilidade celular nas culturas contendo PE é evidenciada pela superexpressão dos genes relacionados à síntese de aminoácidos, constituintes integrais do ribossomo, fatores de transcrição, enzimas participantes do ciclo do citrato, ATP sintase e citocromos. Paralelamente, também há evidências de replicação celular, que é corroborada pelo aumento na expressão de genes relativos à síntese de ácidos nucleicos, proteínas de membrana, parede celular e LPS induzidos pelo PE.

Em um primeiro momento, as células ativam respostas ao estresse nutricional, tendo em vista que o PE não é uma fonte de carbono imediatamente acessível e assimilável. Nesse contexto, sistemas celulares de quimitaxia, adesão, formação de biofilmes e sinalização emergem como as potenciais estratégias microbianas relativas tanto à busca por potenciais fontes de carbono, quanto ao reconhecimento nutricional do PE. Além disso, observa-se a ativação de vias relacionadas à biossíntese de moléculas antimicrobianas e de mecanismos de resistência a estas, estratégias que permitem minimizar a competição por nutrientes. Isso pode ser decorrente da formação de biofilmes, que impõe maior contato entre as células e uma consequente maior concentração de sinalizadores que reflitam a alta densidade populacional.

Diante do metabolismo geral desses microrganismos, acredita-se que estes secretem uma vasta gama de enzimas em resposta à limitação de carbono, o que é coerente sob a perspectiva de aumentar a probabilidade de obtenção de nutrientes do meio, uma estratégia de sobrevivência em condições adversas. Nesse sentido, como a célula não obteve fontes de carbono

“preferenciais”, esta passa a utilizar todos os recursos metabólicos para extrair do meio o necessário para suprir suas demandas energéticas. De fato, a síntese de proteínas transportadoras e de sistemas de secreção de compostos, íons e proteínas apresenta-se aumentada nas culturas contendo PE, o que sugere o esforço das células no que tange a aquisição de nutrientes, possivelmente indicando o possível prévio reconhecimento desse polímero como potencial fonte de carbono e o engajamento celular na adesão ao substrato e na fragmentação extracelular deste. Isso também é reforçado pela superexpressão de genes codificadores de oxidoredutases extracelulares, que além de ser consistente com essa expressiva síntese e secreção de moléculas observada, também resulta na fragmentação oxidativa necessária para a ocorrência de eventos relacionados à assimilação.

Similarmente, algumas enzimas relacionadas ao metabolismo de aromáticos também apresentaram superexpressão, sendo a grande maioria destas pertencente à classe das oxidoredutases. Estas podem ser participantes da modificação de PE, tendo em vista a existência de relatos na literatura acerca de enzimas relacionadas a compostos aromáticos que também são capazes de catalisar a fragmentação e a oxidação desse polímero (Santo *et al.*, 2013). Para isso, acredita-se que a estrutura secundária do sítio ativo dessas proteínas pode apresentar menor estabilidade, alterando, portanto, a especificidade em relação ao substrato, o que permite a interação com maior variedade de moléculas (Mayer & Staples, 2012).

Essas culturas também apresentaram a superexpressão de genes relacionados à síntese de metabólitos secundários, como ácido biliar, cobalamina, porfirina, biotina, corismato, entre outros. Esses metabólitos, embora não sejam fundamentais para a viabilidade bacteriana, conferem adaptações fisiológicas promissoras, incluindo síntese de antibióticos, surfactantes, pigmentos e vitaminas. A biossíntese desses compostos está intimamente relacionada à fonte de carbono disponível nas culturas, de modo que compostos orgânicos como a glicose, no geral, interrompem esse processo biossintético por induzir as células à rápida divisão celular em vez de ativar vias do metabolismo secundário, que primariam por conferir habilidades adaptativas em prol da sobrevivência diante da competição e escassez nutricional (Ruiz *et al.*, 2010). Nesse sentido, a presença de uma fonte de carbono sub-ótima como o PE acarreta a indução da síntese de metabólitos secundários, que resulta na expressão de genes que conferem adaptações e características diferenciais que garantam a sobrevivência celular.

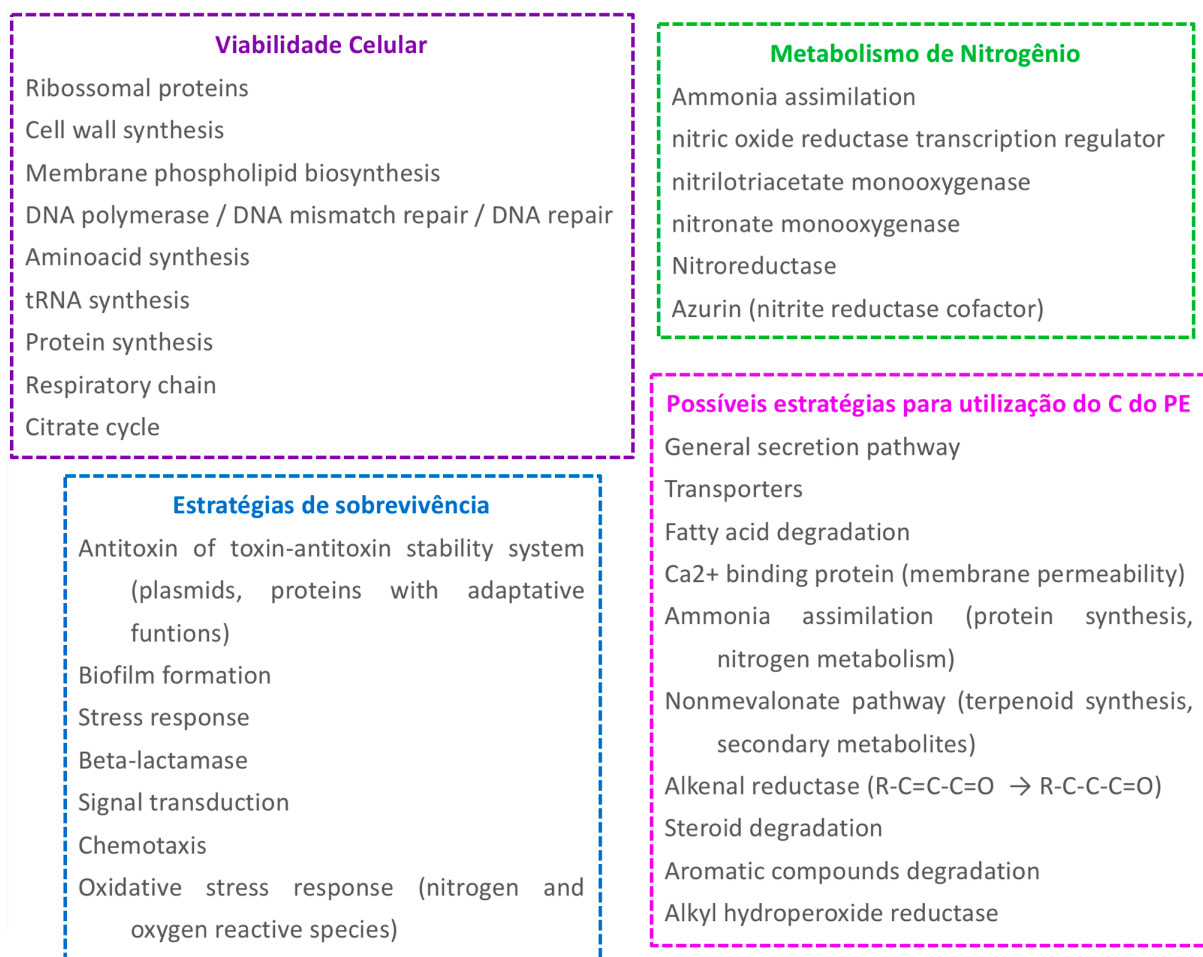
No entanto, esse efeito não é observado nas culturas em ausência de fontes de carbono, provavelmente em virtude da limitação excessiva de nutrientes, o que incorre em uma economia energética extrema a fim de garantir que o mínimo ATP gerado seja suficiente para manter as funções celulares básicas em atividade. Isso sugere que o PE esteja sendo metabolizado pelos microrganismos, já que é notória a diferença de expressão dos genes dessas vias entre os três cenários metabólicos. Curiosamente,

as culturas de *Stenotrophomonas* sp. não apresentaram esse aumento da expressão dos genes relativos ao metabolismo secundário quando comparados aos controles. Isso implica a expressão similar desses genes nas três condições de cultivo (PE, glicose e ausência de carbono), o que pode representar uma maior sensibilidade dessa estirpe a condições de estresse nutricional. De fato, após 20 dias de cultivo com glicose, sem a reposição desta, ocorre o esgotamento dessa fonte de carbono, o que pode acarretar a redução da divisão celular e a ativação de vias do metabolismo secundário, justificando o grau de expressão similar desses genes detectada nas diferentes culturas dessa estirpe.

Uma importante observação é a intensa indução de mecanismos de estresse oxidativo nessas culturas inferida a partir da superexpressão de genes que codificam superóxido dismutases, peroxidases, peroxiredoxinas, ferredoxinas, tioredoxinas e glutaredoxinas. Isso é corroborado pela simultânea superexpressão de genes relacionados ao reparo do DNA e de proteínas intracelulares, que são duas das macromoléculas intracelulares mais prejudicadas pela ação das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Imlay, 2015). Além disso, a superexpressão do gene codificador da aldeído desidrogenase também pode sugerir a ativação da estratégia de defesa celular contra a peroxidação dos lipídeos decorrente da alta reatividade das ROS. Essa superexpressão de genes de defesa ao estresse oxidativo nas culturas contendo PE indica a alta produção de espécies reativas, o que reforça o grande potencial dos radicais livres no contexto da biodegradação, sugerindo que esse mecanismo possa ser crucial para que os microrganismos acessem o potencial energético contido nesse polímero. Ressalta-se que as ROS são continuamente produzidas a partir da ação de oxidoredutases em microrganismos aeróbios, o que reforça a possibilidade da ocorrência de intensa atividade redox nas culturas contendo PE e o envolvimento desta no processo de biodegradação. Genes que codificam o citocromo c também apresentaram substancial expressão nas culturas contendo PE. Interessantemente, essas enzimas da cadeia respiratória são ávidas produtoras de ROS, sendo caracterizadas como as maiores fontes destas em nível celular (Srinivasan & Avadhani, 2012; Imlay, 2015). As enzimas da cadeia respiratória são posicionadas na membrana plasmática bacteriana, mas muitas das ROS geradas são permeáveis à membrana e outras associam-se à água e são transportadas por meio de canais aquaporinas (Fisher, 2009). Isso permite a mobilidade dessas moléculas em direção ao meio extracelular, onde elas atuarão na modificação química do PE.

A superexpressão dos genes relacionados à síntese e degradação de ácidos graxos indica a assimilação dos fragmentos do polímero, que é consistente com o mecanismo de biodegradação do PE previamente proposto na literatura (Albertsson & Karlsson, 1990; Gravouil *et al.*, 2017). Esse mecanismo preconiza que, uma vez fragmentados e oxidados, os fragmentos são assimilados pelo microrganismo e, em seguida, a maquinaria celular converte esses fragmentos a ácidos graxos que serão completamente oxidados por meio da beta-oxidação. Adicionalmente, os genes relacionados às enzimas da cadeia respiratória

também apresentaram *up regulation* na presença do polímero sintético quando comparado ao controle negativo (ausência de carbono). Alguns genes relacionados a citocromos também estão superexpressos, juntamente com genes que codificam ferredoxinas. Em diversas bactérias, a atividade de alcano hidroxilase foi reportada para o citocromo P450, utilizando ferredoxinas na transferência de elétrons durante esse processo (Rojo, 2010). Isso levanta o possível envolvimento das enzimas codificadas por esses genes na oxidação do PE. Ademais, genes relacionados à via do glicoxalato também se apresentaram superexpressos em PE, principalmente nas culturas de *Stenotrophomonas* sp. Diante da demanda celular por glicose para possibilitar a síntese de carboidratos (e.g. parede celular durante o processo de divisão), o ciclo do glicoxalato permite a utilização de produtos da  $\beta$ -oxidação de lipídeos para a síntese de glicose por meio do intermediário acetato, reforçando o papel central do metabolismo de lipídeos durante a biodegradação.



**Figura 66.** Resumo geral das categorias de genes superexpressos nas culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. contendo PE como única fonte de carbono e energia. As análises da expressão diferencial nessas culturas revelaram evidências

de viabilidade celular, replicação celular e atividade metabólica, bem como de adesão e formação de biofilmes, potencial reconhecimento do PE como substrato e produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ROS/RNS). Também observou-se a superexpressão dos genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio, a transportadores, à síntese e degradação de ácidos graxos, à síntese e degradação de metabólitos secundários e à degradação de compostos aromáticos.

### *Potenciais aplicações biotecnológicas relacionadas ao estudo do metabolismo de PE*

Apesar de as técnicas de manejo de plásticos pós-consumo demandarem conhecimentos aplicados, para que novos processos baseados em tecnologias verdes, como a biodegradação, sejam desenvolvidos, faz-se necessário o profundo conhecimento das propriedades físico-químicas do material bem como dos mecanismos de degradação deste. A seleção de genes codificadores de potenciais enzimas envolvidas na fragmentação do PE pode fundamentar etapas do processo de biodegradação que visem à fragmentação do PE para posterior assimilação microbiana. Essas etapas iniciais podem ser realizadas tanto por meio de etapas exclusivas em que o objetivo seja a quebra molecular do material, como por meio de um único sistema microbiano que compreenda tanto a fragmentação quanto a mineralização do PE.

O papel crucial de tratamentos abióticos, o qual é exhaustivamente descrito na literatura, no processo biodegradativo também consiste em uma importante vertente a ser considerada para o desenho de potenciais aplicações biotecnológicas. Fatores abióticos (e.g. radiação UV) atuam na ativação da cadeia polimérica por meio da abstração de um átomo de H acoplada a uma fonte de energia que impulse essa formação de macrorradicais. Conforme proposto nesse trabalho, os microrganismos que sejam capazes de degradar PE sem a prévia exposição a esses tratamentos abióticos provavelmente empregam mecanismos que os simulem quimicamente durante a fragmentação extracelular do polímero. Nesse contexto, espécies reativas de origem biológica desempenham funções similares àsquelas desempenhadas por fatores abióticos, tendo em vista que induzem não apenas a formação de macrorradicais, como também a formação de outros radicais livres que propaguem a ativação molecular do PE a outros segmentos moleculares do material. Assim, microrganismos capazes de acoplar processos de fragmentação enzimática aos induzidos por radicais livres são potencialmente promissores no contexto da biodegradação.

*Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. não apenas são capazes de fragmentar e oxidar o PE, mas também de mineralizar os produtos gerados nessa etapa, potencialmente convertendo o polímero persistente a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Apesar de ser

virtualmente possível separar as etapas de fragmentação e consumo dos produtos durante processos tecnológicos de biodegradação, o fato de esses microrganismos serem capazes de realizar o processo degradativo por completo permite o desenho de tecnologias simplificadas que contemplem, em teoria, uma única etapa, o que as torna mais práticas e acessíveis. Apesar de ainda não ser possível estimar como seriam os detalhes do processo biodegradativo em escala industrial, avalia-se a possibilidade de dois cenários: tratamento *in situ* ou em biorreatores com condições. Tendo em vista a massiva contaminação de ambientes naturais por debris plásticos, o tratamento *in situ* apresentaria vantagens. No entanto, deve-se considerar a grande quantidade de biomassa que será formada nesses ambientes, o que pode inviabilizar a utilização dessa estratégia. Por outro lado, para que seja viável tratar esses materiais em biorreatores, é imperativo que haja uma considerável redução no tempo necessário para a ocorrência do processo degradativo. Caso contrário, serão necessários muitos biorreatores para tratar uma determinada quantidade de material, o que também inviabilizaria o processo.

Esse estudo também possibilita o desenho de novos polímeros que sejam biodegradáveis especificamente por esses microrganismos, permitindo o controle da produção e da degradação dos plásticos produzidos. Com base no conhecimento do metabolismo de PE por parte dessas estirpes, as moléculas poliméricas podem ser desenvolvidas para que a degradação destas esteja acoplada a determinadas etapas do metabolismo, a exemplo de uma molécula que seja eficientemente degradada por meio das estratégias de fragmentação oxidativa desempenhadas por esses microrganismos. Adicionalmente, a possibilidade de síntese de polímeros biodegradáveis a partir do PE também suscita grande interesse biotecnológico, tendo em vista a produção de moléculas de valor agregado acoplada à biodegradação de polímeros persistentes. Além disso, essas estirpes podem ainda ser empregadas na biodegradação de outros polímeros sintéticos, de modo que o potencial biotecnológico destas é ainda imensurável. Nesse sentido, após a validação experimental das estratégias metabólicas utilizadas por esses microrganismos durante a biodegradação de PE, os esforços serão concentrados no desenvolvimento de processos biodegradativos que permitam o tratamento de resíduos plásticos em escala industrial.

- 
- 
- i. Validar a expressão dos genes candidatos por PCR em tempo real;
  - ii. Identificar a(s) enzima(s) responsável pelo processo de oxidação de amônia por meio de zimogramas;
  - iii. Avaliar o efeito da adição de inibidores da nitrificação, denitrificação e síntese de óxido nítrico na produção de nitrito e óxido nítrico;
  - iv. Investigar o potencial das enzimas xantina oxidase, aldeído oxidase, óxido nítrico sintase, citocromos, nitrato redutase e nitrito redutase, bem como de outros potenciais candidatos, na síntese de óxido nítrico;
  - v. Investigar o efeito da adição de molibdênio, o qual é cofator de enzimas do metabolismo de nitrogênio, às culturas de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. sobre a formação de grupos nitro no PE;
  - vi. Clonar o gene codificador da enzima óxido nítrico sintase em vetores de expressão e avaliar o efeito desta no perfil químico do PE;
  - vii. Clonar os genes codificadores de oxidoredutases candidatas em vetores de expressão e avaliar os efeitos destas no perfil químico do PE;
  - viii. Cultivo de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. por 90 dias por meio do sistema de membranas para avaliar o efeito exclusivo de ROS e RNS no perfil químico do PE em comparação ao do PE biodegradado;
  - ix. Avaliar o efeito da adição de sequestradores de ROS e RNS sobre os níveis de oxidação do PE induzidos por *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp.;
  - x. Realizar o nocaute individual de genes codificadores de enzimas participantes do metabolismo de PE visando à confirmação experimental dos dados *in silico*;
  - xi. Avaliar o potencial de *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. em converter PE a PHA.

---

---

O alicerce central da biodegradação de plásticos é a busca por microrganismos que apresentem um conjunto singular e oportuno de características bioquímicas que induzam modificações físico-químicas nos polímeros sintéticos. Longe de ser trivial, esse processo desafia a comunidade científica há décadas devido ao seu caráter emergencial decorrente do intenso impacto ambiental provocado por esses materiais. Nesse contexto, o presente estudo objetivou, mediante o prévio isolamento e identificação de novos microrganismos biodegradadores de PE, caracterizar os efeitos físico-químicos à estrutura polimérica e as estratégias metabólicas que os acarretam. Para isso, foi desenvolvida uma metodologia que permitiu a seleção de 9 bactérias biodegradadoras de PE a partir de debris plásticos descartados nos solos do Cerrado, cuja microbiota caracteriza-se por apresentar elevada biodiversidade (Peixoto, 2013).

Com base nas análises taxonômicas fundamentadas no sequenciamento dos genes 16S rRNA, esses biodegradadores potencialmente podem ser classificados como novas espécies dos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas*. Esses isolados são capazes de biodegradar PE de  $191.000 \text{ g.mol}^{-1}$  sem a necessidade de pré-tratamentos, fenótipo nunca antes descrito e potencializado pelo fato de conseguirem sobreviver com sucesso na presença de PE como única fonte de carbono e energia por pelo menos 90 dias. As modificações físico-químicas e estruturais dos filmes de PE expostos ao ataque microbiano foram avaliadas por meio de diferentes abordagens espectroscópicas e microscópicas. Estas indicaram que esses microrganismos são capazes de metabolizar esse polímero, acarretando neste dramáticas modificações físico-químicas e estruturais. Com base na formação de novas ligações químicas e grupos funcionais na molécula de PE em conjunto às evidências genômicas, transcritômicas e experimentais, conclui-se que esses isolados empregam estratégias bioquímicas originais e promissoras que destacam a eficiente habilidade biodegradativa destes. Dentre essas estratégias encontra-se a interface entre o metabolismo de nitrogênio e a biodegradação de PE, tendo em vista a consequente síntese de espécies reativas de nitrogênio que reagem com esse alceno promovendo a formação de grupos nitro na molécula polimérica.

O estudo dos genes efetivamente expressos na presença de PE aliado às modificações químicas observadas indica a potencial atuação de oxidoredutases extracelulares que podem promover a fragmentação oxidativa desse polímero acarretando a formação de fragmentos assimiláveis. Ademais, os resultados sugerem a atuação sinérgica de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio no processo de degradação extracelular, que podem contribuir para a fragmentação e para a oxidação do PE, a qual



permite a posterior atuação de hidrolases extracelulares que também acarretam a fragmentação deste. O efeito das espécies reativas, que é similar ao efeito de fatores abióticos, culmina na maior assimilação de fragmentos, o que acarreta, em nível celular, o aumento da produção destas devido à maior atividade redox e da cadeia respiratória, retroalimentando o processo degradativo. Uma vez que os produtos de degradação extracelular sejam assimilados, estes serão substrato para a síntese de ácidos graxos, gerando energia química para a maquinaria microbiana por meio da  $\beta$ -oxidação. Ressalta-se, ainda, que essas estirpes são potencialmente capazes de armazenar poliésteres intracelulares de reserva (e.g. PHB), o que indica a fascinante possibilidade de conversão de polímeros recalcitrantes em plásticos biodegradáveis de grande interesse biotecnológico.

As extraordinárias habilidades metabólicas desses biodegradadores resultam no notável potencial destes para a aplicação em projetos de biorremediação e biotecnologia. Além da importância no âmbito da pesquisa básica, esse estudo potencialmente direcionará as atuais estratégias de gestão dos plásticos pós-consumo para o desenvolvimento de processos avançados e otimizados em escala industrial, possibilitando uma grande variedade de metodologias e aplicações para esses resíduos a médio e longo prazo. Com isso, espera-se contribuir para o avanço do conhecimento acerca do complexo metabolismo de polímeros sintéticos persistentes e para a consequente preservação da vida, seja esta humana ou silvestre, visando à sustentabilidade global dos ecossistemas.

- Abraham, J., Ghosh, E., Mukherjee, P., & Gajendiran, A. (2017). Microbial degradation of low density polyethylene. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(1), 147-154.
- Alauddin, M., Choudhury, I., El Baradie, M., and Hashmi, M. (1995) Plastics and their machining: a review. *Journal of Materials Processing Technology* 54: 40-46.
- Albertsson, A.-C., and Karlsson, S. (1988) The three stages in degradation of polymers—polyethylene as a model substance. *J. Appl. Polym. Sci.* 35: 1289-1302.
- Albertsson, A.C., and Andersson, S.O. (1987) The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* 18: 73-87.
- Albertsson, A.C., and Karlsson, S. (1990) The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Prog. Polym. Sci.* 15: 177-192.
- Albertsson, A.C., and Karlsson, S. (1993) Aspects of biodeterioration of inert and degradable polymers. *Int. Biodeter. Biodegr.* 31: 161-170.
- Albertson, N. H., Nyström, T., & Kjelleberg, S. (1990) Starvation-induced modulations in binding protein-dependent glucose transport by the marine *Vibrio* sp. S14. *FEMS microbiology letters*, 70(2), 205-209.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Ammala, A., Bateman, S., Dean, K., Petinakis, E., Sangwan, P., Wong, S., et al. (2011) An overview of degradable and biodegradable polyolefins. *Prog. Polym. Sci.* 36: 1015-1049.
- Ananchenko, S.N. (2013) *Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology: Proceedings of the International Symposium on Frontiers of Bioorganic Chemistry and Molecular Biology, Moscow and Tashkent, USSR, 25 September - 2 October 1978.* Elsevier Science
- Andrady, A.L. (1994) Assessment of environmental biodegradation of synthetic polymers. *J. Macromol. Sci.-Pol. R.* 34: 25-76.

- Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Aracil, I., Font, R., and Conesa, J.A. (2005) Semivolatile and volatile compounds from the pyrolysis and combustion of polyvinyl chloride. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 74(1-2), 465-478.
- Araujo, J.F., de Castro, A.P., Costa, M.M., Togawa, R.C., Júnior, G.J.P., Quirino, B.F., et al. (2012) Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian savanna-like vegetation reveals acidobacteria dominance. *Microb. Ecol.* 64: 760-770.
- Arda, B., Bal, A., & Acar, I. (2017). Characterization of the thermal oxidative degradation kinetics of thermoplastics. *Instrumentation Science & Technology*, 45(5), 558-576.
- Augusta, J., and Müller, R.J. (1993) A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Bandopadhyay, D., Panda, A.B., and Pramanik, P. (2001) Surface modification of LDPE film by chemical processes with Ni<sup>2+</sup> and ammonium persulfate. *Journal of applied polymer science*, 82(2), 406-415.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pyskin, A. V. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5), 455-477.
- Barnes, D.K., Galgani, F., Thompson, R.C., and Barlaz, M. (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos. T. Roy. Soc. B* 364: 1985-1998.
- Belhaj, A., Desnoues, N., and Elmerich, C. (2002) Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB*-related genes. *Res. Microbiol.* 153: 339-344.
- Bellini, M.I., Gutiérrez, L., Tarlera, S., and Scavino, A.F. (2013) Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 505-516.
- Bento, I., Martins, L. O., Lopes, G. G., Carrondo, M. A., & Lindley, P. F. (2005) Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. *Dalton Transactions*, (21), 3507-3513.
- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*: btu170.
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A.M., Lemaire, J., Sancelme, M., and Scott, G. (2003) Environmental biodegradation of polyethylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81(3), 441-452.

- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., and Casadevall, A. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* 13: 620-630.
- Bugg, T. D. (2003) Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron*, 59(36), 7075-7101.
- Bushnell, B. (2015) BBMap short-read aligner, and other bioinformatics tools. University of California, Berkeley, CA.
- Calvert, J. G. (2008). *Mechanisms of atmospheric oxidation of the alkanes*. OUP USA.
- Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J., & Ros Salvador, J. (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8.
- Carvalho, V. M. (2001) Adutos de DNA gerados por produtos da lipoperoxidação: caracterização, detecção, incorporação em oligonucleotídeos e implicações biológicas (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Camargo, F. A., Maria do Carmo, R. P., & Bento, F. M. (2012) Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1203-1222.
- Chandra, R., and Rustgi, R. (1998) Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.* 23: 1273-1335.
- Charlesby, A., Von Arnim, E., & Callaghan, L. (1958) Effect of crystallinity on radiation effects in polyethylene. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 3(3), 226-231.
- Chatterjee, S., Roy, B., Roy, D., and Banerjee, R. (2010) Enzyme-mediated biodegradation of heat treated commercial polyethylene by *Staphylococcal* species. *Polym. Degrad. Stab.* 95: 195-200.
- Chen, J., & Strous, M. (2013) Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(2), 136-144.
- Cheshire, M. C., Bish, D. L., & Brassell, S. C. (2012) Organic Geochemical Composition of the Georgia Kaolins: Insights Into Formation and Diagenetic Conditions. *Clays and Clay Minerals*, 60(4), 420-439.
- Clift, R. (1997) Overview Clean Technology—The Idea and the Practice\*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68: 347-350.

- Coil, D., Jospin, G., & Darling, A. E. (2014) A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4), 587-589.
- Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C., and Allen, N.S. (2002) Photooxidative and thermal degradation of polyethylenes: interrelationship by chemiluminescence, thermal gravimetric analysis and FTIR data. *J. Photoch. Photobio. A* 147: 213-224.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J. I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., ... & Fernández-de-Puelles, M. L. (2014). Plastic debris in the open ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10239-10244.
- Crane, B. R., Sudhamsu, J., & Patel, B. A. (2010) Bacterial nitric oxide synthases. *Annual review of biochemistry*, 79, 445-470.
- Daum, M., Zimmer, W., Papen, H., Kloos, K., Nawrath, K., & Bothe, H. (1998) Physiological and molecular biological characterization of ammonia oxidation of the heterotrophic nitrifier *Pseudomonas putida*. *Current Microbiology*, 37(4), 281-288.
- De Oliveira, I. M., Bonatto, D., & Henriques, J. A. P. (2010) Nitroreductases: enzymes with environmental, biotechnological and clinical importance. *reactions*, 3(6).
- Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C., & Salzberg, S. L. (2007) Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, 23(6), 673-679.
- Doane, T. A., & Horwath, W. R. (2003) Spectrophotometric determination of nitrate with a single reagent. *Analytical Letters*, 36(12), 2713-2722.
- Dommergues, Y.R.M., Dommergues, F.Y.R., and Mangenot, F. (1970) *Ecologie microbienne du sol*.
- Edwards, D.J., and Holt, K.E. (2013) Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microbial informatics and experimentation* 3: 1.
- Eggin H. O. W., O.T.A. (2001) Biodeterioration and biodegradation. *Int. Biodeter. Biodegr.* 48: 12-15
- Ensign, S. A., Hyman, M. R., & Arp, D. J. (1993) In vitro activation of ammonia monooxygenase from *Nitrosomonas europaea* by copper. *Journal of bacteriology*, 175(7), 1971-1980.

- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., & Aykin-Burns, N. (2001) Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 529-539.
- Ercan, O., Wels, M., Smid, E. J., & Kleerebezem, M. (2015). Genome-wide transcriptional responses to carbon starvation in nongrowing *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology*, 81(7), 2554-2561.
- Fang, Z., Martin, J., & Wang, Z. (2012) Statistical methods for identifying differentially expressed genes in RNA-Seq experiments. *Cell & bioscience*, 2(1), 26.
- Finkel, S. E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nature Reviews Microbiology*, 4(2), 113.
- Fisher, A. B. (2009) Redox signaling across cell membranes. *Antioxidants & redox signaling*, 11(6), 1349-1356.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563.
- Foerch, R., McIntyre, N.S., and Hunter, D.H. (1990) Modification of polymer surfaces by two-step plasma sensitized reactions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 28.
- Franchetti, S. M. M., & Marconato, J. C. (2006) Polímeros biodegradáveis-uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, 811-816.
- Francis, K., Russell, B., & Gadda, G. (2005) Involvement of a flavosemiquinone in the enzymatic oxidation of nitroalkanes catalyzed by 2-nitropropane dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5195-5204.
- Frankel, E. N. (1987) Secondary products of lipid oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), 73-85.
- Fraser, C.M., Eisen, J.A., and Salzberg, S.L. (2000) Microbial genome sequencing. *Nature* 406: 799-803.
- Frias, J.P., Sobral, P., and Ferreira, A.M. (2010) Organic pollutants in microplastics from two beaches of the Portuguese coast. *Mar. Pollut. Bull.* 60: 1988-1992.
- Garai, P., Lahiri, A., Ghosh, D., Chatterjee, J., & Chakravorty, D. (2016) Peptide utilizing carbon starvation gene *yjiY* is required for flagella mediated infection caused by *Salmonella*. *Microbiology*, 162(1), 100-116.

- Gardette, M., Perthue, A., Gardette, J.L., and Janecska, T. (2013) Photo-and thermal-oxidation of polyethylene: Comparison of mechanisms and influence of unsaturation content. *Polym. Degrad. Stab.* 98: 2383-2390.
- Garrity, G., Staley, J.T., Boone, D.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A., et al. (2006) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria*. Springer Science & Business Media
- Gewert, B., Plassmann, M. M., & MacLeod, M. (2015) Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17(9), 1513-1521.
- Ginestet, P., Audic, J. M., Urbain, V., & Block, J. C. (1998) Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2266-2268.
- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., ... & Conesa, A. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic acids research*, 36(10), 3420-3435.
- Gravouil, K., Ferru-Clément, R., Colas, S., Helye, R., Kadri, L., Bourdeau, L., ... & Ferreira, T. (2017) Transcriptomics and Lipidomics of the Environmental Strain *Rhodococcus ruber* Point out Consumption Pathways and Potential Metabolic Bottlenecks for Polyethylene Degradation. *Environmental science & technology*, 51(9), 5172-5181.
- Green, D.S., Boots, B., Blockley, D.J., Rocha, C., and Thompson, R. (2015) Impacts of discarded plastic bags on marine assemblages and ecosystem functioning. *Environ. Sci. Technol.* 49: 5380-5389.
- Griffin, G. (1973) Biodegradable fillers in thermoplastics. *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society*. Amer Chemical Soc 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036, pp. 18-18.
- Grigoropoulou, G., Clark, J. H., & Elings, J. A. (2003). Recent developments on the epoxidation of alkenes using hydrogen peroxide as an oxidant. *Green chemistry*, 5(1), 1-7.
- Gugumus, F. (2002) Re-examination of the thermal oxidation reactions of polymers 2. Thermal oxidation of polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* 76: 329-340.
- Hadad, D., Geresh, S., and Sivan, A. (2005) Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *J. Appl. Microbiol.* 98: 1093-1100.

- Handtke, S., Albrecht, D., Otto, A., Becher, D., Hecker, M., & Voigt, B. (2018). The Proteomic Response of *Bacillus pumilus* Cells to Glucose Starvation. *Proteomics*, 18(1).
- Harrison, J. P., Schratzberger, M., Sapp, M., & Osborn, A. M. (2014) Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms. *BMC microbiology*, 14(1), 232.
- Harshvardhan, K., and Jha, B. (2013) Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. *Mar. Pollut. Bull.* 77: 100-106.
- Hawley-Fedder, R.A., Parsons, M.L., and Karasek, F.W. (1984) Products obtained during combustion of polymers under simulated incinerator conditions I. Polyethylene. *J. Chromatogr. A* 314: 263-273.
- Heylen, K., Vanparys, B., Peirsegaale, F., Lebbe, L., & De Vos, P. (2007) *Stenotrophomonas terrae* sp. nov. and *Stenotrophomonas humi* sp. nov., two nitrate-reducing bacteria isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 2056-2061.
- Hoff, A., and Jacobsson, S. (1981) Thermo-oxidative degradation of low-density polyethylene close to industrial processing conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* 26: 3409-3423.
- Hoffman, A. S. (1996) *Polymeric Materials Encyclopedia*. JC Salamone.
- Hopewell, J., Dvorak, R., and Kosior, E. (2009) Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philos. T. Roy. Soc. B* 364: 2115-2126.
- Hua, F., & Wang, H. Q. (2014) Uptake and trans-membrane transport of petroleum hydrocarbons by microorganisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(2), 165-175.
- Huang, S. J., Roby, M. S., Macri, C. A., & Cameron, J. A. (1992) The effects of structure and morphology on the degradation of polymers with multiple groups. *Special Publication-Royal Society Of Chemistry*, 109(1), 149-149.
- Hueck, H. (1974) Criteria for the assessment of the biodegradability of polymers. *Int. Biodeterior. Bull.* v.87-90.
- Iiyoshi, Y., Tsutsumi, Y., and Nishida, T. (1998) Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. *J. Wood Sci.* 44: 222-229.



- Ilves, H., Hõrak, R., & Kivisaar, M. (2001) Involvement of  $\zeta$ S in Starvation-Induced Transposition of *Pseudomonas putida* Transposon Tn4652. *Journal of bacteriology*, 183(18), 5445-5448.
- Imlay, J. A. (2015) Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current opinion in microbiology*, 24, 124-131.
- Jakubovics, N. S., Shields, R. C., Rajarajan, N., & Burgess, J. G. (2013) Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Letters in applied microbiology*, 57(6), 467-475.
- Jeon, H.J., and Kim, M.N. (2013) Isolation of a thermophilic bacterium capable of low-molecular-weight polyethylene degradation. *Biodegradation* 24: 89-98.
- Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., and Zhang, H. (2015) Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnol. Bioproc. E.* 20: 643-651.
- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y., & Bartlam, M. (2013) Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in microbiology*, 4, 58.
- Jong, I.G., Veening, J.W., and Kuipers, O.P. (2012) Single cell analysis of gene expression patterns during carbon starvation in *Bacillus subtilis* reveals large phenotypic variation. *Environ. Microbiol.* 14: 3110-3121.
- Joshi, N. A., & Fass, J. N. (2011) Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software].
- Kaeberlein, T., Lewis, K., & Epstein, S. S. (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296(5570), 1127-1129.
- Kalogerakis, N., Karkanorachaki, K., Kalogerakis, G., Triantafyllidi, E. I., Gotsis, A. D., Partsinevelos, P., & Fava, F. (2017). Microplastics generation: Onset of fragmentation of polyethylene films in marine environment mesocosms. *Frontiers in Marine Science*, 4, 84.
- Kamal, M., Huang, B., Hamid, S., Amin, M., and Maadhah, A. (1992) Handbook of polymer degradation. ed. By SH Hamid, MB Amin, and AG Maadhah: 127-168.

- Kaminsky, W., Schlesselmann, B., & Simon, C. M. (1996). Thermal degradation of mixed plastic waste to aromatics and gas. *Polymer Degradation and Stability*, 53(2), 189-197.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Kanesawa, Y., Kawaguchi, Y., and Kunioka, M. (1989) Hydrolytic degradation of microbial poly (hydroxyalkanoates). *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* 10: 227-230.
- Kato, T., Miyanaga, A., Kanaya, S., & Morikawa, M. (2009) Alkane inducible proteins in *Geobacillus thermoleovorans* B23. *BMC microbiology*, 9(1), 60.
- Katsnelson, A. (2015) News Feature: Microplastics present pollution puzzle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: 5547-5549.
- Kawai, F. (1995) Breakdown of plastics and polymers by microorganisms *Microbial and Ezymatic Bioproducts*. Springer, pp. 151-194
- Keeney, D. R., & Nelson, D. W. (1982) Nitrogen—Inorganic Forms 1. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methods of soil analysis 2)*, 643-698.
- Kelly, D. J., & Hughes, N. J. (2001) The citric acid cycle and fatty acid biosynthesis.
- Khire, J. M. (2010) Bacterial biosurfactants, and their role in microbial enhanced oil recovery (MEOR). In *Biosurfactants*(pp. 146-157). Springer, New York, NY.
- Kido, T., & Soda, K. (1984) Oxidation of anionic nitroalkanes by flavoenzymes, and participation of superoxide anion in the catalysis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 234(2), 468-475.
- Killops, S. D., & Killops, V. J. (2013) *Introduction to organic geochemistry*. John Wiley & Sons.
- Kirillova, M. V., Kirillov, A. M., Kuznetsov, M. L., Silva, J. A., da Silva, J. J. F., & Pombeiro, A. J. (2009) Alkanes to carboxylic acids in aqueous medium: metal-free and metal-promoted highly efficient and mild conversions. *Chemical Communications*, (17), 2353-2355.
- Kjelleberg, S. (Ed.). (1993) *Starvation in bacteria* (p. 277). New York: Plenum Press.

- Kolde, R. (2012) Pheatmap: pretty heatmaps. R package version, 61.
- Kolter, R., Siegele, D.A., and Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Reviews in Microbiology* 47: 855-874.
- Kopylova, E., Noé, L., & Touzet, H. (2012) SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinformatics*, 28(24), 3211-3217.
- Koutny, M., Lemaire, J., and Delort, A.-M.M. (2006) Biodegradation of polyethylene films with prooxidant additives. *Chemosphere* 64: 1243-1252.
- Koutny, M., Amato, P., Muchova, M., Ruzicka, J., and Delort, A.-M. (2009) Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63: 354-357.
- Kumar, R. V., Kanna, G. R., & Elumalai, S. (2017). Biodegradation of Polyethylene by Green Photosynthetic Microalgae. *J Bioremediat Biodegrad*, 8(381), 2.
- Kurata, N., Vella, K., Hamilton, B., Shivji, M., Soloviev, A., Matt, S., ... & Perrie, W. (2016) Surfactant-associated bacteria in the near-surface layer of the ocean. *Scientific Reports*, 6, 19123.
- Lamrani, S., Ranquet, C., Gama, M. J., Nakai, H., Shapiro, J. A., Toussaint, A., & Maenhaut-Michel, G. (1999) Starvation-induced Mucts62-mediated coding sequence fusion: a role for ClpXP, Lon, RpoS and Crp. *Molecular microbiology*, 32(2), 327-343.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357.
- Lee, B., Pometto, A.L., Fratzke, A., and Bailey, T.B. (1991) Biodegradation of degradable plastic polyethylene by phanerochaete and streptomyces species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 678-685.
- Lee, S.Y. (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1-14.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & Durbin, R. (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, H., Kundu, T. K., & Zweier, J. L. (2009) Characterization of the magnitude and mechanism of aldehyde oxidase-mediated nitric oxide production from nitrite. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33850-33858.

- Li, H., Samouilov, A., Liu, X., & Zweier, J. L. (2001) Characterization of the Magnitude and Kinetics of Xanthine Oxidase-catalyzed Nitrite Reduction Evaluation Of Its Role In Nitric Oxide Generation In Anoxic Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24482-24489.
- Li, Z., Yang, J., & Loh, X. J. (2016) Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*, 8(4), e265.
- Lima, T. M., Procópio, L. C., Brandão, F. D., Carvalho, A. M., Tótola, M. R., & Borges, A. C. (2011) Biodegradability of bacterial surfactants. *Biodegradation*, 22(3), 585-592.
- Liu, J., Ishida, H., and Salamone, J. (1996) *The polymeric materials encyclopedia*. Salamone, JC, Ed: 484.
- Lopes, L. (2007) *Evolução dos materiais poliméricos*. Primeira Semana de Polímeros IMA/UFRJ.
- Lucas, N., Bienaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., and Nava-Saucedo, J.-E.E. (2008) Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere* 73: 429-442.
- Łuczaj, W., & Skrzydlewska, E. L. Ž. B. I. E. T. A. (2003) DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett*, 8(2), 391-413.
- Ma, B., Wan, J., & Shen, Z. (2007) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and antioxidant responses in seeds and early seedlings of two different rice varieties exposed to aluminum. *Plant Growth Regulation*, 52(1), 91-100.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., and Clark, D.P. (2009) *Microbiologia de Brock*. Artmed Editora
- Magonov<sup>o</sup>, S. N., Elings, V., & Whangbo, M. H. (1997) Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surface science*, 375, L385-L391.
- Markofsky, S. B. (2000) Nitro compounds, aliphatic. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Masip, L., Veeravalli, K., & Georgiou, G. (2006) The many faces of glutathione in bacteria. *Antioxidants & redox signaling*, 8(5-6), 753-762.
- Massey, S., Adnot, A., Rjeb, A., & Roy, D. (2007) Action of water in the degradation of low-density polyethylene studied by X-ray photoelectron spectroscopy. *Express Polym Lett*, 1(8), 506-511.

- Matin, A., Auger, E., Blum, P., and Schultz, J. (1989) Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 43: 293-314.
- Matsuno, T., Horii, S., Sato, T., Matsumiya, Y., and Kubo, M. (2013) Analysis of nitrification in agricultural soil and improvement of nitrogen circulation with autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 795-809.
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551-565.
- Maza, E., Frasse, P., Senin, P., Bouzayen, M., & Zouine, M. (2013) Comparison of normalization methods for differential gene expression analysis in RNA-Seq experiments: A matter of relative size of studied transcriptomes. *Communicative & integrative biology*, 6(6), e25849.
- Meyer, C., Lea, U. S., Provan, F., Kaiser, W. M., & Lillo, C. (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game?. *Photosynthesis Research*, 83(2), 181-189.
- Mueller, R.-J. (2006) Biological degradation of synthetic polyesters—enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem.* 41: 2124-2128.
- Müller, R.J. (2005) Biodegradability of polymers: regulations and methods for testing. *Biopolymers Online*.
- Nanda, P., De, S. K., Manna, S., De, U., & Tarafdar, S. (2010) Effect of gamma irradiation on a polymer electrolyte: variation in crystallinity, viscosity and ion-conductivity with dose. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: beam Interactions with Materials and Atoms*, 268(1), 73-78.
- Numata, K., Morisaki, K., Tomizawa, S., Ohtani, M., Demura, T., Miyazaki, M., ... & Doi, Y. (2013) Synthesis of poly-and oligo (hydroxyalkanoate) s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polymer journal*, 45(10), 1094.
- Nowak, B., Pająk, J., Drozd-Bratkowicz, M., and Rymarz, G. (2011) Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *Int. Biodeter. Biodegr.* 65: 757-767.
- Ogihara, T. (1963) Oxidative degradation of polyethylene in nitrogen dioxide. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 36: 58-63.

- Ohtake, Y., Kobayashi, T., and Asabe... , H. (1998) Oxidative degradation and molecular weight change of LDPE buried under bioactive soil for 32–37 years. *J. Appl. Polym. Sci.* 70: 1643-1659.
- Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., ... & Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific reports*, 7, 39515.
- Ojumu, T., Yu, J., and Solomon, B. (2004) Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African Journal of Biotechnology* 3: 18-24.
- Okshevsky, M., & Meyer, R. L. (2015) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 341-352.
- Oliveira, P.S., and Marquis, R.J. (2002) *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press
- Ornston, L. N. (1966) The Conversion of Catechol and Protocatechuate to  $\beta$ -Ketoadipate by *Pseudomonas putida* III. ENZYMES OF THE CATECHOL PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 241(16), 3795-3799.
- Orhan, Y., & Büyükgüngör, H. (2000). Enhancement of biodegradability of disposable polyethylene in controlled biological soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 45(1-2), 49-55.
- Orr, I.G., Hadar, Y., and Sivan, A. (2004) Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65: 97-104.
- Patureau, D., Bernet, N., & Moletta, R. (1996) Study of the denitrifying enzymatic system of *Comamonas* sp. strain SGLY2 under various aeration conditions with a particular view on nitrate and nitrite reductases. *Current Microbiology*, 32(1), 25-32.
- Pechter, K. B., Yin, L., Oda, Y., Gallagher, L., Yang, J., Manoil, C., & Harwood, C. S. (2017). Molecular basis of bacterial longevity. *mBio*, 8(6), e01726-17.
- Peixoto, J.B. (2013) *Prospecção de microrganismos com potencial para biodegradação de polietileno*. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília

- Peixoto, J., Silva, L.P., Kruger, R.H. (2017) Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 634-644.
- Pereira, C., Ferreira, N. R., Rocha, B. S., Barbosa, R. M., & Laranjinha, J. (2013). The redox interplay between nitrite and nitric oxide: From the gut to the brain. *Redox biology*, 1(1), 276-284.
- Perugini, F., Mastellone, M., and Arena, U. (2005) A life cycle assessment of mechanical and feedstock recycling options for management of plastic packaging wastes. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 24(2), 137-154.
- Phaiboun, A., Zhang, Y., Park, B., & Kim, M. (2015) Survival kinetics of starving bacteria is biphasic and density-dependent. *PLoS computational biology*, 11(4), e1004198.
- Pilegaard, K. (2013) Processes regulating nitric oxide emissions from soils. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 368(1621), 20130126.
- Pometto, A.L., Lee, B.T., and Johnson, K.E. (1992) Production of an extracellular polyethylene-degrading enzyme (s) by *Streptomyces* species. *Applied and environmental microbiology*, 58(2), 731-733.
- Potts, J.E., Ackart, W.B., Clendinning, R.A., and Niegisch, W.D. (1972) The biodegradability of synthetic polymers. The biodegradability of synthetic polymers. UNION CARBIDE CORP NEW YORK.
- Pramila, R., & Ramesh, K. V. (2017). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area. *Journal of microbiology and biotechnology research*, 1(4), 131-136.
- Pridham, T.G., and Gottlieb, D. (1948) The Utilization of Carbon Compounds by Some Actinomycetales as an Aid for Species Determination. *J. Bacteriol.* 56: 107-114.
- Putthividhya, A., Kukor, J. J., & Abriola, L. M. (2016). The effects of substrate exposure history and carbon starvation-induced stress on the EPS synthesis of TCE degrading toluene oxidizing soil bacteria. *Environmental Earth Sciences*, 75(9), 775.
- Quelas, J. I., Mesa, S., Mongiardini, E. J., Jendrossek, D., & Lodeiro, A. R. (2016) Regulation of polyhydroxybutyrate synthesis in the soil bacterium *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *Applied and environmental microbiology*, 82(14), 4299-4308.
- Quirino, B.F., Pappas, G.J., Tagliaferro, A.C., Collevatti, R.G., Neto, E.L., da Silva, M.R.S., et al. (2009) Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiol. Res.* 164: 59-70.

- Rajandas, H., Parimannan, S., Sathasivam, K., Ravichandran, M., and Yin, L. (2012) A novel FTIR-ATR spectroscopy based technique for the estimation of low-density polyethylene biodegradation. *Polymer Testing* 31: 1094-1099.
- Reeve, C., Amy, P., and Matin, A. (1984) Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 160: 1041-1046.
- Richeson, C. E., Mulder, P., Bowry, V. W., & Ingold, K. U. (1998). The Complex Chemistry of Peroxynitrite Decomposition: New Insights<sup>1</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 120(29), 7211-7219.
- Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1988) Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha*: oxygen uptake and enzyme studies. *Microbiology*, 134(4), 857-863.
- Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1990) Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57(3), 139-152.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rogstam, A., Larsson, J. T., Kjelgaard, P., & Von Wachenfeldt, C. (2007) Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 189(8), 3063-3071.
- Rojo, F. (2010) Enzymes for aerobic degradation of alkanes. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology* (pp. 781-797). Springer Berlin Heidelberg.
- Roy, P.K., Titus, S., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C., and Rajagopal, C. (2008) Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability*, 93(10), 1917-1922.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... & Langley, E. (2010) Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167.
- Rull, F., Prieto, A.C., Casado, J.M., and Sobron, F. (1993) Estimation of crystallinity in polyethylene by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 24: 545-550.



- Saadoun, I., Alawawdeh, M., Jaradat, Z., and Ababneh, Q. (2008) Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil on diesel and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (*alkB*) by PCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 2191-2198.
- Sakharovskii, V., Nikitin, D., and Sakharovskii, V. (1999) Physiological characterization of the survival of some Gram-negative bacteria under conditions of carbon deficiency. *Applied biochemistry and microbiology* 35: 380-388.
- Sanin, S.L., Sanin, F.D., and Bryers, J.D. (2003) Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochem.* 38: 909-914.
- Santo, M., Weitsman, R., and Sivan, A. (2013) The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. *Int. Biodeter. Biodegr.* 84: 204-210.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., ... & Sahl, J. W. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 75(23), 7537-7541.
- Schneider, B. L., Kiupakis, A. K., & Reitzer, L. J. (1998) Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 180(16), 4278-4286.
- Secchi, E.R., and Zarzur, S. (1999) Plastic debris ingested by a Blainville's beaked whale, *Mesoplodon densirostris*, washed ashore in Brazil. *Aquatic Mammals* 25: 21-24.
- Sen, S.K., and Raut, S. (2015) Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(1), 462-473.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnol. Adv.* 26: 246-265.
- Shimao, M. (2001) Biodegradation of plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 242-247.
- Shimizu, K. (2013) Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses. *Metabolites*, 4(1), 1-35.

- Shiva, S. (2013) Nitrite: a physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox biology*, 1(1), 40-44.
- Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N., & Matsuo, M. (1998) Denitrification by Actinomycetes and Purification of Dissimilatory Nitrite Reductase and Azurin from *Streptomyces thioluteus*. *Journal of bacteriology*, 180(17), 4413-4415.
- Siddiqui, I. A., & Shaikat, S. S. (2004) Liquid culture carbon, nitrogen and inorganic phosphate source regulate nematicidal activity by fluorescent pseudomonads in vitro. *Letters in applied microbiology*, 38(3), 185-190.
- Siddiqui, M., and Redhwi, H. (2009) Pyrolysis of mixed plastics for the recovery of useful products. *Fuel Processing Technology* 90.
- Singh, B., and Sharma, N. (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* 93: 561-584.
- Sivan, A., Szanto, M., and Pavlov, V. (2006) Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 346-352.
- Sivan, A. (2011) New perspectives in plastic biodegradation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22: 422-426.
- Skariyachan, S., Setlur, A. S., Naik, S. Y., Naik, A. A., Usharani, M., & Vasist, K. S. (2017). Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 8443-8457.
- Skariyachan, S., Patil, A. A., Shankar, A., Manjunath, M., Bachappanavar, N., & Kiran, S. (2018). Enhanced polymer degradation of polyethylene and polypropylene by novel thermophilic consortia of *Brevibacillus* sps. and *Aneurinibacillus* sp. screened from waste management landfills and sewage treatment plants. *Polymer Degradation and Stability*, 149, 52-68.
- Song, J.H., Murphy, R.J., Narayan, R., and Davies, G.B. (2009) Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philos. T. Roy. Soc. B* 364: 2127-2139.
- Sparacino-Watkins, C. E., Tejero, J., Sun, B., Gauthier, M. C., Thomas, J., Ragireddy, V., ... & Gladwin, M. T. (2014) Nitrite reductase and nitric-oxide synthase activity of the mitochondrial molybdopterin enzymes mARC1 and mARC2. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10345-10358.
- Spear, L.B., Ainley, D.G., and Ribic, C.A. (1995) Incidence of plastic in seabirds from the tropical pacific, 1984–1991: relation with distribution of species, sex, age, season, year and body weight. *Mar. Environ. Res.* 40: 123-146.

- Sperling, L.H. (2005) Introduction to physical polymer science. Introduction to Physical Polymer Science.
- Srinivasan, S., & Avadhani, N. G. (2012) Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(6), 1252-1263.
- Steinbuechel, A. (1992) Biodegradable plastics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 291-297.
- Stöver, H. D. H., & Li, K. (1996) In *Polymeric Materials Encyclopedia*, JC Salamone, Ed.
- Strobl, G.R., and Hagedorn, W. (1978) Raman spectroscopic method for determining the crystallinity of polyethylene. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.* 16: 1181-1193.
- Su, W. F. (2013). *Principles of Polymer Design and Synthesis*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., ... & Mesirov, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545-15550.
- Sudesh, K., and Abe, H. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*, 25(10), 1503-1555.
- Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, S.P., and Venkatesan, R. (2008) Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. *Int. Biodeter. Biodegr.* 61: 203-213.
- Szép, A., Anna, P., Csontos, I., Marosi, G., and Matkó, S. (2004) Micro Raman and atomic force microscopy analysis of naturally aged polyethylene. *Polym. Degrad. Stab.* 85: 1023-1027.
- Taidi, B., Mansfield, D. A., & Anderson, A. J. (1995) Turnover of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS microbiology letters*, 129(2-3), 201-205.
- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., et al. (2009) Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos. T. Roy. Soc. B* 364: 2027-2045.

- Tieves, F., Erenburg, I. N., Mahmoud, O., & Urlacher, V. B. (2016). Synthesis of chiral 2-alkanols from n-alkanes by a *P. putida* whole-cell biocatalyst. *Biotechnology and bioengineering*, 113(9), 1845-1852.
- Tiso, M., & Schechter, A. N. (2015) Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions. *PloS one*, 10(3), e0119712.
- Thompson, R.C., Moore, C.J., vom Saal, F.S., and Swan, S.H. (2009) Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. T. Roy. Soc. B* 364: 2153-2166.
- Thompson, R.C., Swan, S.H., Moore, C.J., and vom Saal, F.S. (2009) Our plastic age. *Philos. T. Roy. Soc. B* 364: 1973-1976.
- Tribedi, P., and Sil, A.K. (2013) Low-density polyethylene degradation by *Pseudomonas* sp. AKS2 biofilm. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20: 4146-4153.
- Usha, R., Sangeetha, T., and Palaniswamy, M. (2011) Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil.*
- Valentini, M., & Filloux, A. (2016) Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12547-12555.
- Vaux, D. J., & Cottingham, M. (2007) U.S. Patent No. 7,224,470. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Vona, I., Costanza, J., Cantor, H., and Robert, W. (1965) *Manufacture of plastics*. Wiley, New York 1: 141-142.
- Wackett, L. P., Brusseau, G. A., Householder, S. R., & Hanson, R. S. (1989) Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(11), 2960-2964.
- Wang, P., Li, X., Xiang, M., & Zhai, Q. (2007) Characterization of efficient aerobic denitrifiers isolated from two different sequencing batch reactors by 16S-rRNA analysis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(6), 563-567.
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1308-1322.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.

- Wilkes, R. A., & Aristilde, L. (2017) Degradation and Metabolism of Synthetic Plastics and Associated Products by *Pseudomonas* spp.: Capabilities and Challenges. *Journal of applied microbiology*.
- Williams, P.T. (1999) Interaction of plastics in mixed-plastics pyrolysis. *Energy & Fuels*, 13(1), 188-196.
- Witt, U., Müller, R.-J., and Deckwer, W.-D. (1997) Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *J. Environ. Polym. Degrad.* 5: 81-89.
- Wood, P. M. (1990). Autotrophic and heterotrophic mechanisms for ammonia oxidation. *Soil Use and Management*, 6(2), 78-79.
- Wrage, N., Velthof, G. L., Van Beusichem, M. L., & Oenema, O. (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1723-1732.
- Wu, Y., Shukal, S., Mukherjee, M., and Cao, B. (2015) Involvement in Denitrification is Beneficial to the Biofilm Lifestyle of *Comamonas testosteroni*: A Mechanistic Study and Its Environmental Implications. *Environ. Sci. Technol.* 49: 11551-11559.
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyaya, Y., Saiganji, A., and Tani, Y. (2001) Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polym. Degrad. Stab.* 72: 323-327.
- Yang, J., Yang, Y., Wu, W.-M., Zhao, J., and Jiang, L. (2014) Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. *Environ. Sci. Technol.* 48: 13776-13784.
- Yin, L., Mano, J. I., Wang, S., Tsuji, W., & Tanaka, K. (2010) The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots. *Plant physiology*, 152(3), 1406-1417.
- Yoon, M., and Jeon, H. (2012) Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. *J. Bioremed. Biodegr.* 03: 1-8.
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., et al. (2016) A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351: 1196-1199.
- Zambrano, M.M., Siegele, D.A., Almirón, M., Tormo, A., and Kolter, R. (1993) Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. *Science* 259: 1757-1760.

- Zerbino, D.R., and Birney, E. (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18: 821-829.
- Zettler, E.R., Mincer, T.J., and Amaral-Zettler, L.A. (2013) Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47: 7137-7146.
- Zhang, H., and Zhou, S. (2016) Screening and Cultivation of Oligotrophic Aerobic Denitrifying Bacteria. *Water Pollution and Water Quality Control of Selected Chinese Reservoir Basins*. Springer, pp. 451-473
- Zhao, J., Guo, Z., Ma, X., and Liang, G. (2004) Novel surface modification of high-density polyethylene films by using enzymatic catalysis. *Journal of applied polymer science*, 91(6), 3673-3678.
- Zhao, X., & Drlica, K. (2014) Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Current opinion in microbiology*, 21, 1-6.
- Zhu, X., Burger, M., Doane, T. A., & Horwath, W. R. (2013) Ammonia oxidation pathways and nitrifier denitrification are significant sources of N<sub>2</sub>O and NO under low oxygen availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6328-6333.
- Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.

*Artigos completos publicados em periódicos:*

Peixoto, J., Silva, L.P., Kruger, R.H. (2017) Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. Journal of Hazardous Materials, 324, 634-644.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)



# Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation

Julianna Peixoto<sup>a</sup>, Luciano P. Silva<sup>b</sup>, Ricardo H. Krüger<sup>a,\*</sup>

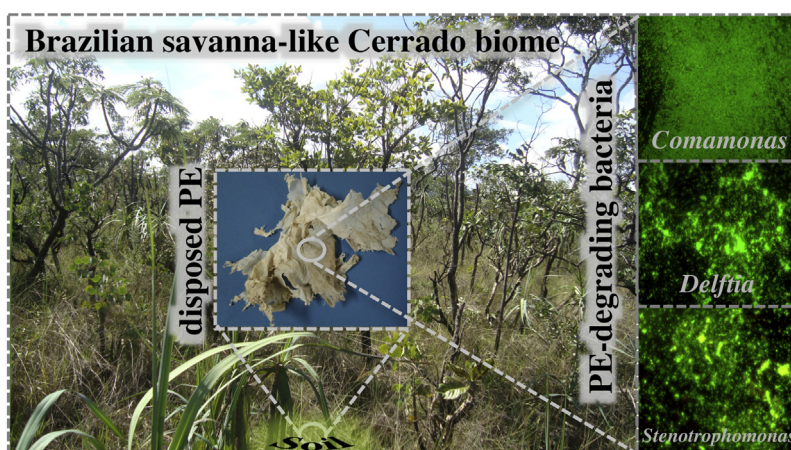
<sup>a</sup> Laboratory of Enzymology, Cellular Biology Department, Biological Sciences Institute, University of Brasilia, Brasilia, 70910-900, DF, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Nanobiotechnology, Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasilia, 70770-917, DF, Brazil

### HIGHLIGHTS

- 9 novel PE-degrading bacteria were isolated from Cerrado soil.
- PE-degrading bacteria are from *Comamonas*, *Delftia* and *Stenotrophomonas* genera.
- Strains are capable of degrading PE of 191.000 without additives or pre-treatments.
- Nitrogen metabolism is involved in the chemical modification of PE.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 May 2016

Received in revised form 7 October 2016

Accepted 13 November 2016

Available online xxx

#### Keywords:

Biodegradation

Polyethylene

*Comamonas*

*Stenotrophomonas*

*Delftia*

### ABSTRACT

Discarded PE-based products pose a social and environmental threat because of their recalcitrance to degradation, a consequence of the unique set of PE's physicochemical properties. In this study we isolated nine novel PE-degrading bacteria from plastic debris found in soil of the savanna-like Brazilian Cerrado. These bacterial strains from the genera *Comamonas*, *Delftia*, and *Stenotrophomonas* showed metabolic activity and cellular viability after a 90-day incubation with PE as the sole carbon source. ATR/FTIR indicated that biodegraded PE undergone oxidation, vinylene formation, chain scission, among other chemical changes. Considerable nanoroughness shifts and vast damages to the micrometric surface were confirmed by AFM and SEM. Further, phase imaging revealed a 46.7% decrease in the viscous area of biodegraded PE whereas Raman spectroscopy confirmed a loss in its crystalline content, suggesting the assimilation of smaller fragments. Intriguingly, biodegraded PE chemical fingerprint suggests that these strains use novel biochemical strategies in the biodegradation

\* Corresponding author at: Laboratório de Enzimologia, Instituto de Ciências Biológicas, Bloco K, Sala K-10/4, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, DF, Brazil.

E-mail addresses: [juliannapeixoto@gmail.com](mailto:juliannapeixoto@gmail.com) (J. Peixoto), [luciano.paulino@embrapa.br](mailto:luciano.paulino@embrapa.br) (L.P. Silva), [kruger@unb.br](mailto:kruger@unb.br) (R.H. Krüger).



process. Our results indicate that these microbes are capable of degrading untreated PE of very high molecular weight ( $191,000 \text{ g mol}^{-1}$ ) and survive for long periods under this condition, suggesting not only practical applications in waste management and environmental decontamination, but also future directions to understand the unraveled metabolism of synthetic polymers.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Among the various commercially available synthetic polymers, polyethylene (PE) is unquestionably the most utilized. It is frequently found in modern products and has a worldwide production of about 150 million tons per year [1–3]. The wide range of applications for this material is due to its versatility, durability, resistance, and low cost—necessary features to meet the high demands of modern society [4,5]. Despite the broad applicability of this material, almost 40% of the total production is destined for single-use packaging [1], highlighting the importance of plastic disposal as a global problem. The lack of effective strategies to manage post-consume plastics results in the accumulation of these degradation-resistant and long-lasting synthetic materials in natural environments, with negative impacts on both humans and wildlife [2,3].

Although biodegradable plastics have been developed to replace PE or at least minimize its production [4,6], their rates of degradation in natural environments are not well studied, and some have been shown to persist for many years [1,7]. Even if these new materials are proved to be a viable solution, strategies are still needed to degrade the inert plastics produced over the last century and to minimize their dramatic effects on the environment. One promising approach is biodegradation, which is the metabolism of these compounds by microbes to yield energy for cellular machinery, essential carbon compounds, and secondary metabolites that may be useful in biotechnology and commercial applications [8].

However, PE biodegradation is not a trivial process, since this polymer is extremely resistant to microbial attack [9] due to its molecular structure and chemical composition [10]. PE consists of very long chain alkanes with high molecular weight, exceeding the reported limit of  $500 \text{ g mol}^{-1}$  for microbial assimilation of alkanes [11]. In addition, its highly hydrophobic nature together with the hydrophilicity of enzymes synthesized by microorganisms inhibits formation of the enzyme-substrate complex. Its long hydrophobic carbon chain triggers chain folding, resulting in crystalline, interphase and amorphous regions [12]. The interphase regions are known to host the beginning of PE degradation [13]. In contrast, crystalline structures are particularly stable and closely packed and therefore not readily accessed by enzymes, whereas amorphous regions are constituted by inflexible long molecules of higher molecular weight that are resistant to enzyme modification. Several studies have reported that PE biodegradation is possible after abiotic pretreatment (chemical, thermal, and/or photo-oxidation), which decreases its hydrophobicity and molecular weight to facilitate biotic degradation. However, evidence for the biodegradation of untreated PE still remains very limited, since up to date only two bacterial strains, *Enterobacter asburiae* YT1 and *Bacillus* sp. YP1, were shown to degrade untreated PE with an average molecular weight (Mw) of 88,200 [14].

Microorganisms comprise more than 60% of the earth's biomass [15], suggesting the possibility of additional microorganisms capable of utilizing PE as a carbon source. Indeed, an increasing number of microorganisms have been found to be related to this process [16]. Our previous study demonstrated that the microbial community from the soil of the Brazilian biome Cerrado, a neotropical savanna located in central Brazil, is exceptionally rich and diverse,

containing microorganisms that actively regulate almost every biogeochemical cycle [17,18]. Thus, we infer that the Cerrado soil microbiome provides a wide range of metabolic pathways that can contribute to the PE degradation process. In this context, the aim of this study is to isolate and identify PE-degrading microbial strains colonizing plastic debris from this biome, as well as to characterize their degradation effects.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microbial isolation and culture conditions

Plastic debris with strong evidence of degradation, such as cracks, holes, and changes in color and texture, were collected from Cerrado soil (Fig. S1), which is a moderately drained and deep oxisol with a color range from dark red to yellow, a main granulometric content of clay (15–80%) and sand, a medium to high carbon content, an acidic pH ranging between 4.3 and 4.9 and a high aluminum saturation [17,19]. The plastic-colonizing microorganisms were suspended in 0.9% NaCl solution (saline buffer), which was used to inoculate culture plates containing Nutrient Broth, R2A Broth, Czapek-Dox Broth, Middlebrook Broth, or Marine Broth (Difco, Netherlands) with 15 g/L agar (Acumedia, USA). Single colonies were subcultured overnight in their respective liquid media on a rotary shaker (150 rpm). The bacterial isolates were then stored at  $-80^\circ\text{C}$  with 15% glycerol (Sigma). All bacterial cultures were maintained at  $28^\circ\text{C}$  during the study.

### 2.2. Mineral oil degradation assay

The isolated bacterial strains were first tested for their ability to degrade mineral oil, a mixture of alkanes of low molecular weight. The bacterial isolates were grown in 5 mL of Nutrient Broth medium for 24 h, pelleted by centrifugation at  $7000 \times g$  for 5 min, and washed  $3 \times$  with saline buffer for complete removal of culture medium. The bacterial strains were then cultivated in a carbon-free mineral synthetic 1.5% agar medium as described by Pridham & Gottlieb [20]. The medium was supplemented with 0.1% mineral oil (Sigma Aldrich, USA) as the sole carbon source [21], the cultures were incubated for 7 days and colonies were selected based on clear-zone formation.

### 2.3. Screening of PE-degrading bacterial strains

Mineral oil-degrading bacteria were cultured in glass tubes containing 3 mL minimal synthetic media supplemented with 0.1% ultra-high molecular weight PE powder (Sigma Aldrich, USA) in three replicates, and maintained in a rotary shaker (150 rpm) for 12 days. RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was resuspended in deionized formamide (Sigma Aldrich, USA), analyzed by denaturing formaldehyde agarose gel electrophoresis and quantified with the Qubit fluorometer (Invitrogen, USA) using the RNA Quant-it assay kit (Invitrogen, USA) [22].

#### 2.4. Progress of bacterial adhesion and viability on PE films

Strains that showed metabolic activity after cultivation with PE as the sole carbon source were grown overnight in 10 mL Nutrient Broth medium in three replicates for 24 h. The grown cells in late log phase were then washed three times with saline buffer and inoculated into flasks containing 30 mL mineral synthetic medium and a piece of approximately 0.5 cm<sup>2</sup> of low-density (0.92 g cm<sup>-3</sup>, ISO 1183-A) untreated PE film (Ipehene 111, 100 μm thickness, Carmel Olefins, Israel) without additives with an average molecular weight of 191,000 (GPC provided by the manufacturer), melt flow rate (190 °C/2.16 kg, ISO 1133) of 0.7 g 10 min<sup>-1</sup> and a peak melting temperature by DSC of 109 °C (ISO 11357-3) [23]. Cultures were maintained in a rotary shaker for 12, 15, 20, or 90 days. PE films containing adherent microbes were immersed into 1 mL of saline phosphate buffer then stained using the Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, USA) and analyzed by fluorescence microscopy. Negative controls for each isolate were incubated under the same culture conditions, except by the addition of a glass sheet instead of a PE film. For Gram-positive and Gram-negative strains, respectively, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were also incubated with PE film as controls to estimate the influence of adhesion mechanisms and electrostatic interactions between cells surfaces and PE. The entire PE films and glass sheets surfaces were analyzed under a 40 X magnification to fully assess the bacterial viability of each culture.

#### 2.5. Disinfection of PE films

After evaluating the adherent microorganisms, the PE films were disinfected with 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate for 4 h followed by 70% (v/v) ethanol for 4 h, and then rinsed with distilled water following an adapted widely used protocol [23,24]. This procedure enables the complete detachment of microbial cells and debris for investigation of degradation traces in PE films [23]. The untreated PE films were also subjected to this disinfection procedure prior the analyses.

#### 2.6. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of PE

The chemical fingerprint of the disinfected PE films was assessed by attenuated total reflectance (ATR)-FTIR spectroscopy using the Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer (Thermo Scientific, USA). To investigate the chemical modifications of PE induced by the treatments, we compared the IR spectra of PE that was biotically treated for 90 days (incubated with bacteria) with PE abiotically treated for 90 days (exposed to weathering conditions; positive control) and untreated PE (negative control). For these analyses, 10 randomly chosen spots were assayed in each of the three replicates of treated and untreated PE films.

#### 2.7. Raman spectroscopy of PE

The crystallinity of the disinfected PE films was inferred by Raman spectroscopy using a confocal Raman microscope (WITec Alpha 300 RA), charge-coupled device detector, and XTRA II single-frequency diode laser at 785 nm (power <400 mW). Raman spectra were acquired in spectroscopy mode using a high numerical aperture Zeiss EC Epiplan-Neofluar 100× air objective (NA = 0.9 DIC). The integration time was 0.2 s, and 100 acquisitions were performed using 10 replicates for each PE film. The mass fractions of the orthorhombic crystalline ( $\alpha_c$ ), isotropic amorphous ( $\alpha_a$ ), and anisotropic disordered ( $\alpha_b$ ) phases were determined following the Strobl and Hagedorn method [25].

#### 2.8. Scanning electron microscopy (SEM) of PE

To characterize surface topography, the disinfected PE samples were platinum coated under high vacuum conditions and imaged using a field emission scanning electron microscope (JSM-7001F; Jeol, Japan) with an acceleration voltage of 5 kV and magnification of 4500 X. The entire surfaces of the PE films were scanned in order to obtain representative images.

#### 2.9. Atomic force microscopy (AFM) of PE

The disinfected PE film samples were analyzed by AFM (SPM 9600; Shimadzu, Japan) in air at room temperature, using rectangular silicon cantilevers (tip radius <10 nm), nominal spring constant of 42 N/m, and resonance frequency of ~260 kHz. Images were obtained in dynamic-phase mode with a scanner displaying a maximum of 125 μm in X-Y directions and 7 μm in the Z direction. SPM-9600 offline software was used to process the AFM images with only horizontal leveling and plane fitting of the surfaces. For each PE film, 10 replicates were performed. Surface analyses of the images were then performed, and nanoroughness parameters were determined. Subsequently, the AFM images were rendered using the same software for qualitative evaluation [26]. Finally, phase images were also analyzed, and the proportion of viscous areas (%) was calculated using ImageJ software.

#### 2.10. Identification of PE-degrading bacterial strains

The PE-degrading bacterial strains were identified by 16S rRNA sequencing. After growing bacterial cultures for 24 h in Nutrient Broth (Difco), cell pellets were incubated with 200 μL lysozyme (1.82 mg mL<sup>-1</sup>) at 37 °C for 1 h. Lysis buffer was added, and cells were homogenized for 40 s at 6 m s<sup>-1</sup> using the Fast Prep sample preparation instrument (MP Biomedicals). Bacterial genomic DNA was then purified with the Wizard SV Genomic DNA Purification System Quick Protocol kit (Promega), and 16S rRNA was amplified with bacterial universal primers [27]. The 16S rRNA sequences were aligned using the ClustalW algorithm [28] and manually edited with Bioedit. The sequences were aligned with similar sequences from NCBI for taxonomic classification using the Blastn and Mothur tools [29]. A phylogenetic tree was constructed with MEGA6 software [30] using the maximum-likelihood method with 1000 bootstrap replicates.

#### 2.11. Statistical analysis

All quantitative data were statistically analyzed considering replicates and negative controls. Statistical significance was based in confidence levels of less than 0.05.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Isolation and screening of PE-degrading bacteria

Brazilian Cerrado soil microbiome is a rich and diverse environment that hosts a remarkable variety of metabolic reactions, suggesting the presence of microbes capable of degrading a wide range of substrates [17,31]. After cultivating the plastic-colonizing microbes from Cerrado soil in different agar media, we successfully isolated and cultured a total of 647 bacterial strains. These microorganisms were first screened for the ability to degrade mineral oil, a low molecular weight substrate chemically similar to PE, in which 54 mineral oil-degrading microorganisms were identified. We then evaluated the metabolic activity of the oil-degrading bacteria after incubation with PE as the sole carbon and energy source. Results of total RNA analysis revealed 28 metabolically active bacterial strains

and 16 strains were selected for further analysis based on total RNA concentrations (data not shown).

### 3.2. Taxonomic analysis and identification of PE-degrading bacteria

Results of 16S rRNA sequencing grouped the 16 isolates that showed signs of the ability to degrade PE into three genera: *Comamonas*, *Delftia*, and *Stenotrophomonas* (Fig. S2). Further characterization is necessary for complete taxonomic classification and to determine whether they represent novel species. No previous studies have reported *Comamonas* species able to degrade PE, despite their known ability to degrade mineral oil [32]. Similarly, *Delftia* and *Stenotrophomonas* species have been reported to biodegrade other synthetic polymers [33,34], suggesting the actual potential of these strains to degrade PE.

### 3.3. Adhesion and viability of PE-degrading bacteria

Cellular adhesion and viability of the bacteria cultured with PE film were investigated by fluorescence microscopy using the well-established live/dead assay with the LIVE/DEAD bacterial viability kit [24]. Since non-soluble PE was the sole carbon and energy source provided, cells would mainly adhere to the polymer surface, secrete extracellular enzymes and trigger the molecular modifications required for assimilation of those hydrocarbons, such as bond scission, chemical transformation, structural changes, and formation of new functional groups [4,23]. Because of its extremely high molecular weight, this polymer is not readily assimilated and demands to be broken down [9]. Microbial assimilation is mediated by catalytic membrane proteins or secreted extracellular enzymes that induce PE's chain cleavage to the formation of smaller compounds, the first step of the biodegradation process. Depolymerization is the crucial step and some oxidoreductases have been described to have this ability [35]. In contrast to planktonic cells, attached cells can secrete degrading enzymes and auxiliary molecules near PE's surface, maximizing their concentration around the polymer and increasing the probability of substrate modification. In addition, adherence ensures that starved cells are close enough to assimilate degradation products efficiently enough to meet their carbon and energy demand.

Although dead cells may also provide a consistent carbon and energy source, bacteria would need to be adjacent to dead cells in order to maintain their viability and, still, few viable cells would remain after 20 days if the bacterial strain was not capable of degrading and utilizing PE. This scenario is represented by the negative control that consists in cells cultivated with a glass sheet, which reflects the metabolic state of the bacterial strains grown without added carbon sources. This would also allow for inferences about a possible utilization of stored energy sources, which would aid the cellular viability during carbon starvation. Fig. 1 shows representative bacterial strains from each genus incubated with PE film or glass sheets for 12, 15, or 20 days (see Figs. S3–S5 for further details).

Since the only differing parameter between the cultures of each isolate was the presence/absence of PE, it is possible to access the impact of the polymer over the maintenance of bacterial viability. Although the amount of adherent cells qualitatively differed between cultures incubated with PE film and negative controls (Table S1), all cultures had a similar proportion of viable cells after 12 days. However, differences between cultures incubated with PE and negative controls emerged after 15 days, and these differences were even more obvious after 20 days. At this moment, the PE films were densely colonized by the viable PE-degrading strains, with very few dead cells observed. The strong predominance of viable cells on PE-containing cultures indicates that they

are successfully breaking down PE and, subsequently, assimilating its products as carbon sources to support biosynthesis and energy production. On the other hand, biofilms that consisted primarily of dead cells were detected over the entire surface of the glass sheets (negative controls). Furthermore, cells incubated without PE were mainly attached to each other rather than to the glass surface. Closer observation revealed that live cells in the negative control cultures were above/surrounded by cellular debris, suggesting the use of dead cells as the carbon and energy source. Based on the contrasts between the PE-containing cultures and their negative controls observed over the 20-day period, we perceived a positive relationship between the presence of PE and the viability of the PE-degrading bacteria. We then assessed the long-term viability of these potential PE-degrading bacterial strains cultured with PE film as the sole carbon source. Fig. 2 shows PE films densely colonized by viable cells after 90 days, with very few dead cells observed. In contrast to the usual average incubation of 60 days, the strong viability of *Comamonas* sp., *Delftia* sp. and *Stenotrophomonas* sp. after 90 days shows these strains can remain viable after even longer periods under this condition [3].

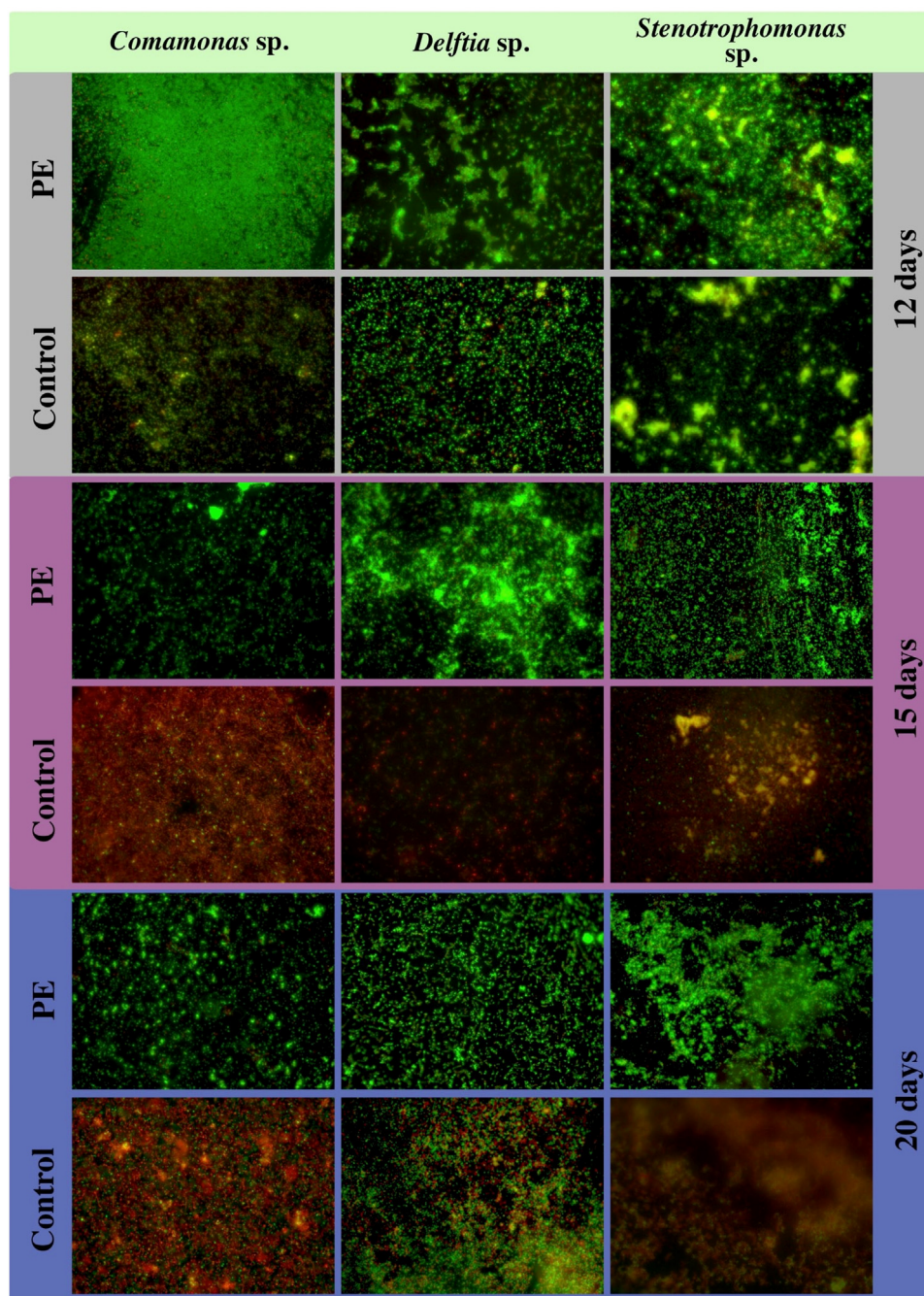
To evaluate the influence of (1) electrostatic interactions between the outer membrane and the surface of the PE film and (2) adhesion cellular machinery, non-PE-degrading synthetic strains of *B. subtilis* and *E. coli* were also incubated with PE film or a glass sheet to serve as negative controls for Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively (Figs. S6 and S7). In contrast to the cultures of potential PE-degrading strains, the results showed no relationship between the presence of PE and cellular viability, as sparse biofilms and an increasing number of dead cells were observed over the 20-day incubation period in both cultures.

### 3.4. Characterization of PE biodegradation using physicochemical and imaging methods

Since hydrophobicity and high molecular weight of PE impede biodegradation by preventing the bacterial adhesion and the assimilation of the alkane, oxidation and/or chain scission emerge as the limiting steps [4,11]. Indeed, with an increasing variety of PE-degrading enzymes reported in the literature [16,35], it has been shown that the microbial ability to consume this polymer is intrinsically related to its prior oxidation or molecular weight reduction. Subsequently, the smaller and oxidized products can be assimilated by microbes, which mineralize them mainly through  $\omega$  or  $\beta$ -oxidation [11].

The first step of the general PE degradation mechanism is typically auto-oxidation through (i) the initial formation of radicals  $R^{\bullet}$  and  $H^{\bullet}$ , which involves the activation of PE by a loss of hydrogen after energy input or formation of charge transfer complexes [36–42]. A complex “domino-effect” is triggered by this macroradical formation ( $R^{\bullet}$ ), leading to (ii) the formation of cross-linked structures within the polymer or (iii) the oxidation (e.g. via atmospheric  $O_2$ , water) of its carbon chain. This oxidation produces (iii) other reactive molecules that can either (iv) result in the formation of other radicals to restart the process or (iv') stabilize in the form of a hydroxyl, carbonyl, or nitro group and often result in double bond formation (formation of a vinylene group) [11,37,43,44].

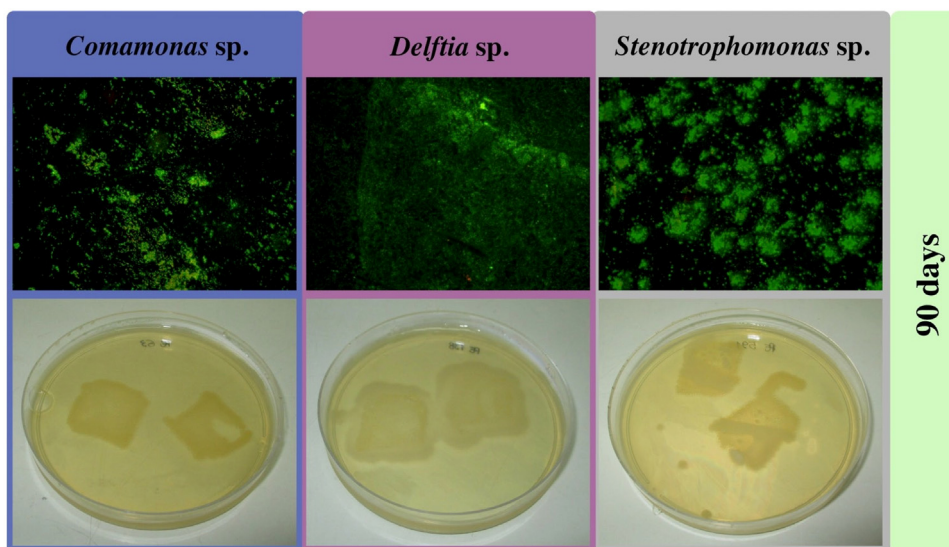
The unique spectroscopic fingerprints of the treated PE are contrasted with that of untreated PE in Fig. 3a, thus allowing to target the chemical modifications induced by either bacteria or weather. The highlighted absorption peaks represent the major chemical modifications induced by the treatments, such as chain scission ( $915\text{--}905\text{ cm}^{-1}$ ;  $H_2C=C-$ ) and formation of alkoxy groups ( $1026\text{ cm}^{-1}$ ,  $1090\text{ cm}^{-1}$ ; C–O), acyl groups ( $1220\text{ cm}^{-1}$ ; C=O), nitro groups ( $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ; N–O), double bonds ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ;  $-C=C-$ ), and carbonyl groups ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ; C=O), revealing clear differences between biotic and abiotic degradations.



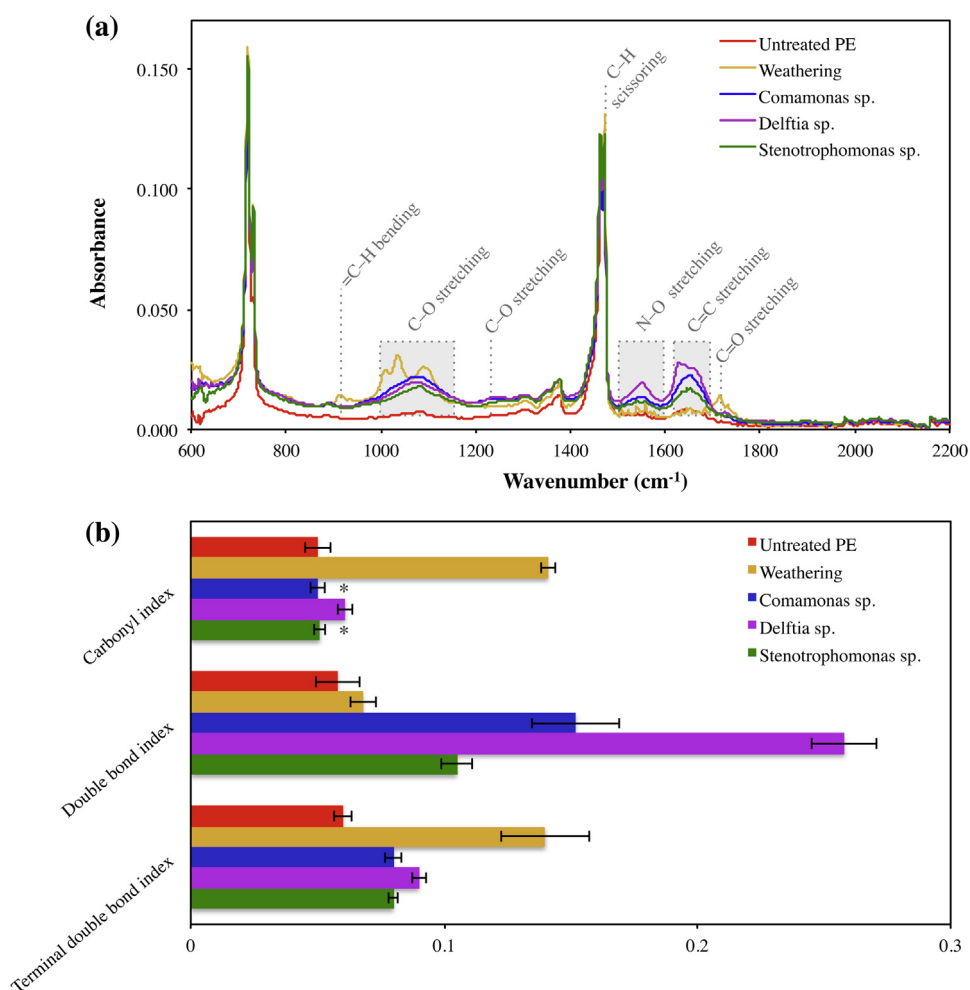
**Fig. 1.** Cellular adhesion and viability of *Comamonas sp.*, *Delftia sp.*, and *Stenotrophomonas sp.* after 12, 15, or 20 days cultured in minimal synthetic medium with a PE film (PE) or a glass plate (Control): live cells (green), dead cells (red), and overlap between live/dead cells (yellow). During the first 12 days of incubation, there was only a discrete impact of PE to the cellular viability of these strains, with few dead cells in the absence of carbon sources. However, after 15 days, a strong cellular viability could be observed in the presence of PE as the sole carbon source, contrasting to the vast predominance of dead cells in the carbon-free cultures. Still, by the end of the 20th day of incubation, almost no dead cells could be found in PE-containing cultures. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The IR spectra of weathered PE indicate chain scission ( $=C-H$  bending,  $905\text{ cm}^{-1}$ ) and carbonyl formation ( $C=O$  stretching,  $1715\text{ cm}^{-1}$ ), suggesting two possible photodegradation mechanisms: Norrish type I and Norrish type II reactions [11,23]. Oxidized PE ( $R-(CH=O)-R$ ) undergoes the Norrish type I reaction to produce carbonyl and alkyl makro-radicals after the homolytic scission of PE's carbon skeleton. Since FTIR spectroscopy cannot detect radicals, a peak at  $1715\text{ cm}^{-1}$  related to carbonyl is found. However, carbonyl and alkyl makro-radicals may stabilize as carboxylic acid ( $1715\text{ cm}^{-1}$ ) and alcohol ( $1000-1150\text{ cm}^{-1}$ ) respectively following

interaction with  $OH^-$  from water molecules. Alkyl radicals may also be converted into vinyl radicals after the abstraction of a hydrogen from the end  $CH_2$  group, resulting in the observed terminal double bond at  $905\text{ cm}^{-1}$ . Alternatively, the peaks at  $905\text{ cm}^{-1}$  and  $1715\text{ cm}^{-1}$  may also indicate the occurrence of an additional mechanism: Norrish type II reaction, which results in the simultaneous formation of carbonyl and vinyl groups from the heterolytic scission of PE [11]. Since weathered PE was exposed not only to UV irradiation but also to many other chemical and physical factors related to the weathering process (e.g. wide temperature



**Fig. 2.** Cellular adhesion and viability of *Comamonas* sp., *Delftia* sp., and *Stenotrophomonas* sp. on the surface of PE film (top) and their growth in nutrient broth (bottom) after 90 days of culture in minimal synthetic medium with PE as the sole carbon source. Top panel: live cells (green), dead cells (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 3.** (a) IR spectra of PE film incubated with *Comamonas* sp. (blue), *Delftia* sp. (magenta), or *Stenotrophomonas* sp. (green) for 90 days. The positive control was PE exposed to weather for 90 days (light orange), and the negative control was the untreated PE (red). Absorption peaks corresponding to the main chemical modifications are highlighted. (b) Comparison of carbonyl, double bond, and terminal double bond indices among treated and untreated PE film samples (mean  $\pm$  SE,  $n = 3$ ). \*No significant difference from untreated PE ( $P > 0.05$ ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

range, humidity shifts, mechanical wear and water), additional chemical mechanisms are expected to be involved in its degradation/photodegradation.

Biotically treated films showed a distinct absorption pattern as a consequence of the chemical environment created in the culture media by the microbial metabolism due to the action of bacterial transmembrane transport, excretion and secretion systems. PE film incubated with bacteria showed evidence of alcohol, ether, acid and ester formation, as indicated by the presence of alkoxy and acyl C–O stretching bands (Fig. 3a) [45]. The hydroxylation inferred from the peak at 1000–1150  $\text{cm}^{-1}$  related to alkoxy group formation (C–O) provides evidence for PE hydrolysis. Another possible explanation for C–O formation is the stabilization of peroxy radicals. As stated by Massey et al., a weak dissociation enthalpy for the hydroperoxide O–O bond (R–O–OH) suggests that the 1000–1150  $\text{cm}^{-1}$  peaks do not represent peroxy groups [36]. Although hydroperoxides are well-described products of the oxidative degradation of PE [11,39,40], they decompose, leading to the formation of hydroxyl and carbonyl groups as well as carbonyl radicals, all related to chemical species detected on the IR spectra of treated PE in this study.

According to previous reports [11,37,40,46], the intense peak at 1640  $\text{cm}^{-1}$  represents C=C stretching. It is not clear how microbes induce vinylenes formation (R–C=C–R) in PE film, but this modification appears to reflect a relevant step of the biodegradation process and indicates the occurrence of chain scission [37]. We speculate that the complex chemical environment created by bacterial metabolism along with the reagents from culture media may induce radical (R $^{\bullet}$ ) formation due to charge-transfer complexes, and one of the possible configurations is a vinylenes group [44]. Instead, vinylenes formation may also result from dehydrogenation of PE molecules [45].

Intriguingly, an unprecedented extensive nitro group formation (N–O) occurred exclusively in all biodegraded samples, as demonstrated by the presence of high peaks at 1500–1600  $\text{cm}^{-1}$ . The same effect was previously described as a result of the abiotic treatment of PE by its exposure to a nitric oxide atmosphere [37]. Since the three genera have known nitrification and/or denitrification abilities [47–50], we speculate that nitric oxide (NO) is synthesized by the microbes and diffuses through the outer membrane to its interface with PE. In the extracellular environment, NO is oxidized by atmospheric O $_2$  to the reactive nitrogen dioxide (2NO + O $_2$   $\rightarrow$  \*NO $_2$ ), which then interacts with activated PE (R $^{\bullet}$ ), resulting in nitro formation (C–O–N=O) [37]. Indeed, the genomes of our *Comamonas*, *Delftia* and *Stenotrophomonas* isolates indicate they have denitrification abilities (data not shown). We found that all the strains were capable of synthesizing NO $_2^-$  during incubation with PE, which was quantified after its coupling with Griess reagent (0.5% sulphanilamide in 2.4 M HCl and 0.3% naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride in 1.2 M HCl) (data not shown). Furthermore, nitrite concentrations in the supernatants of PE-containing cultures were approximately four times higher than the ones from carbon-free cultures. The production of nitrite, while ammonia was the sole provided source of nitrogen, suggests these microbes are also capable of heterotrophic nitrification – aerobic denitrification. Since NO is a by-product of nitrification (conversion of NH $_4^+$  to nitrate – NO $_3^-$ ), it is plausible that heterotrophic nitrification also releases NO, even though the genes and enzymes related to this process are still unidentified [51,52]. Moreover, NO is also a product of chemodenitrification, the chemical decomposition of nitrite (NO $_2^-$ ) as a consequence of the presence of reduced metals such as ferrous iron (Fe $^{2+}$ ) [52]. Considering the media composition, it is likely that this mechanism does take place in the described cultures. Because of the intensity of these peaks in Fig. 3, the set of reactions that lead to this chemical modification might represent main degradation mechanisms of these

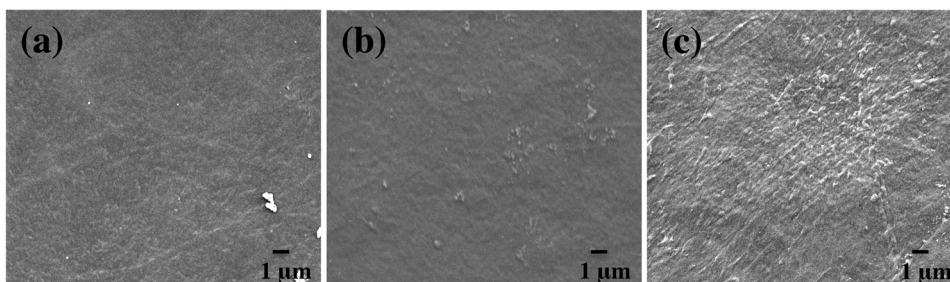
specific bacterial strains, especially since this mechanism would lead to decreased hydrophobicity and molecular weight. Considering further mechanistic analyses are beyond the scope of this work, additional research to explore this biochemical novelty will be presented in future works.

Additionally, we calculated the carbonyl (1715  $\text{cm}^{-1}$ ), terminal double bond (905  $\text{cm}^{-1}$ ) and internal double bond (1640  $\text{cm}^{-1}$ ) indices (Fig. 3b and Table S2), which correspond to the concentrations of each of these chemical species over the polymer [11]. They also account for inferences and estimations about oxidation, vinylenes formation and chain scission (Table S2) [11]. Fig. 3b shows that biodegradation resulted in a remarkable increase in double bond formation of up to 3.4-fold, whereas the smaller increase in carbonyl and terminal double bond indices indicate the formation and the subsequent microbial assimilation of the oxidized and lower molecular weight fragments. Besides, the substantial vinylenes formation confirms PE chemical modification by bacterial metabolism. These data also highlight that biotic and abiotic degradations occur by different mechanisms.

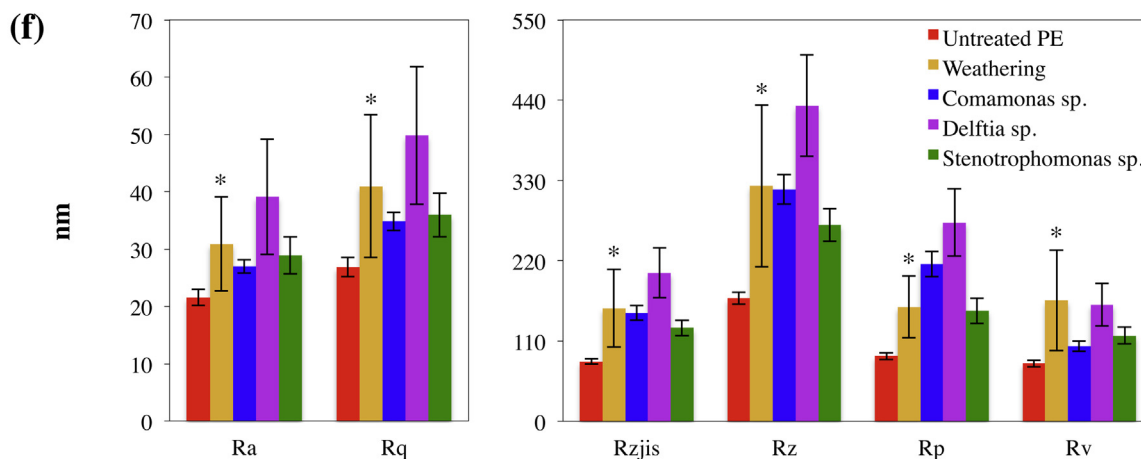
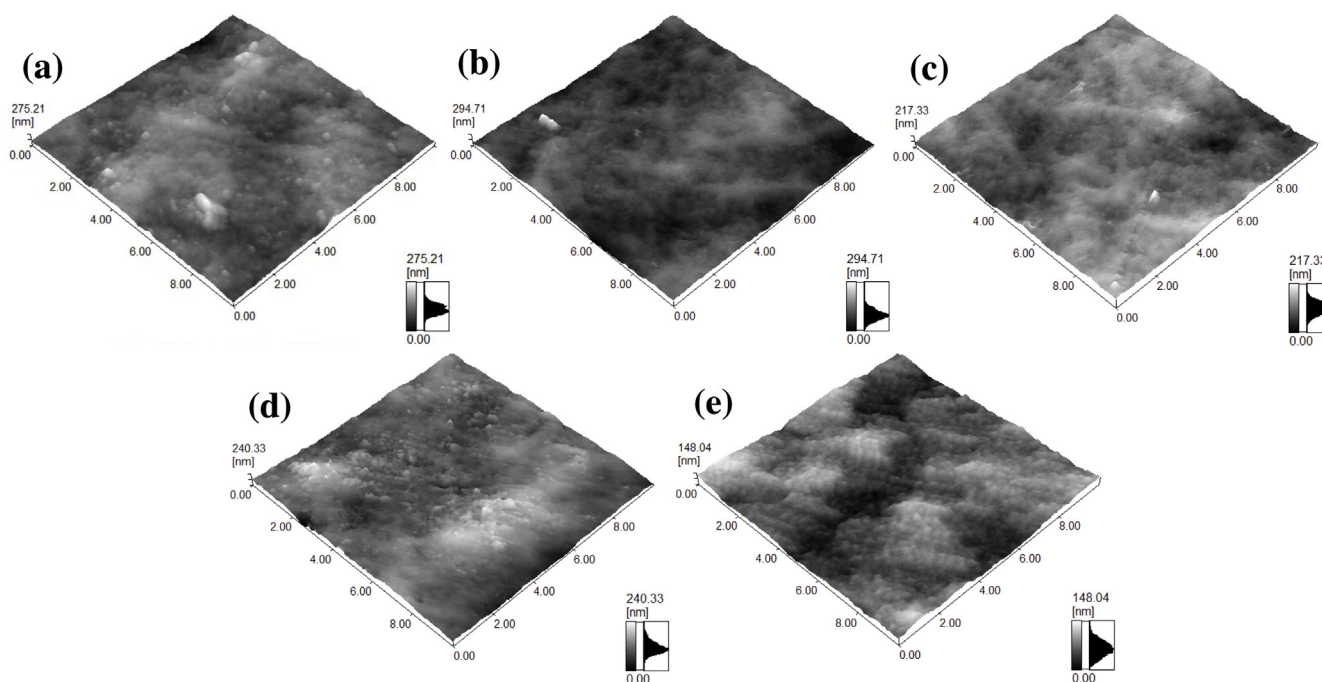
Microscale analysis of surface topography revealed disruption of the surface of PE film after microbial treatment (Fig. 4c) contrasting to the smooth and flat surface of untreated PE film (Fig. 4a). As emphasized by the micrographs, the surface disruption and deterioration caused by the biotic treatment (Fig. 4c) was far more evident than that caused by abiotic treatment (Fig. 4b). This may be due to the action of transmembrane or extracellular enzymes, which break down PE reducing its molecular weight and modifying its surface. In fact, different hydrolases and oxidases were found in the genomes of these strains (data not shown).

Further topographic analysis by AFM also indicates considerable modification after biotic and abiotic treatment. Compared with the wavy nanometric surface of the untreated PE film (Fig. 5e), PE incubated with bacterial isolates (Fig. 5a–c) or exposed to weather (Fig. 5d) for 90 days appeared clearly abraded. Nanoscale surface analyses suggested the formation of deep cavities after mainly the biotic treatments. The nanoroughness parameters (Fig. 5f) of all PE film samples incubated with bacteria differed significantly compared to the untreated film. Topographic changes suggesting biodegradation include substantially higher values for Ra (untreated, 21.5  $\pm$  1.4 nm; biotic treatment,  $\leq$ 39.2  $\pm$  10.1 nm), Rq (untreated, 26.8  $\pm$  1.6 nm; biotic treatment,  $\leq$ 49.8  $\pm$  11.9 nm), Rz/JIS (untreated, 82.0  $\pm$  3.9 nm; biotic treatment,  $\leq$ 203.5  $\pm$  34.2 nm), and Rz (untreated, 168.5  $\pm$  8.2 nm; biotic treatment,  $\leq$ 432.5  $\pm$  69.6). The large peak-to-peak amplitude (Rz) values for both biotic and abiotic treatments indicate the formation of broad and deep cavities in treated PE film samples. Besides, Rp and Rv values are complementary to Rz, supporting this result. Microbial fragmentation of PE by enzymatic action is a plausible mechanism for topography changes in PE treated with bacteria, whereas in abiotic treatment these changes are due to cross-linking and embrittlement.

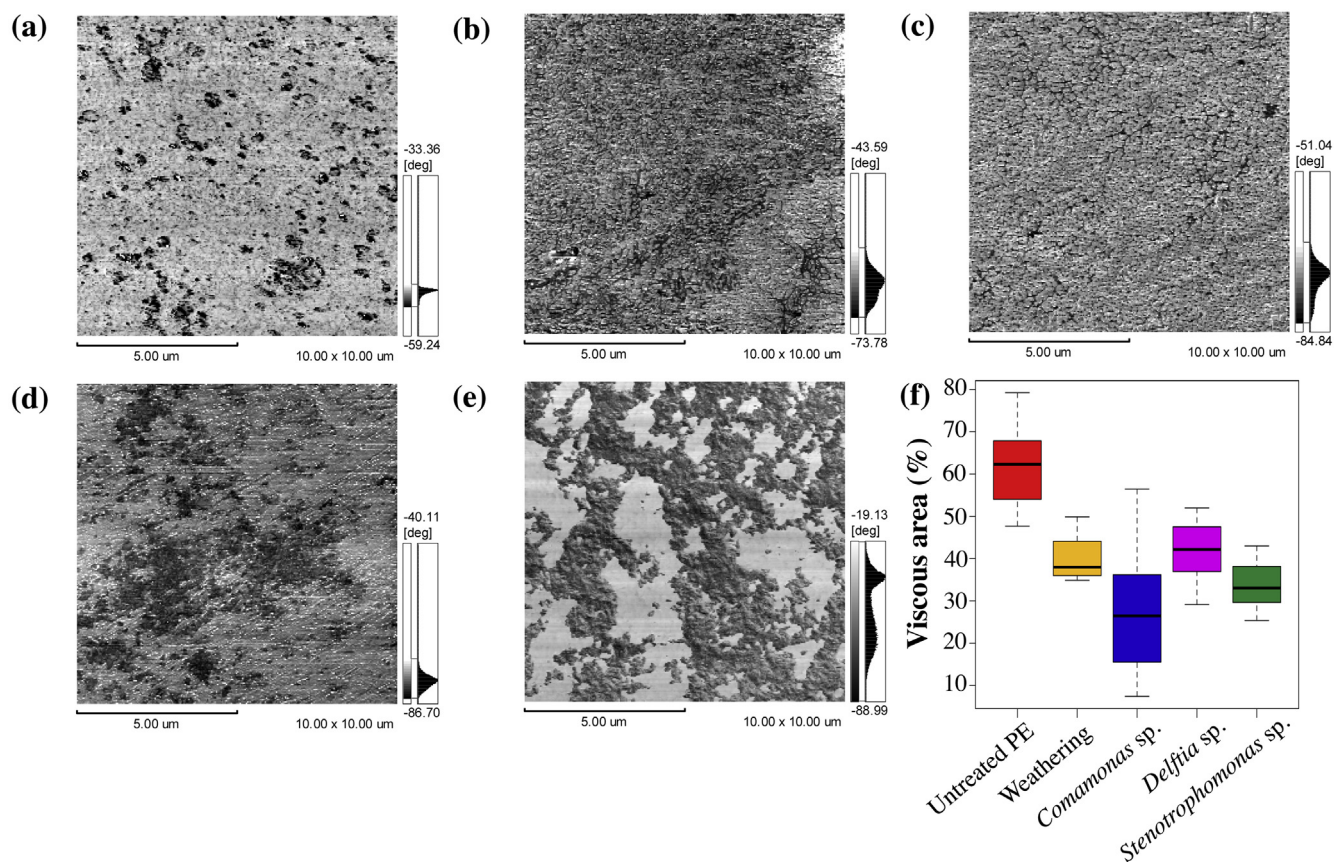
Phase imaging of AFM (Fig. 6) allowed the evaluation of the viscoelastic behavior of treated and untreated PE, which is closely related to molecular weight [53]. Polymers behave as both fluids and solids; thus, investigating physical properties such as viscoelasticity can provide valuable information about molecular weight and size changes [54]. In untreated PE, the relative contributions of viscous and elastic components were quite similar (Fig. 6e). Quantitative viscoelasticity data (Fig. 6f) show that viscous regions comprise approximately 59.9  $\pm$  10.4% (mean  $\pm$  SE) of the untreated PE film, 39.9  $\pm$  5.9% of the weathered PE film, and up to 31.9  $\pm$  4.9% (mean  $\pm$  SE) of the biodegraded PE, which represents a 46.7% decrease after biotic treatment. As reported, degradation changes the average molecular weight of PE [45,53,55]. PE biodegradation decreases its viscous fraction area within the polymer, which is related to smaller carbon chains, since microbial enzymes break PE allowing the assimilation of the oxidized and



**Fig. 4.** Scanning electron microscopy of (a) untreated PE film, (b) PE film exposed to weather for 90 days, and (c) PE film incubated with bacteria over 90 days. Noticeable surface disruption can be observed after incubation with bacteria, suggesting biodegradation has occurred.



**Fig. 5.** Nanometric topography of PE film incubated with (a) *Comamonas* sp., (b) *Delftia* sp., or (c) *Stenotrophomonas* sp. for 90 days. (d) PE film exposed to weather for 90 days served as a positive control, and (e) untreated PE film as a negative control. Sidebars represent amplitude distribution and maximum amplitude (nm) within a 100- $\mu\text{m}^2$  surface. (f) Roughness parameters (mean  $\pm$  SE,  $n = 10$ ) of untreated PE (red), weathered PE (light orange), and PE incubated with *Comamonas* sp. (blue), *Delftia* sp. (magenta), and *Stenotrophomonas* sp. (green): average roughness (Ra), root mean square roughness (Rq), Japanese industrial standard average roughness (RzJIS), average height (Rz), maximum peak height (Rp), and maximum valley depth (Rv). \*No significant difference from untreated PE ( $P > 0.05$ ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 6.** Viscoelastic behavior of PE films incubated with (a) *Comamonas* sp., (b) *Delftia* sp., or (c) *Stenotrophomonas* sp. for 90 days, as determined by phase imaging. (d) PE film exposed to weather for 90 days served as a positive control, and (e) untreated PE film as a negative control. Elastic areas are light, and viscous areas are dark. Sidebars indicate the phase angle of probe oscillation. (f) Viscous area (%) of the PE film after microbial treatment (blue, magenta, and green), exposure to weather (light orange), or no treatment (red). All areas showed significant difference from untreated PE ( $P < 0.05$ ; each group,  $n = 10$ ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

lower molecular weight fragments. The simultaneous production and consumption of these lower molecular weight fragments by bacteria would ultimately increase the average molecular weight of the material, since smaller fragments are being assimilated, thereby increasing the proportion of the elastic regions (Fig. 6a–c) compared with untreated PE (Fig. 6e).

Although weathering also decreases the molecular weight of polymers, a decrease in the proportion of viscous regions of PE was observed (Fig. 6d). This result is due to crosslinking provoked by radicals produced during degradation, which increase the average molecular weight and decrease chain flexibility [43,56], thus enhancing the elastic area in the weathered PE film [57]. In addition, the phase angle related to the advance or delay of the wave phase (Fig. 6a–e) of cantilever oscillation tended to shift from the broad bimodal distribution of the untreated PE control to a sharp unimodal distribution after both biotic or abiotic treatment, supporting the quantitative viscoelasticity data [56].

Ultimately, Raman spectroscopy was used to estimate proportions of the crystalline phase ( $\alpha_c$ ), amorphous phase ( $\alpha_a$ ), and interphase ( $\alpha_b$ ) of the PE samples, since  $\alpha_a + \alpha_b + \alpha_c = 1$  [25]. Phase fractions can be calculated from the integral intensities of specific absorption peaks in spectral regions related to C–C stretching ( $1062\text{--}1129\text{ cm}^{-1}$ ) and twisting ( $1250\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ ) and methylene bending ( $1390\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$ ) vibrations [13,25]. Peaks at  $1416\text{ cm}^{-1}$  and  $1080\text{ cm}^{-1}$  were used to estimate crystalline and amorphous fractions, respectively. The twisting region served as an internal standard, since it does not respond to conformational changes, and

the integral intensities of its absorption peaks are proportional to the sum of all phases. Based on the mass fractions of the fully crystalline ( $\alpha_c = 1$ : integral intensity of  $1416\text{ cm}^{-1}$  band = 0.46) and totally amorphous samples ( $\alpha_a = 1$ : integral intensity of  $1080\text{ cm}^{-1}$  band = 0.79), whereas taking the internal standard into account, it was possible to calculate  $\alpha_a$ ,  $\alpha_b$ , and  $\alpha_c$ .

The results showed that the amorphous fraction increased in all treated PE films, but the interphase fraction was the most strongly affected (Fig. S8) [13]. Only a small increase in crystalline content was observed after weathering in contrast to the great one expected as a consequence to the break down of PE into smaller alkanes, which would accumulate within the material. This effect is also a consequence of cross-linking, which compensates for the decrease in molecular weight due to abiotic degradation [43] and is consistent with the viscoelasticity findings. PE film incubated with *Comamonas* sp. and *Delftia* sp. showed a decrease in crystallinity due to the assimilation of the lower molecular weight fragments, produced by the action of the microbial enzymes, that constitute the crystalline fraction. In contrast, PE film incubated with *Stenotrophomonas* sp. showed a considerable increase in the crystalline fraction, indicating its potential to break the long alkane chain. However, it remains unclear whether this strain breaks PE more efficiently or consumes the smaller alkanes slower. A proposed summary of biotic and abiotic degradation effects to PE is presented in Fig. S9.

Overall, *Delftia* sp. appears to have the highest degradation capability according to our results, followed by *Comamonas* sp.



and *Stenotrophomonas* sp. FTIR data exposed the distinct strategies employed by the strains to degrade PE, which is evidenced by differences in wave numbers and intensities of the absorption peaks (Fig. 3a). However, index values (Fig. 3b) suggest that *Delftia* sp. induces the greatest chemical changes to PE under the described conditions. Nanoroughness parameters (Fig. 5f) suggest that *Delftia* sp. also damages the surface of PE in the highest scale when compared to *Comamonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp. Although *Comamonas* had the most substantial reduction on the viscous area (Fig. 6f), the higher viscous area induced by the treatment with *Delftia* may be a consequence of its greater effectiveness in breaking PE's carbon chain. In addition, the apparent smaller impact of *Delftia* to both amorphous and crystallized fractions (Fig. S8), which is comparable to abiotic degradation, may also represent its greater potential to break down PE and, then, assimilate its resulting fragments.

### 3.5. Research outcome and future directions

In this study we set a methodological framework that allowed the isolation and identification of nine novel bacterial strains capable of degrade PE of 191.000 g mol<sup>-1</sup>. Interestingly, these microbes are metabolically active in mild conditions, such as minimal media, atmospheric O<sub>2</sub> content, wide range of pH and room temperature, and do not require any specific handling or additional nutrients. This ultimately reduces the costs of the industrial settings needed for a future practical approach of the biodegradation of plastic waste, besides supporting the applicability of this process to different countries. Further, these microbes are capable of degrading untreated PE, which dispenses the need for including pretreatments in industrial plants. Still, future studies are needed to determine the specific molecular mechanisms underlying PE biodegradation by these bacteria. Understanding these mechanisms would help uncover metabolic pathways involved in the metabolism of plastics and related products, characterizing the different stages of biodegradation at a metabolic level. This would contribute to the development of management strategies for post-consume plastics and industrial-scale processes as well as applications for the biodegradation products of PE, addressing global concerns for natural environments and worldwide sustainability.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgements

The present study was funded and supported by the Brazilian funding agencies National Council of Technological and Scientific Development (CNPq, Brazil), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and Research Support Foundation of the Federal District (FAPDF, Brazil). The authors thank Mr. Ofir Korenberg and Carmel Olefins for kindly providing the PE films for this research. They also thank Dr. Sônia Bão (University of Brasilia, Brazil) and Mr. Elvio Botelho (Brazilian Federal Police Department, Brazil) for authorizing use of the scanning electron microscope and infrared spectroscopy, respectively.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.037>.

### References

- [1] D.S. Green, B. Boots, D.J. Blockley, C. Rocha, R. Thompson, Impacts of discarded plastic bags on marine assemblages and ecosystem functioning, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 5380–5389.
- [2] R.C. Thompson, C.J. Moore, F.S. vom Saal, S.H. Swan, Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends, *Philos. Trans. R. Soc. B* 364 (2009) 2153–2166.
- [3] A. Sivan, New perspectives in plastic biodegradation, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22 (2011) 422–426.
- [4] A.A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, Biological degradation of plastics: a comprehensive review, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 246–265.
- [5] R.C. Thompson, S.H. Swan, C.J. Moore, F.S. vom Saal, Our plastic age, *Philos. Trans. R. Soc. B* 364 (2009) 1973–1976.
- [6] A. Ammal, S. Bateman, K. Dean, E. Petinakis, P. Sangwan, S. Wong, Q. Yuan, L. Yu, C. Patrick, K.H. Leong, An overview of degradable and biodegradable polyolefins, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 1015–1049.
- [7] D. Briassoulis, E. Babou, M. Hiskakis, I. Kyrikou, Analysis of long-term degradation behaviour of polyethylene mulching films with pro-oxidants under real cultivation and soil burial conditions, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 2584–2598.
- [8] N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, J.-E.E. Nava-Saucedo, Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques, *Chemosphere* 73 (2008) 429–442.
- [9] A.C. Albertsson, S. Karlsson, The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene, *Prog. Polym. Sci.* 15 (1990) 177–192.
- [10] H. Hueck, Criteria for the assessment of the biodegradability of polymers, *Int. Biodeterior. Bull.* 10 (3) (1974) 87–90.
- [11] A.C. Albertsson, S.O. Andersson, The mechanism of biodegradation of polyethylene, *Polym. Degrad. Stab.* 18 (1987) 73–87.
- [12] L.H. Sperling, Introduction to physical polymer science, *Introduction to Physical Polymer Science* (2005).
- [13] F. Rull, A.C. Prieto, J.M. Casado, F. Sobron, Estimation of crystallinity in polyethylene by Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 24 (1993) 545–550.
- [14] J. Yang, Y. Yang, W. Wu, J. Zhao, L. Jiang, Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 13776–13784.
- [15] C.M. Fraser, J.A. Eisen, S.L. Salzberg, Microbial genome sequencing, *Nature* 406 (2000) 799–803.
- [16] S.K. Sen, S. Raut, Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): a review, *J. Environ. Chem. Eng.* 3 (2015) 462–473, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.01.003>.
- [17] J.F. Araujo, A.P. de Castro, M.M. Costa, R.C. Togawa, G.J.P. Júnior, B.F. Quirino, M.M. Bustamante, L. Williamson, J. Handelsman, R.H. Krüger, Characterization of soil bacterial assemblages in Brazilian savanna-like vegetation reveals acidobacteria dominance, *Microb. Ecol.* 64 (2012) 760–770.
- [18] B.F. Quirino, G.J. Pappas, A.C. Tagliaferro, R.G. Collevatti, E.L. Neto, M.R.S. da Silva, M.M. Bustamante, R.H. Krüger, Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation, *Microbiol. Res.* 164 (2009) 59–70.
- [19] A. Suhet, J. Peres, M. Vargas, W. Goedert, Solos dos Cerrados: tecnologias e estratégias de manejo, first ed., Nobel, Brasilia, 1986.
- [20] T.G. Pridham, D. Gottlieb, The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetales* as an aid for species determination, *J. Bacteriol.* 56 (1948) 107–114.
- [21] I. Gilan, A. Sivan, Extracellular DNA plays an important structural role in the biofilm of the plastic degrading actinomycete *Rhodococcus ruber*, *Adv. Microbiol.* 03 (2013) 543–551.
- [22] P. Chomczynski, N. Sacchi, The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 581–585.
- [23] I.G. Orr, Y. Hadar, A. Sivan, Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65 (2004) 97–104.
- [24] A. Sivan, M. Szanto, V. Pavlov, Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 346–352.
- [25] G.R. Strobl, W. Hagedorn, Raman spectroscopic method for determining the crystallinity of polyethylene, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 16 (1978) 1181–1193.
- [26] E.F. Barbosa, L.P. Silva, Qualitative and quantitative topographical surface investigation and solvent effects on internal surface of polypropylene tubes, *Surf. Interface Anal.* 44 (2012) 389–394.
- [27] D.J. Lane, 16S/23S rRNA sequencing, in: E. Stackebrandt, M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, New York, NY, 2016, pp. 115–175.
- [28] M.A. Larkin, G. Blackshields, N. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, Clustal W and clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23 (2007) 2947–2948.
- [29] P.D. Schloss, S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 7537–7541.
- [30] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar, MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30 (2013) 2725–2729.

- [31] A. Pereira, M.R. Sartori, B. Quirino, B.M. da Cunha, R. Krüger, Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical Savanna) soils, *PLoS One* 11 (2016) e0148785.
- [32] V.S. Cerqueira, E.B. Hollenbach, F. Maboni, F.A. Camargo, R.P. Maria do Carmo, F.M. Bento, Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation, *World J. Microb. Biotechnol.* 28 (2012) 1203–1222.
- [33] M. Yoon, H. Jeon, Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell, *J. Biorem. Biodegrad.* 03 (2012) 1–8.
- [34] M. Koutny, P. Amato, M. Muchova, J. Ruzicka, A.-M. Delort, Soil bacterial strains able to grow on the surface of oxidized polyethylene film containing prooxidant additives, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63 (2009) 354–357.
- [35] M. Santo, R. Weitsman, A. Sivan, The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84 (2013) 204–210.
- [36] S. Massey, A. Adnot, A. Rjeb, Action of water in the degradation of low-density polyethylene studied by X-ray photoelectron spectroscopy, *Express Polym. Lett.* 8 (2007) 506–511.
- [37] T. Ogiwara, Oxidative degradation of polyethylene in nitrogen dioxide, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 36 (1963) 58–63.
- [38] T. Corrales, F. Catalina, C. Peinado, N.S. Allen, Photooxidative and thermal degradation of polyethylenes: interrelationship by chemiluminescence, thermal gravimetric analysis and FTIR data, *J. Photochem. Photobiol. A* 147 (2002) 213–224.
- [39] F. Gugumus, Re-examination of the thermal oxidation reactions of polymers 2. Thermal oxidation of polyethylene, *Polym. Degrad. Stab.* 76 (2002) 329–340.
- [40] M. Gardette, A. Perthue, J.L. Gardette, T. Janecska, Photo- and thermal-oxidation of polyethylene: comparison of mechanisms and influence of unsaturation content, *Polym. Degrad. Stab.* 98 (2013) 2383–2390.
- [41] M.V. Kirillova, A.M. Kirillov, M.L. Kuznetsov, J.A.L. Silva, J.J.R. Frausto da Silva, A.J.L. Pombeiro, Alkanes to carboxylic acids in aqueous medium: metal-free and metal-promoted highly efficient and mild conversions, *Chem. Commun.* (2009) 2353–2355.
- [42] A.E. Shilov, G.B. Shul'pin, Activation of CH bonds by metal complexes, *Chem. Rev.* 97 (1997) 2879–2932.
- [43] A. Szép, P. Anna, I. Csontos, G. Marosi, S. Matkó, Micro Raman and atomic force microscopy analysis of naturally aged polyethylene, *Polym. Degrad. Stab.* 85 (2004) 1023–1027.
- [44] A. Hoffman, *Polymeric Materials Encyclopedia*, J.C. Salamone, 1996.
- [45] H.J. Jeon, M.N. Kim, Isolation of a thermophilic bacterium capable of low-molecular-weight polyethylene degradation, *Biodegradation* 24 (2013) 89–98.
- [46] J.P. Harrison, M. Schratzberger, M. Sapp, M.A. Osborn, Rapid bacterial colonization of low-density polyethylene microplastics in coastal sediment microcosms, *BMC Microbiol.* 14 (2014) 232.
- [47] B. Ji, K. Yang, L. Zhu, Y. Jiang, H. Wang, J. Zhou, H. Zhang, Aerobic denitrification: a review of important advances of the last 30 years, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 20 (2015) 643–651.
- [48] H. Zhang, S. Zhou, Screening and cultivation of oligotrophic aerobic denitrifying bacteria, in: *Water Pollution and Water Quality Control of Selected Chinese Reservoir Basins*, Springer, 2016, 2016, pp. 451–473.
- [49] M.I. Bellini, L. Gutiérrez, S. Tarlera, A.F. Scavino, Isolation and functional analysis of denitrifiers in an aquifer with high potential for denitrification, *Syst. Appl. Microbiol.* 36 (2013) 505–516.
- [50] T. Matsuno, S. Horii, T. Sato, Y. Matsumiya, M. Kubo, Analysis of nitrification in agricultural soil and improvement of nitrogen circulation with autotrophic ammonia-oxidizing bacteria, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169 (2013) 795–809.
- [51] S. Banerjee, S.D. Siciliano, Factors driving potential ammonia oxidation in Canadian arctic ecosystems: does spatial scale matter? *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 346–353.
- [52] K. Pilegaard, Processes regulating nitric oxide emissions from soils, *Philos. Trans. R. Soc. B* 368 (2013) 20130126.
- [53] W.F. Su, Principles of polymer design and synthesis, in: *Lecture Notes in Chemistry*, first ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2013.
- [54] Charles E. Carraher Jr., *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry*, sixth edition, Marcel Dekker, New York, 2005.
- [55] A. Charlesby, E. Von Arnim, L. Callaghan, Effect of crystallinity on radiation effects in polyethylene, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 3 (1958) 226–231.
- [56] S.N. Magonov, V. Elings, M.H. Whangbo, Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy, *Surf. Sci.* 375 (1997) L385–L391.
- [57] P. Nanda, S.K. De, S. Manna, U. De, S. Tarafdar, Effect of gamma irradiation on a polymer electrolyte: variation in crystallinity, viscosity and ion-conductivity with dose, *Nucl. Instrum. Methods B* 268 (2010) 73–78.