

Beatriz Balthazar Abdon

**PRODUÇÃO DE ESTERASES, LIPASES E BIOEMULSIFICANTES PELA
PLASTISFERA DA ENSEADA DE BOM JESUS, ILHA DO FUNDÃO,
BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO/2024**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Marinella Silva Laport e coorientação da Ma. Anna Luiza Bauer Canellas

CIP - Catalogação na Publicação

A369p Abdon, Beatriz
 PRODUÇÃO DE ESTERASES, LIPASES E
 BIOEMULSIFICANTES PELA PLASTISFERA DA ENSEADA DE
 BOM JESUS, ILHA DO FUNDÃO, BAÍA DE GUANABARA, RIO
 DE JANEIRO / Beatriz Abdon. -- Rio de Janeiro, 2024.
 87 f.

 Orientadora: Marinella Silva Laport.
 Coorientadora: Anna Luiza Bauer Canellas.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2024.

 1. biorremediação. 2. enzimas. 3. plastisfera. 4.
 potencial biotecnológico. 5. esterases. I. Silva
 Laport, Marinella, orient. II. Bauer Canellas, Anna
 Luiza, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): BEATRIZ BALTAZAR ABDON

DRE: 121069735

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Ana Maria Mazotto (Presidente da Banca)
 Prof. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira
 MSc. Nathália Ferreira
 Prof. Márcia Giambiagi de Marval (Suplente)

Título da Monografia: "Produção de esterase, lipases e bioemulsificantes pela plastisfera da Enseada de Bom Jesus, Ilha do Fundão, Baía de Guanabara, Rio de Janeiro".

Local: Sala de seminários - Departamento de Microbiologia Médica (bloco andar), no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 13 de dezembro de 2024 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13. de dezembro... de 2024.

NOTA:

Banca Examinadora:

10

Ana Maria M de Almeida

Prof. Ana Maria Mazotto (Presidente)

10

Bruno Francisco Rodrigues de Oliveira

Prof. Bruno Francisco Rodrigues de Oliveira

10

Nathália Ferreira dos Santos

MSc. Nathália Ferreira

Prof. Márcia Giambiagi de Marval (Suplente)

Beatriz Baltazar Abdon

Beatriz Baltazar Abdon

Aluno(a):

Orientador(a)

(e coorientador):

Marinella Silva Laport e Anna Luiza Bauer Canellas

Profa. Marinella Silva Laport e Anna Luiza Bauer Canellas

Coordenadora de

TCC:

Marinella Silva Laport

Profa. Marinella Silva Laport

Aos meus pais, Andréa Maria e Luiz Fernando.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio da minha família. Aos meus pais, Luiz e Andréa, que sempre me apoiaram nos estudos e me ajudaram e ensinaram a estudar desde a época da escola. Também agradeço aos esforços feitos antes de eu nascer e durante meu crescimento que me permitiram "só estudar".

Agradeço imensamente às minhas orientadoras Anna Luiza Bauer Canellas e Marinella Silva Laport. À professora Marinella especialmente por me acolher no laboratório e por saber a melhor forma de orientar cada aluno; pelas conversas e esclarecimento de dúvidas sobre o futuro da minha pesquisa e sobre o que eu vou fazer no futuro. Pela compreensão, paciência e por ser uma fonte de inspiração.

À Anna Luiza. Anna, poder aprender e trabalhar com você é uma honra. Sua dedicação e seu gosto pela pesquisa inspiram quem chega perto. O trabalho que você faz no laboratório e na elaboração de artigos, aulas, apresentações (...) é uma forma de arte, sinto como se estivesse vendo um quadro sendo pintado ao vivo. Obrigada pelas explicações e pelo apoio.

Obrigada a todos os integrantes do Laboratório de Bacteriologia Molecular e Marinha (BMM14), que com certeza já me ajudaram com dúvidas científicas e alegraram meu dia com conversas e piadas (principalmente pós almoço). Cada um de vocês me inspira de alguma forma.

Sou grata pela Cacau, salsichinha ex-integrante da família, e ao Simba, atual integrante da família, que sempre alegram a casa e o meu coração.

Agradeço aos meus amigos, principalmente Livia e Carol, que sempre me ajudam a recarregar as energias quando estamos juntos. Ao meu amor, Arthur, pelo apoio e por me trazer conforto em momentos de estresse.

Também agradeço à universidade, seus professores e funcionários por cuidarem da UFRJ e garantirem que os três pilares, ensino, pesquisa e extensão, sejam colocados em prática. Ao apoio financeiro das instituições de fomento, principalmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

“Acordei com a ansiedade dos grandes dias”
(Carla Madeira – A Natureza da Mordida)

RESUMO

BEATRIZ BALTHAZAR ABDON

**PRODUÇÃO DE ESTERASES, LIPASES E BIOEMULSIFICANTES PELA
PLASTISFERA DA ENSEADA DE BOM JESUS, ILHA DO FUNDÃO,
BAÍA DE GUANABARA, RIO DE JANEIRO**

**Orientador: Profa. Marinella Silva Laport
Coorientador: Profa. Anna Luiza Bauer Canellas**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Plastisfera é a comunidade microbiana associada ao plástico, os quais são frequentemente encontrados em ambientes aquáticos poluídos, como a Enseada de Bom Jesus (EBJ). Apesar dos prejuízos da poluição por plásticos no ambiente, a qual exerce pressão seletiva sobre o microbioma local, pouco se sabe sobre o potencial biotecnológico da sua plastisfera. Este estudo visou analisar a produção de esterases, lipases, poliesterases e substâncias tensoativas produzidas por bactérias da plastisfera da EBJ. Foram coletadas 11 amostras plásticas nas águas da EBJ e em sua orla, incluindo polietileno de alta e baixa densidade, identificadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Dessas amostras, foram isoladas 245 estirpes, identificadas por MALDI-TOF. O gênero mais frequente, de 18 distintos, foi *Vibrio* (18,4%), seguido por *Aeromonas* (13%). As estirpes foram inoculadas em meio Sierra com adição dos substratos Tween 20 para avaliação da produção de esterases. O ensaio foi interpretado pela presença de um halo de precipitação ao redor da colônia após 48h a 27°C e o Índice Enzimático (IE) foi calculado, sendo um $IE \geq 2,0$, característico de uma estirpe com potencial enzimático. A partir das estirpes positivas para esterase ($n = 75$; 30,6%), foram conduzidos os demais experimentos. As estirpes esterase-positivas foram analisadas para a produção de lipase conforme descrito para esterase, apenas trocando o substrato para tween 80. Assim, 7,3% também foram positivas para lipase (13/75). A triagem de bioemulsificantes foi feita pelo índice de emulsificação em 24h (E_{24}) em óleo mineral a partir do cultivo em meio Luria-Bertani (LB) e mínimo (MM), onde 4% (3/75) e 20% (15/75) das estirpes foram positivas, respectivamente. A produção de poliesterases foi verificada em meio LB e MM acrescidos de 1% de tributirina (TBT) ou policaprolactona (PCL). Dentre 69 estirpes testadas, 10 foram positivas no MM+TBT e dentre 61 testadas, 5 foram positivas em MM+PCL. O MM apresentou-se mais vantajoso para a triagem destas enzimas em relação ao LB. Os sobrenadantes dessas cinco estirpes que apresentaram atividade enzimática em MM+PCL foram avaliados quanto à termoestabilidade e a estabilidade a diferentes pHs. Nesta análise, *Vibrio fluvialis* PVC-7 se destacou pela manutenção da atividade enzimática nas temperaturas de 40 a 65 °C. Esses cinco sobrenadantes foram liofilizados, filtrados e concentrados, e apenas a estirpe *Shewanella baltica* PT-L-4 manteve sua atividade enzimática. Os cinco sobrenadantes

também foram precipitados com sulfato de amônio (40% e 60%) e analisados por eletroforese sem condições desnaturantes e zimograma. Observaram-se bandas no gel de poliacrilamida, indicando a separação das proteínas presentes no extrato. Contudo, não foi observada atividade enzimática no zimograma. Com as culturas das cinco estirpes positivas em MM+PCL, fez-se um consórcio em microcosmos com diferentes tipos de plásticos, os quais foram monitorados por 56 dias a 27°C. Depois, os plásticos foram avaliados. Contudo, não houve alteração no peso nem na superfície dos plásticos, conforme evidenciado por microscopia eletrônica de varredura. Assim, esse estudo se estabelece como um dos poucos acerca da plastisfera da EBJ e evidencia-a como uma fonte de bioprospecção de novas soluções biotecnológicas para o plástico.

Palavras-chave: biorremediação, enzimas, plastisfera, potencial biotecnológico, esterases, lipases

ABSTRACT

BEATRIZ BALTHAZAR ABDON

**PRODUCTION OF ESTERASES LIPASES AND BIOEMULSIFIERS BY THE
PLASTISPHERE OF BOM JESUS COVE, FUNDÃO ISLAND,
GUANABARA BAY, RIO DE JANEIRO**

**Orientador: Marinella Silva Laport
Coorientador: Anna Luiza Bauer Canellas**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The plastisphere is the microbial community associated with plastic, often found in polluted aquatic environments, such as the Bom Jesus Cove (EBJ). Despite the environmental damage caused by plastic pollution, which exerts selective pressure on the local microbiome, little is known about the biotechnological potential of its plastisphere. This study aimed to analyze the production of esterases, lipases, polyesterases, and surfactants produced by bacteria from the EBJ plastisphere. Eleven plastic samples were collected from the EBJ waters and shoreline, including high and low-density polyethylene, identified by Fourier-transform infrared spectroscopy. From these samples, 245 strains were isolated and identified by MALDI-TOF. The most frequent genus, out of 18 distinct ones, was *Vibrio* (18.4%), followed by *Aeromonas* (13%). The strains were inoculated in Sierra medium with the addition of Tween 20 substrates to assess esterase production. The assay was interpreted by the presence of a precipitation halo around the colony after 48 hours at 27°C, and the Enzymatic Index (EI) was calculated, with an $EI \geq 2.0$ being characteristic of a strain with enzymatic potential. Of the strains positive for esterase ($n = 75$; 30.6%), further experiments were conducted. The esterase-positive strains were analyzed for lipase production, using the same method as for esterase, only replacing the substrate with Tween 80. Thus, 7.3% were also positive for lipase (13/75). The bioemulsifier screening was carried out by the emulsification index after 24 hours (E24) in mineral oil, from cultures grown in Luria-Bertani (LB) and minimal media (MM). In these conditions, 4% (3/75) and 20% (15/75) of the strains were positive, respectively. Polyesterase production was verified in LB and MM media supplemented with 1% tributyrin (TBT) or polycaprolactone (PCL). Of the 69 strains tested, 10 were positive in MM+TBT, and of the 61 strains tested, 5 were positive in MM+PCL. MM proved to be more advantageous for screening these enzymes compared to LB. The supernatants of these five strains that showed enzymatic activity in MM+PCL were evaluated for thermostability and stability at different pH levels. In this analysis, *Vibrio fluvialis* PVC-7 stood out for maintaining enzymatic activity at temperatures from 40 to 65°C. These five supernatants were lyophilized, filtered, and concentrated, and only the strain *Shewanella baltica* PT-L-4 retained its enzymatic activity. The supernatants were also precipitated with ammonium sulfate (40% and 60%) and analyzed by non-denaturing electrophoresis and

zymography. Bands were observed in the polyacrylamide gel, indicating protein separation in the extract. However, no enzymatic activity was observed in the zymogram. A consortium was then formed with cultures from the five positive strains in MM+PCL, in microcosms with different types of plastics, which were monitored for 56 days at 27°C. Afterward, the plastics were evaluated. However, no changes in weight or surface characteristics were observed, as evidenced by scanning electron microscopy. Thus, this study is one of the few focused on the plastisphere of the EBJ and highlights it as a source of bioprospecting for new biotechnological solutions for plastic.

Key-words: bioremediation, enzymes, plastisphere, biotechnological potential, esterases, lipases

RESUMO PARA LEIGOS

BEATRIZ BALTHAZAR ABDON

AS APARÊNCIAS ENGANAM: QUANDO O LIXO DA BAÍA DE GUANABARA VIRA FERRAMENTA DE LIMPEZA

**Orientador: Marinella Silva Laport
Coorientador: Anna Luiza Bauer Canellas**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Atualmente, pedaços de plástico podem ser encontrados em alimentos, nas águas, no solo e até mesmo no Polo Norte. Apesar de ser útil no nosso dia a dia, uma vez descartados, os plásticos demoram a “sumir” do planeta, por conta de sua resistência e durabilidade. A região da Enseada de Bom Jesus na Baía de Guanabara, é altamente poluída, inclusive por óleo e plásticos, o que atrapalha as atividades de lazer e pesca realizadas pela população. Mas você sabia que essa sujeira pode ser parte da solução para a limpeza desse lugar tão importante para a cidade do Rio de Janeiro? No nosso trabalho, nós estudamos as bactérias presentes no próprio plástico que encontramos na água e na areia da Enseada de Bom Jesus. Essas bactérias foram analisadas quanto a produção de substâncias capazes de quebrar os plásticos em pedaços menores e ajudar na limpeza do óleo. Pensando em limpar o óleo, nós investigamos a capacidade das bactérias de fazer emulsões. As emulsões são misturas entre dois líquidos que normalmente não se misturam, como água e óleo. Quando as bactérias formam emulsões, elas facilitam a mistura dos óleos em água e ajudam na degradação deles. Já as substâncias capazes de quebrar os plásticos, denominadas enzimas, aceleram o tempo de decomposição do plástico, quebrando-os em pedaços menores de forma mais rápida. No nosso trabalho, feito ao longo de dois anos e meio, observamos a presença de substâncias formadoras de emulsão e de substâncias capazes de quebrar os plásticos em pedaços menores em diferentes bactérias. Com isso, é importante ressaltar que as bactérias não causam só doenças, mas também podem ser boas para os seres humanos e o meio ambiente. Também vale lembrar que essas substâncias, por serem de origem biológica são mais sustentáveis, ou seja, são menos tóxicas que substâncias utilizadas para limpar ambientes feitas de forma totalmente sintética/artificial. Com o nosso trabalho, nós verificamos que é possível encontrar maneiras de lidar com a poluição na Enseada de Bom Jesus nos próprios plásticos que a poluem. Isso é muito importante para entendermos melhor as bactérias que ali vivem e como elas podem nos ajudar a cuidar do meio ambiente.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Localização da BG e da EBJ em relação ao Rio de Janeiro. A: Estado do Rio de Janeiro, destacando a BG. B: Visão ampliada da região da BG, destacando a EBJ. C: Visão ampliada da região da EBJ na Cidade Universitária, Ilha do Fundão. [Fonte: Google Earth, 2024]..... 20
- Figura 2** – Foto tirada durante visita à exposição “Mba’é Ka’á”. Pintura representando a natureza ao redor da BG. [Fonte: arquivo pessoal]..... 22
- Figura 3** - Composição química de alguns dos plásticos citados ao longo do presente estudo. De ligações éster tem-se polietileno tereftalato (PET), policaprolactona (PCL) e ácido polilático (PLA). De ligações de carbono tem-se polietileno (PE), polipropileno (PP) e policloreto de vinila (PVC). Imagem adaptada de Verschoor *et al.*, 2022 ([Toward Microbial Recycling and Upcycling of Plastics: Prospects and Challenges](#) © 2022 by Jo-Anne Verschoor, et al is licensed under [CC BY 4.0](#))...... 24
- Figura 4** – Pontos de coleta de plástico flutuante na Enseada de Bom Jesus (EBJ), Ilha do Fundão, Rio de Janeiro. A: Mapa do Brasil, destacando o Rio de Janeiro. B: EBJ, com os pontos de coleta de amostras plásticas indicados [Fonte: Canellas et al., 2023; Autorização do uso de imagem no Anexo I)..... 38
- Figura 5** – Desenho experimental do estudo. FTIR: infravermelho por transformada de Fourier; LB: Luria Bertani; MC: MacConkey; R2A: Reasoner's 2A; MALDI - TOF MS: do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*..... 38
- Figura 6** – Etapas da triagem enzimática para detecção de esterases e lipases produzidas pelas estirpes bacterianas isoladas a partir da plástisfera da EBJ..... 41
- Figura 7** – Esquema do preparo do meio mínimo com PCL (1%)..... 43
- Figura 8** – Exemplos de amostras plásticas flutuantes da EBJ (RJ – Brasil) coletadas no dia 28/06/2022..... 48
- Figura 9** – Quantidade de isolados (n=245) em cada ponto de coleta de amostras plásticas ao longo do estudo..... 49
- Figura 10** – Número de bactérias isoladas em cada tipo de plástico identificado por FT-IR. Vale ressaltar que as amostras coletadas na orla não passaram por identificação em FT-IR, portanto não estão contabilizadas neste gráfico. PEBD: polietileno de baixa densidade; PEAD: polietileno de alta densidade; PE: polipropileno..... 50

- Figura 11** – Quantidade de cada um dos 18 gêneros distintos isolados das amostras plásticas por ponto ao longo deste estudo. Não id: não identificado..... **51**
- Figura 12** – Diferentes gêneros bacterianos isolados por tipo de plástico. Não id: não identificado..... **51**
- Figura 13** – Bactérias potenciais produtoras de esterase e seus gêneros em quantidade absoluta..... **54**
- Figura 14** – Bactérias potenciais produtoras de lipase testadas com Tween 80 e seus gêneros em quantidade absoluta..... **54**
- Figura 15** – Imagens representativas da triagem para bioemulsificantes. A: CD-M-7 *Pantoea* sp. 7 ($E_{24}=50\%$), cultivada em meio LB; B: P-L-4 *Shewanella baltica* ($E_{24}=57\%$) cultivada em meio mínimo. C: Controle em MM, SDS (10%) ($E_{24}=74\%$)..... **55**
- Figura 16** – Triagem enzimática para poliesterase nos meios LB e mínimo suplementados com tributirina 1%. A: *Enterobacter* sp. CD-M-9 cultivado em LB com tributirina halo de 30 mm. B: *Serratia rubidaea* L-S-4.6 em meio mínimo com tributirina halo de 43 mm. Em ambas as imagens a colônia bacteriana está destacada por barras em azul escuro e o halo de degradação por barras azul claro..... **56**
- Figura 17** – Triagem enzimática com o substrato PCL. A: *A. johnsonii* L-S-2.7 halo de degradação de 19 mm. B: *S. baltica* PT-L-4 halo de degradação de 17 mm. C: *Pantoea* sp. CD-M-7 halo de degradação de 25 mm.. D: *V. fluvialis* PVC-7 halo de degradação de 17 mm. E: *S. rubidaea* L-S-4.6 halo de degradação de 24 mm. Em todas as imagens a colônia bacteriana está destacada por barras em azul escuro e o halo de degradação por barras azul claro..... **57**
- Figura 18** – Panorama geral das cinco estirpes que apresentaram atividade em meio mínimo suplementado com PCL e nos demais ensaios de triagem enzimática e de substâncias tensoativas. Testes negativos em cinza e positivos em laranja..... **57**
- Figura 19** – Testes de permanência da atividade de poliesterase envolvendo sobrenadantes filtrados. A: Atividade enzimática mantida na estirpe *V. fluvialis* PVC-7 B: *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6. B: Atividade enzimática mantida nas estirpes *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6..... **58**
- Figura 20** – Panorama dos resultados dos testes envolvendo os sobrenadantes que mantiveram atividade de poliesterase após filtração. A: Permanência de atividade frente às diferentes condições de temperatura e pH testadas. Laranja: positivo; cinza: negativo. B: Atividade da estirpe *S. rubidaea* L-S-4.6 mantida após cultivo a 37° C. C: Atividade enzimática de poliesterase mantida no sobrenadante da estirpe *V. fluvialis* PVC-7 nas diferentes faixas de temperatura testadas..... **59**
- Figura 21** – Atividade de poliesterase mantida na estirpe *S. baltica* PT-L-4 após ser liofilizada e solubilizada em água deionizada. Outras estirpes testadas sem atividade visível..... **60**

Figura 22 – Atividade de poliesterase do extrato proteico (precipitado), indicado por “P” na placa. Atividade enzimática mantida na porção do extrato com proteínas > 3kDa, indicado por “PF” (A) e >50 kDa também indicado por “PF” (B). Ausência de atividade na porção do extrato com proteínas < 3kDa e <50 kDa, indicado por “PF₂”. Halos de degradação do substrato (PCL) indicados pelas barras em azul claro. A: Precipitação a uma concentração de sulfato de amônio de 40% e concentrada a 3 kDa. B: Precipitação a uma concentração de sulfato de amônio de 60% e concentrada a 50 kDa..... **62**

Figura 23 – Resultados da eletroforese e do zimograma. A: perfil de proteínas em gel de poliacrilamida corado com azul de Comasie após eletroforese sem condições desnaturantes das estirpes *S. rubidaea* L-S-4.6 e *S. baltica* PT-L-4; B: Zimograma sem atividade nas estirpes *S. rubidaea* L-S-4.6 e *S. baltica* PT-L-4..... **62**

Figura 24 – Testes de antagonismo (atividade antimicrobiana) entre as estirpes selecionadas para compor o consórcio de bactérias potenciais degraadoras de plástico. Não houve formação de halos de inibição, portanto não houve atividade antimicrobiana ente as estirpes. A: atividade antimicrobiana de *Pantoea* sp. CD-M-7; *A. johnsonii* L-S-2.7; *V. fluvialis* PVC-7 e *S. rubidaea* L-S-4.6 contra *S. baltica* PT-L-4 (indicadora). B: atividade antimicrobiana de *A. johnsonii* L-S-2.7; *S. rubidaea* L-S-4.6 e *V. fluvialis* PVC-7 contra *Pantoea* sp. CD-M-7 (indicadora)..... **64**

Figura 25 – Consórcios bacterianos após 38 dias. A: Consórcio bacteriano com potencial degradador de plástico. B: Controle negativo (sem inóculo bacteriano)..... **64**

Figura 26 - Imagens representativas das amostras plásticas removidas do microcosmos após 56 dias e analisadas por MEV. Amostras de plástico: (1) PEAD, A: controle negativo B: amostras plásticas após 56 dias no microcosmo. (2) PET e (3) PP. Para 2 e 3, A e B: Controle negativo, e D e E: amostras plásticas após 56 dias no microcosmo..... **65**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Catálogo das amostras plásticas utilizadas para bioprospecção nesse estudo..... **50**

Tabela 2 – Estirpes com potencial produtor de esterase. Id: identificação..... **53**

Tabela 3 – Estirpes bacterianas com potencial bioemulsificante..... **56**

Tabela 4 - Valores de pesos seco dos plásticos utilizados no consórcio bacteriano antes e depois do inóculo. Antes do tratamento antes da barra (/), depois do tratamento após a barra (/)..... **64**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
BG	Baía de Guanabara
EC	do inglês, <i>Enzyme Comission</i>
EBJ	Enseada de Bom Jesus
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier
JBRJ	Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro
LABEAMP	Laboratório de Estudos Ambientais com Microplásticos
LB	Luria-Bertani
MALDI - TOF MS	do inglês, <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>
MC	MacConkey
MM	Meio mínimo
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PE	Polietileno
PCL	Policaprolactona
PET	Polietileno tereftalato
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Polihidroxibutirato
PHB-HV	Polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato
PVC	Policloreto de vinila
R2A	Reasoner's 2 ^a
UV	Ultravioleta
UFC	Unidade(s) Formadora(s) de Colônia
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBT	Tributirina

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
RESUMO PARA LEIGOS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvii
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Baía de Guanabara	20
1.2 Poluição pelo lixo plástico.....	24
1.3 Plastisfera.....	28
1.4 Biorremediação.....	29
1.4.1 Enzimas	31
1.4.2 Biosurfactantes e bioemulsificantes	34
2 JUSTIFICATIVA.....	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Coleta das amostras plásticas	38
4.2 Identificação das amostras plásticas	40
4.3 Isolamento das bactérias.....	40
4.4 Identificação das estirpes isoladas por MALDI-TOF MS	41
4.5 Triagem Enzimática: esterase e lipase.....	41
4.6 Triagem para produção de bioemulsificantes.....	42
4.7 Triagem para produção de biosurfactantes.....	43
4.8 Padronização de meios de cultura para triagem da produção de poliesterases.....	43
4.8.1 Substrato enzimático: tributirina (TBT)	43
4.8.2 Substrato enzimático: policaprolactona (PCL)	44

4.9 Investigação da atividade enzimática no sobrenadante livre de células e atividade enzimática frente a diferentes faixas de temperatura e pH	44
4.10 Avaliação da atividade com sobrenadante liofilizado, filtrado e concentrado.....	45
4.11 Avaliação da atividade no sobrenadante após precipitação das proteínas com sulfato de amônio.....	45
4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem condições desnaturantes.....	46
4.13 Zimograma.....	47
4.14 Ensaio em microcosmos com consórcio de bactérias potenciais degradadoras de plástico.....	47
5. RESULTADOS	49
5.1 Coleta e identificação das amostras plásticas.....	49
5.2 Isolamento das bactérias da plastisfera da EBJ.....	50
5.3 Identificação das estirpes isoladas por MALDI-TOF MS.....	51
5.4 Triagem enzimática: esterase e lipase.....	52
5.5 Triagem para produção de bioemulsificantes e biossurfactantes.....	55
5.6 Padronização de meios de cultura e triagem para lipases.....	57
5.6.1 Tributirina como substrato.....	57
5.6.2 Policaprolactona como substrato.....	57
5.7 Investigação da atividade enzimática no sobrenadante livre de células e caracterização frente a diferentes faixas de temperatura e pH.....	58
5.8 Avaliação da atividade com sobrenadante liofilizado, filtrado e concentrado.....	60
5.9 Avaliação da atividade de poliesterase após precipitação com sulfato de amônio e separação por massa molecular.....	61
5.10 Perfil de proteínas e atividade enzimática.....	62
5.11 Microcosmos com bactérias com potencial degradador de plástico.....	63
5.11.1 Antagonismo bacteriano, crescimento do consórcio e peso seco das amostras plásticas.....	63
5.11.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos plásticos do microcosmos.....	64
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
8. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. ANEXOS	79

1. Introdução

1.1 Baía de Guanabara

Entre um dos ambientes marinhos de maior relevância na costa brasileira, tem-se a Baía de Guanabara (BG; **Figura 1**): a segunda maior baía no litoral do país com 384 km² de área. Com toda a sua extensão, a bacia que drena para a BG tem uma superfície de 4.000 km² e é integrada por 16 municípios, contando com Rio de Janeiro, Petrópolis, Niterói e Duque de Caxias (Fistarol *et al.*, 2015). Existem 50 rios e córregos que têm as águas da BG como destino final. Dessa maneira, tal bacia hidrográfica é considerada um importante recurso hídrico para a região (Oliveira *et al.*, 2014). Além disso, ela abriga 22 ilhas e 44 praias, que são frequentemente aproveitadas durante todo o ano por moradores e turistas, o que torna a BG um dos principais centros recreativos e de atividades náuticas do Brasil e uma importante atração turística para a cidade do Rio de Janeiro (Instituto Baía de Guanabara, 2015). Por exemplo, a Enseada de Bom Jesus (EBJ; **Figura 1C**), localizada na Ilha do Fundão, é tida como uma área de recreação e pesca para moradores da região, ainda que receba diariamente efluentes urbanos que chegam por meio de canais e do porto localizado na região (Orla Sem Lixo, 2022).

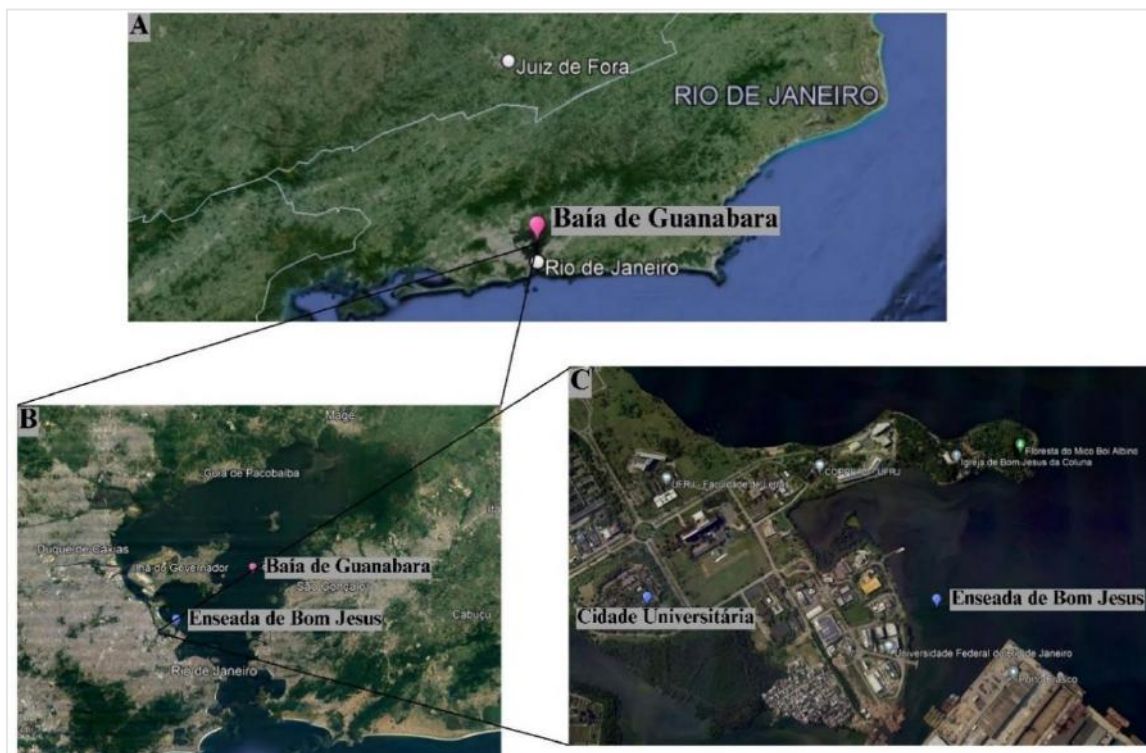


Figura 1: Localização da BG e da EBJ em relação ao Rio de Janeiro. A: Estado do Rio de Janeiro, destacando a BG. B: Visão ampliada da região da BG, destacando a EBJ. C: Visão ampliada da região da EBJ na Cidade Universitária, Ilha do Fundão (Fonte: Google Earth, 2024).

Na língua Tupi (falada por comunidades indígenas nativas do Brasil), Guanabara significa “berçário do mar”. Isso porque, essa região era muito aproveitada por diferentes peixes, crustáceos e até mesmo golfinhos e baleias, como uma área segura para reprodução e alimentação. Não apenas os animais, mas várias gerações de povos nativos também se beneficiavam dessa alta biodiversidade para subsistência (Bartaburu e Johnson, 2023). Além de estar atrelada à manutenção da biodiversidade, a BG costumava ser eficiente em sequestrar carbono, ou seja, ela tinha uma alta capacidade de remover gás carbônico da atmosfera, um grande responsável pelo aquecimento global, por meio da fotossíntese, principalmente devido aos manguezais presentes na região. Ademais, essas áreas de mangue são notáveis filtradoras de toxinas do solo e da água e suas raízes profundas fornecem um efeito natural de barreira contra a erosão costeira causada pela elevação do nível do mar (Bartaburu e Johnson, 2023). Sendo assim, a BG sempre foi essencial para a conservação ecológica do Rio de Janeiro e, conseqüentemente, do Brasil.

Entretanto, com a colonização portuguesa a partir de 1530, a região começou a encarar os impactos da intensificação da ação antropogênica, devido ao desmatamento para abrir espaço para plantações de cana-de-açúcar, até a pesca de baleias e de diferentes peixes, afetando diretamente a fauna local (IBGE, 2023). Além disso, não havia saneamento básico propriamente dito na época da colonização, o qual só começou a ser implementado no Rio de Janeiro em meados do século XIX, quando poucas pessoas tinham acesso ao esgoto encanado, que era despejado *in natura* na BG (Rodrigues e Miranda, 2014). A partir daí a cidade cresceu, sendo hoje uma metrópole com cerca de 6 milhões de habitantes, que ainda não oferece um saneamento abrangente para sua população, sendo 35% a parcela da população que sofre com essa carência (censo IBGE, 2022; Trata Brasil, 2022).

Atualmente, a BG não conta mais com os abundantes cardumes que alimentavam os povos indígenas nativos e, posteriormente os colonizadores; não conta mais com a vegetação exuberante ao seu redor e, nem com os próprios povos indígenas (Bartaburu e Johnson, 2023). Todavia, ela ainda possui vida em seu ambiente, o que traz esperança de um futuro mais sustentável, conforme mostraram as exposições “Futuros da Baía de Guanabara: inovação e democracia climática”, realizada no Fórum de Ciência e Cultura em março de 2023 e “Mba'é Ka'á, o que tem na mata: Barbosa Rodrigues entre plantas e pajés”, realizada no museu do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) disponível em abril de 2024 (**Figura 2**; Portal de eventos – UFRJ, 2023; JBRJ, 2023).



Figura 2: Foto tirada durante visita à exposição “Mba’é Ka’á”. Pintura representando a natureza ao redor da BG.

Mesmo sendo relevante para a cidade, esse impacto humano polui cada vez mais esse ambiente, principalmente por matéria orgânica derivada do despejo de efluentes urbanos não tratados e resíduos sólidos, como plásticos (IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2014). Ainda, os rios e riachos que deságuam na BG recebem o despejo de efluentes industriais e lixo contribuindo para o assoreamento e eutrofização do estuário. Estudos demonstram que a BG tem uma quantidade de microplásticos estimada em até 1.000 itens de microplástico por quilo de sedimento (Alves e Figueiredo, 2019; Belli *et al.*, 2024).

Apesar de toda poluição, ainda são escassos os estudos e esforços voltados para compreender e resolver a poluição desse estuário (Canellas *et al.*, 2023). Porém, o projeto “Orla Sem Lixo” da Universidade Federal do Rio de Janeiro, vem atuando desde 2019 para buscar soluções para o lixo plástico despejado na BG. Esse objetivo em comum une professores e estudantes de diferentes áreas, como engenharia, química, microbiologia e comunicação. Uma parte importante do projeto é a inclusão da população ribeirinha da EBJ, BG, que participa de eventos para aprender e ensinar sobre sua realidade e de algumas ações, como a montagem de barreiras para mitigar a poluição por plásticos flutuantes. Durante o projeto já foram montados mais de 300 metros de barreiras, além

da promoção de estudos microbiológicos acerca da comunidade bacteriana associada ao lixo plástico da BG (Orla sem Lixo, 2022; Alves *et al.*, 2024).

Mesmo com o resultado de anos de urbanização estampados em suas águas, a BG pode atuar como uma fonte promissora de soluções biotecnológicas para biorremediação. Isso porque, essa “estampa” de matéria orgânica e lixo plástico exerce uma constante pressão seletiva sobre as bactérias que ali vivem, o que favorece a seleção de características metabólicas que possam vir a ser aproveitados para biorremediação sob a perspectiva microbiológica (Narayanan, Ali e El-Sheekh, 2023).

1.2. Poluição pelo lixo plástico

Plásticos são compostos de hidrocarbonetos e formados por polimerização: uma série de reações químicas em matérias-primas orgânicas (contendo carbono), principalmente gás natural e petróleo bruto. Vários tipos de polimerização permitem produzir plásticos com propriedades particulares (Atlas do Plástico, 2020). Dentre as características que justificam seu amplo emprego, estão suas propriedades térmicas e mecânicas satisfatórias, custo relativamente baixo de produção e estabilidade frente a fatores abióticos, como altas temperaturas e estresse mecânico (Gricajeva, Nadda e Gudiukaite, 2022). Esses polímeros sintéticos podem ser usados a longo prazo, como em peças de veículos ou materiais de construção ou a curto prazo como em embalagens. O uso a curto prazo consistem em uma das grandes agravantes quando se trata do descarte inadequado de plásticos, visto que cerca de 40% de todo plástico produzido é utilizado em embalagens, que são predominantemente de uso único/curto prazo (Napper e Thompson, 2023).

Os plásticos podem ser classificados quanto à sua composição e características, podendo ser divididos em dois grandes grupos: plásticos tradicionais e biodegradáveis (Atlas do Plástico, 2020). Os plásticos biodegradáveis provêm de matérias-primas distintas, como o milho, a partir de sua biomassa, ou cascas de camarão e outros crustáceos (Brito *et al.*, 2011; Atlas Do Plástico, 2020). Também é possível fabricar esses plásticos biodegradáveis dos derivados do petróleo ou por síntese bacteriana, como é o caso do polihidroxibutirato (PHB), que tem ácido 3-hidroxibutírico como substrato de carbono; ou polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHB-HV), que possui o ácido 3-hidroxivalérico como substrato (Brito *et al.*, 2011). Além disso, a policaprolactona (PCL) também é um polímero biodegradável, sendo utilizada na área médica para engenharia de tecidos, em curativos ou até mesmo, na indústria cosmética devido à sua compatibilidade

com tecidos humanos (Chang *et al.*, 2022; Guimarães, 2022; Gharibshahian *et al.*, 2023). Para serem considerados biodegradáveis esses plásticos devem idealmente ser de fácil assimilação por microrganismos e compostáveis, ou seja, não gerar produtos tóxicos quando degradados (Filiciotto e Rothenberg, 2021). Vale ressaltar que esses plásticos ainda são minoria e também podem levar fins prejudiciais para o meio ambiente, como a incineração (Atlas do Plástico, 2020).

Já dentre os plásticos tradicionais, pode-se citar o PET (polietileno tereftalato), PP (polipropileno), PEAD (polietileno de alta densidade), PEBD (polietileno de baixa densidade) e o PE (polietileno). O PET é formado por ácido tereftálico e etileno glicol, ligado por ligações do tipo éster; o PP é formado por ligações de carbono; o PEAD e o PEBD são formados por ligações de carbono, sendo o PEAD mais rígido e menos flexível que o PEBD e; o PE também é formado por ligações de carbono e possui alto peso molecular (Verschoor *et al.*, 2022; Jin e Jia, 2024) (**Figura 3**).

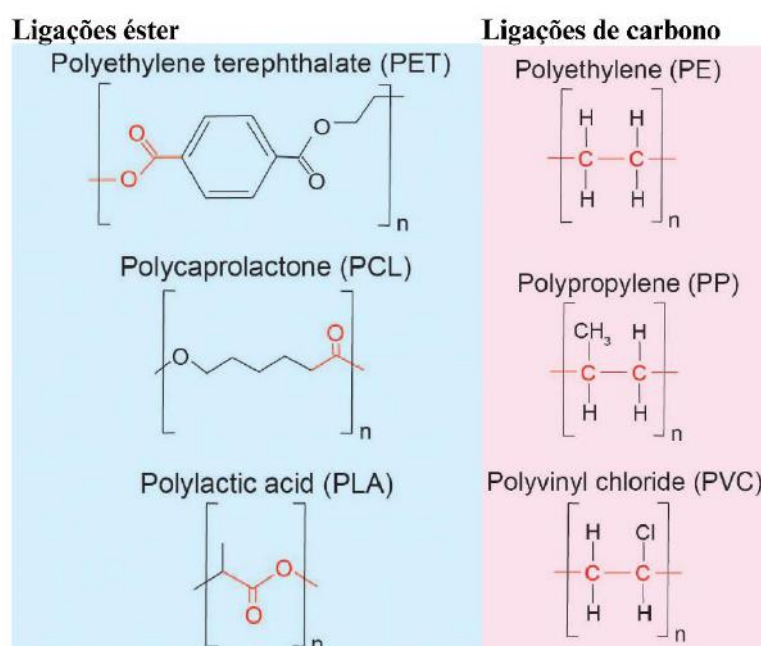


Figura 3: Composição química de alguns dos plásticos citados ao longo do presente estudo. De ligações éster tem-se polietileno tereftalato (PET), policaprolactona (PCL) e ácido polilático (PLA). De ligações de carbono tem-se polietileno (PE), polipropileno (PP) e policloreto de vinila (PVC). Imagem adaptada de Verschoor *et al.*, 2022 ([Toward Microbial Recycling and Upcycling of Plastics: Prospects and Challenges](#) © 2022 by Jo-Anne Verschoor, et al is licensed under [CC BY 4.0](#))

A produção, a utilização e o descarte de resíduos plásticos nem sempre foi alvo de grandes preocupações. Em 1862, quando foi inventado a partir da celulose, o plástico não recebeu tanta atenção e, até meados do século XX, ocupava apenas um pequeno nicho de mercado. Em 1911, surgiu o policloreto de vinila (PVC), que por ser produzido a partir de um resíduo da indústria petroquímica começou a ser amplamente utilizado,

principalmente durante a Segunda Guerra Mundial, para revestir cabos de navios. Dessa forma, relativamente pouco tempo (cerca de 85 anos) de uso intenso de plásticos já foi suficiente para causar danos crônicos em nosso ecossistema (Atlas do Plástico, 2020).

Hoje em dia, a produção anual de plásticos é estimada em 350 milhões de toneladas em todo o mundo. Por conta de sua natureza recalcitrante, a degradação desse material é difícil, resultando no seu acúmulo no meio ambiente, fato que acarreta riscos para a fauna e flora. Estima-se que apenas 9% dos plásticos descartados foram reciclados, sendo a maioria descartada de forma inadequada em lixões (Meijer *et al.*, 2021; OECD, 2023; Howard *et al.*, 2023). Esse número é baixo por uma série de motivos, sendo alguns deles o fato de a reciclagem ser um processo custoso e que muitas vezes gera subprodutos tóxicos, o fato de que o plástico reciclado geralmente produz materiais de baixa qualidade que acabam sendo preteridos no mercado e, muitas das vezes, o ritmo da produção de plásticos não é proporcional às suas taxas de reciclagem (Atlas do Plástico, 2020). Apenas no Brasil, 3,86% do plástico descartado acabaram nos oceanos de um total de 3,86 milhões de toneladas que foram descartadas de forma inadequada em 2019. (Meijer *et al.*, 2021; OECD, 2023).

Para além do descarte inadequado dos plásticos, que acabam chegando nos oceanos, como citado anteriormente, é importante destacar a dinâmica da rede global de comércio de resíduos plásticos. O país principal importador de lixo plástico era a China, que entre 1950 e 2017 importou 150 Mt de plástico (Pabortsava e Lampitt, 2020; Liu *et al.*, 2022). No entanto, em 2017, o país resolveu diminuir drasticamente a sua importação de plásticos, devido aos danos ambientais que estava enfrentando (Liu *et al.*, 2022). As novas rotas ainda apontam para países asiáticos em desenvolvimento como receptores desse lixo. Atualmente, algumas das rotas centrais de comércio são entre Estados Unidos como exportador e Malásia e como importador (Liu *et al.*, 2023). Em particular, a Malásia foi o segundo país que mais emitiu lixo plástico para os oceanos em 2019, ficando atrás somente da Índia (Meijer *et al.*, 2021), ou seja, o país não supriu a demanda de reciclar todo o plástico que recebeu e chegou até a devolver cerca de 3 milhões de toneladas de lixo plástico para os países de origem, dentre eles os Estados Unidos (RFI, 2020). Mesmo que a intenção seja comercializar os resíduos plásticos para que eles possam ser reciclados, os dados evidenciam que isso de fato não está acontecendo (Meijer *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2023). Afinal o que está sendo comercializado: toneladas de lixo plástico ou o peso dos impactos ambientais que eles carregam?

Ademais, a pandemia de COVID-19 que assolou o mundo entre 2019 e 2022 foi um agravante para o descarte inadequado de plásticos. Isso porque, vários equipamentos médicos e de proteção pessoal contém ou são feitos de plásticos, como máscaras cirúrgicas, luvas e embalagens de álcool em gel (Nanayakkara *et al.*, 2024). Chowdhury e colaboradores (2021) estimaram que o total de resíduos plásticos gerados no Brasil, provenientes somente do uso de máscaras, foi de cerca de 13 mil toneladas.

Esses polímeros podem ser degradados no ambiente, em um ritmo lento, por fatores abióticos, como a luz ultravioleta (UV), ou bióticos, como microrganismos. O tempo de meia-vida do PET em ambiente marinho influenciado por luz UV e calor é de 2,3 anos, enquanto a meia-vida do PEAD sob as mesmas condições chega a 530 anos. No entanto, vale lembrar que a meia-vida varia de acordo com a espessura do plástico e as condições ambientais às quais eles são submetidos (Chamas *et al.*, 2020). Ressalta-se ainda que, ao iniciarem o processo de degradação, os plásticos se dividem em partículas menores, os microplásticos, definidos como fragmentos menores que 5 mm, ou nanoplásticos partículas menores que 1 nm, o que facilita sua disseminação (Kumar *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022; Napper e Thompson, 2023; Belli *et al.*, 2024). Por isso, os detritos plásticos não estão presentes apenas na água, mas também na biota (peixes, tartarugas, bivalves), sedimentos (praias e fundo oceânico) e até mesmo na atmosfera (Van Cauwenberghe *et al.*, 2015; Rezanian *et al.*, 2018; Ugwu, Herrera e Gómez, 2021; Napper e Thompson, 2023).

Uma alternativa para lidar com a poluição por plásticos é a pirólise. Ela consiste na degradação térmica de uma substância orgânica a vácuo. A pirólise de resíduos plásticos envolve a conversão dos mesmos em uma mistura de gases, óleo e carvão, todos com potencial para serem utilizados como produtos úteis, como combustíveis ou para a produção de pavimento, por exemplo (Gopinath *et al.*, 2020). Brevemente, a tecnologia empregada envolve temperaturas que variam de 500 a 1.300 °C para derreter esses resíduos e gerar os produtos de interesse (Laghezza, Fiore e Berruti, 2024; Yek *et al.*, 2024). Porém, esse processo não é vantajoso por precisar de temperaturas altíssimas e liberar gases de efeito estufa, como o metano, o que faz com que seja necessário um tratamento específico para evitar a liberação desses gases, tornando-o mais caro. Para minimizar verdadeiramente o impacto ambiental, esse processo não só deve ser capaz de reduzir os resíduos plásticos, mas também não criar consequências negativas indesejadas. Logo, para que a pirólise possa ser considerada como uma alternativa na reciclagem de lixo plástico, ainda são necessários avanços tecnológicos para fazer com que ela seja mais

sustentável e menos custosa. Assim, ressalta-se como é imprescindível a busca contínua por alternativas mais sustentáveis para lidar com o “tsunami de plásticos” que afeta notoriamente os ambientes marinhos (Gopinath *et al.*, 2020).

Uma dessas soluções para mitigar essa grande onda de poluição é a biorremediação bacteriana. Visto que os próprios resíduos plásticos presentes no meio ambiente podem conter soluções biotecnológicas que auxiliam na remediação desse problema, como bactérias que produzem substâncias de interesse para biorremediação não só de plásticos, como também de outros poluentes, como os efluentes oleosos (Narayanan, Ali e El-Sheekh, 2023). Além de ser possível a monetização desse processo de biorremediação, o tratamento dos plásticos e efluentes oleosos pode culminar na geração de subprodutos de interesse industrial ao longo do processo. Por exemplo, alguns subprodutos de interesse que podem ser obtidos a partir da biorremediação do PET são o ácido glicólico, com valor de mercado global de US\$ 325 milhões em 2022, amplamente utilizado na indústria de cosméticos, e o ácido vanilínico, com valor de mercado global de US\$ 12,7 bilhões em 2022, utilizado como aromatizante e flavorizante na indústria alimentícia. (Carniel *et al.*, 2024). Um estudo de Sadler e Wallace (2021) conseguiu converter ácido tereftálico (composto do PET) diretamente em ácido vanilínico ao modificar por meio de bioengenharia a bactéria *Escherichia coli*.

1.3. Plastisfera

A plastisfera é um nicho ecológico único caracterizado por uma comunidade dinâmica de microrganismos compreendendo autotróficos, heterotróficos, predadores e patógenos que ocorre em uma superfície plástica, seja na água ou no solo (Tang, 2024).

No caso da EBJ, BG, esse nicho está sob uma constante pressão seletiva. A pressão seletiva se fez presente no estudo de Salinas e colaboradores (2023), que inocularam uma amostra de solo com filmes de polietileno de baixa densidade linear por três meses e em seguida inocularam amostras desse solo em diferentes meios de cultivo, também enriquecidos com polietileno de baixa densidade linear (em pó e em filme) durante 90 dias, a fim de selecionar e caracterizar um consórcio microbiano degradador desse plástico. O consórcio obtido do meio enriquecido com polietileno de baixa densidade em pó foi mais eficiente, reduzindo o peso dos microplásticos em até 5,5%. Além disso, os autores afirmam que o microcosmo criado com o solo e os filmes plásticos induziu uma pressão seletiva *in vitro*, favorecendo o fenótipo daquelas bactérias capazes de metabolizar o plástico (Henry *et al.*, 2021).

Li e colaboradores (2023), também demonstraram o efeito da pressão seletiva na presença de plásticos. Ao adicionarem microplásticos de PET em uma composteira em comparação com uma sem adição de plásticos, foi observado que onde houve adição de microplásticos, a comunidade bacteriana continha mais potenciais degradadores de plástico, como *Brevibacterium*. E, portanto, concluiu-se que a adição de plástico, ou seja, uma mudança ambiental que causa pressão seletiva, foi capaz de selecionar o microbioma a nível de gênero, destacando que a plastisfera pode acumular bactérias associadas à degradação de plásticos.

Um estudo de Saleem e colaboradores (2023) analisou por metagenômica *shotgun* bactérias degradadoras de plástico a partir de amostras da Praia de Clifton no Paquistão, um local conhecido pelo despejo de resíduos. Como resultado, foi observado que os gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Mycobacterium* e *Rugeria* possuíam genes para a produção de biossurfactantes, além de possuírem natureza termofílica. Já os gêneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, dentre outros, possuíam genes de biossurfactantes, além de apresentarem potencial de degradação de plásticos sintéticos. Com destaque para *Pseudomonas* sp., que apresentou além da capacidade genômica de produção de biossurfactante, natureza termofílica e potencial de degradação de plásticos sintéticos. Assim, evidencia-se que a plastisfera marinha pode ser um repositório de substâncias com potencial biotecnológico.

Em um estudo recente realizado com amostra de plástico coletadas na própria BG, diversos gêneros bacterianos apresentaram potencial enzimático atrelado à degradação de plásticos (por exemplo: esterases), com destaque para os gêneros *Vibrio* e *Aeromonas* (Canellas *et al.*, 2023). Assim, ressalta-se a importância de buscar soluções biotecnológicas de biorremediação nos próprios locais afetados pelo plástico.

1.4. Biorremediação

A biorremediação envolve o uso de agentes biológicos, como plantas e microrganismos, para remover ou diminuir os efeitos de poluentes (Ayilara e Babalola, 2023). É considerada uma tecnologia mais eficiente, ecológica e econômica quando comparada com alternativas sintéticas, visto que a remediação por meios sintéticos precisa, em alguns casos, de equipamentos específicos, como no caso da prólise, que exige temperaturas altas e tende a ser mais cara, muitas vezes por conta desses equipamentos e, menos sustentável, visto que os produtos sintéticos podem ser fonte de novos poluentes (Sonune, 2021). Ainda, o próprio agente utilizado para a remediação

pode se tornar um novo poluente, como ocorre muitas vezes na remediação química (Ayilara e Babalola., 2023). No espectro da biotecnologia, a biorremediação se enquadra no grupo de “biotecnologia verde”, englobando também o tratamento de efluentes contaminados, com óleo, por exemplo (Orlandi *et al.*, 2022).

Nesse sentido, os microrganismos se destacam na área de biorremediação, pois podem converter elementos tóxicos em água, dióxido de carbono e outros compostos menos tóxicos, que são subsequentemente degradados por outros microrganismos. Isto é, o objetivo é converter resíduos recalcitrantes em compostos menos tóxicos e de menor peso molecular, para que eles possam retornar aos ciclos biogeoquímicos e não permanecerem poluindo o ambiente (Amobonye *et al.*, 2021 Mahmoud, 2021; Kumar *et al.*, 2022). Além disso, os microrganismos são ubíquos na natureza, e utilizam uma ampla gama de substratos, que podem ser os próprios poluentes, como fonte de carbono (Kour *et al.*, 2022). Ademais, eles são melhores opções quando comparados com plantas, porque crescem de maneira mais fácil e rápida e são de manipulação menos complexa (Ayilara e Babalola, 2023).

Os mecanismos de biorremediação microbiana são diversos. Contudo, quando se trata da biorremediação de plásticos, podemos dividi-los em quatro categorias principais: biodeterioração, biofragmentação, assimilação e mineralização. A biodeterioração é causada por fatores físico-químicos associados a bactérias e outros microrganismos e consiste na alteração superficial do polímero. Por exemplo, o processo de adesão bacteriano e a formação de biofilmes na superfície plástica pode ser suficiente para causar essa degradação superficial, posteriormente a excreção de substâncias extracelulares, como surfactantes, podem auxiliar na troca entre fases hidrofóbicas (polímero plástico) e hidrofílicas (bactérias e substâncias secretadas) (Lucas *et al.*, 2008; Nauendorf *et al.*, 2016; Anjana *et al.*, 2020; Amobonye *et al.*, 2021). Nesse sentido, Gupta e Devi (2020), observaram que uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, já presente na coleção do laboratório, foi capaz de crescer e manter biofilme ativo em polietileno de baixa densidade durante dois meses, o que foi atribuído ao consumo de compostos de baixo peso molecular do polímero pela bactéria.

Então, inicia-se a biofragmentação, que consiste em uma despolimerização do plástico já biodeteriorado em unidades moleculares menores. Nessa etapa acontece a queda do peso molecular do polímero e a oxidação (perda de elétrons) dessas moléculas de peso molecular mais baixo. Isso acontece devido a excreção de enzimas hidrolíticas e outros compostos, como amônia e ácido cítrico, que podem ajudar na oxidação do

polímero (Jenkins *et al.*, 2019; Krause *et al.*, 2020; Amobonye *et al.*, 2021). Gravouli e colaboradores (2015) aplicaram transcriptômica e observaram que uma cepa de *Rhodococcus ruber* foi capaz de degradar moléculas de baixo peso molecular provenientes de polietileno. Já a assimilação consiste na internalização dessas partículas de peso molecular menor, provenientes dos processos de biodeterioração e biofragmentação. Os mecanismos de assimilação bacteriana por moléculas plásticas ainda não foram totalmente elucidados (Amobonye *et al.*, 2021). Entretanto, sabe-se que o processo envolve transporte ativo e passivo, assim como o processo de assimilação de hidrocarbonetos (Shahnawaz, Sangale e Ade, 2019). Hosaka e colaboradores (2013) elucidaram um transportador de membrana responsável por internalizar ácido tereftálico (subproduto do PET) em *Comamonas* sp.

Uma vez dentro da célula bacteriana, a molécula derivada do plástico sofre mineralização. Esse processo consiste na etapa final, mediada por diferentes enzimas, que transformam esses polímeros em produtos menos tóxicos como gás carbônico, nitrogênio ou metano. O processo pode ocorrer de forma anaeróbica ou aeróbica, e envolve enzimas como esterases e lipases (Ho, Roberts e Lucas, 2018; Amobonye *et al.*, 2021). A partir de amostras de água do mar coletadas na China, Meng e colaboradores (2024) isolaram uma estirpe do gênero *Pseudalkalibacillus* e elucidaram o seu possível mecanismo de degradação de filmes de PE por meio de sequenciamento genômico. O processo de biodeterioração se inicia com peroxidases e lacases e conta com outras enzimas, como as esterases e lipases, até que o plástico, uma vez íntegro seja convertido em subprodutos que são inseridos no ciclo do ácido cítrico, gerando como produto final gás carbônico e água (Lv *et al.*, 2024; Meng *et al.*, 2024).

A área da biorremediação é extensa e amplamente estudada, até hoje são 13.528 patentes referentes a biorremediação, cerca de 7.245 associadas à biorremediação bacteriana e, 2.989 associadas a biorremediação bacteriana do plástico (Lens Patent Search, 2024). Dentre algumas ferramentas de biorremediação mais estudadas se encontram as enzimas e os agentes tensoativos.

1.4.1. Enzimas

As enzimas podem ser obtidas de origem biológica e, dentre suas várias aplicações, podem ser utilizadas para biorremediação. Um grupo enzimático bastante utilizado para esse fim são as esterases, porque quebram ligações éster presentes em diferentes tipos de plástico, como o PET. Essas enzimas, de uma forma geral, catalisam

reações de hidrólise, ou seja, catalisam a quebra de ligações covalentes concomitante com a hidrólise de uma molécula de água de diferentes substratos, como moléculas com ligações do tipo éster. Em sua maioria, as carboxilesterases tem seu sítio catalítico composto por uma tríade dos seguintes aminoácidos: serina, ácido aspártico ou ácido glutâmico e histidina. Sendo a serina a maior responsável pela hidrólise realizada por essas enzimas (Johan *et al.*, 2021).

A energia de ativação de uma reação química consiste na energia mínima necessária para que ela possa acontecer. Quanto mais alta essa energia, maior a demanda de energia da reação e o tempo da reação. Uma reação lenta não é benéfica tanto para os seres vivos, quanto para a indústria. Dessa forma, as enzimas desempenham um papel essencial nos sistemas bióticos e abióticos, visto que agem diminuindo essa energia de ativação e, consequentemente, acelerando processos químicos (Krise, 2021). Exceto por um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA (ribozimas), todas as enzimas são proteínas (Scott, 2007).

Dentre as carboxilesterases, duas das enzimas de destaque são esterases (EC 3.1.1.1, hidrolases de éster carboxílico) e lipases (EC 3.1.1.3, hidrolases de triacilglicerol). As esterases tendem a atuar em ésteres solúveis em água e, em geral, de cadeia curta e/ou ramificada; enquanto as lipases agem sobre triglicerídeos e ésteres apolares, em geral de cadeia mais longa e linear (Bracco *et al.*, 2020). Vale ressaltar que elas possuem algumas aplicações semelhantes, as duas possuem potencial biorremediador de efluentes oleosos (Messias *et al.*, 2011; Leite, 2021). Adicionalmente, as lipases podem ser utilizadas para realçar propriedades organolépticas de alimentos (Messias *et al.*, 2011) e as esterases podem ajudar a desagregar biofilmes bacterianos (Leite, 2021). Tem-se ainda um grupo de enzimas amplamente denominado como poliesterases. Este grupo que não apresenta *Enzyme Commission Number* (EC), engloba lipases microbianas (EC 3.1.1.3), esterases (EC 3.1.1.1) e cutinases (EC 3.1.1.74), bem como PETases (EC 3.1.1.101) e PHA despolimerases (EC 3.1.1.75 e EC 3.1.1.76) com potencial na catálise da degradação de polímeros sintéticos ou naturais contendo ligações do tipo éster em suas cadeias, exemplos incluem a cutina e o PET. (Gricajeva, Nadda e Gudiukaite, 2022). As poliesterases são amplamente estudadas quanto ao seu potencial degradador de plásticos (Molitor *et al.*, 2020; Galarza–Verkovitch *et al.*, 2023; Howard e McCarthy, 2023). A capacidade da bactéria *Rhodococcus pyridinivorans*, proveniente de ambiente marinho, de hidrolisar superfícies plásticas foi atribuída a uma esterase (Guo *et al.*, 2023). As poliesterases também já foram observadas em outras espécies bacterianas, como *Bacillus*

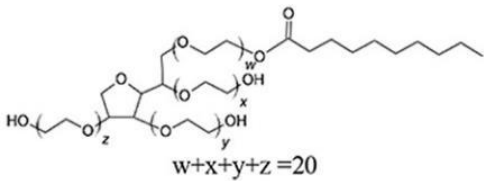
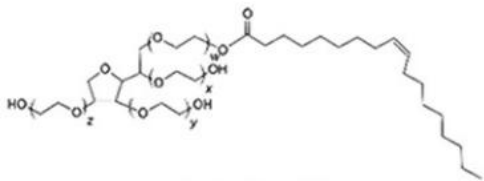
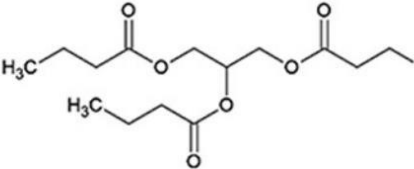
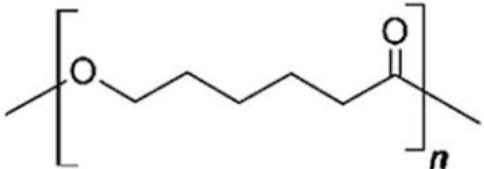
pumilus, *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., entre outras; sendo que todas essas espécies podem ser encontradas em ambientes aquáticos (Saranya, Selvi e Sekaran, 2019; Dave e Das, 2021; Gricajeva, Nadda e Gudiukaite, 2022; Ayilara e Babalola, 2023).

É importante ressaltar que o termo “poliesterase” foi estabelecido, provavelmente, com o intuito de facilitar as pesquisas e discussões sobre a biodegradação de plásticos. Isso porque, as enzimas ali presentes, apesar de serem classificadas como hidrolases de éster carboxílico, existem diferenças entre seus substratos, indicados pelo 4º número EC. Portanto, apesar de apresentarem semelhanças e por isso pertencerem ao grupo das poliesterases, é preciso ter atenção tanto para que a bioprospecção seja realizada com o substrato indicado para cada uma dessas enzimas e para a utilização do termo de forma correta.

Entre as estratégias de triagem da produção de esterases, lipases e o grupo das poliesterases, pode-se ressaltar o uso de meios de cultivo acrescidos dos respectivos substratos de interesse (Lopes, 2020) (**Quadro 1**). Diferentemente da triagem de esterases e lipases, a busca por poliesterases é um campo relativamente novo de pesquisa e diferentes substratos podem ser empregados para tal finalidade. A tributirina (triglicerídeo composto por três moléculas de butirato) é uma boa opção para uma triagem da produção de lipases (pertencentes ao grupo das poliesterases), assim como o Tween 80 (**Quadro 1**), visto que ela é um composto relativamente barato que é degradado por essas enzimas (Molitor *et al.*, 2020).

A PCL é considerada um modelo de substrato de alto rendimento proveniente do petróleo, amplamente utilizado para triagem de potencial de degradação de plásticos a base de poliésteres (Howard *et al.*, 2023). É tida como uma das melhores estratégias para a bioprospecção desse potencial devido a sua estrutura semicristalina e à semelhança de suas propriedades físicas e químicas com o PET (Galarza–Verkovitch *et al.*, 2023). Assim, o uso de tributirina e da PCL provê uma triagem relativamente simples para delinear bactérias com potencial degradador de plásticos (Molitor *et al.*, 2020). Além disso, o PCL é um exemplo de substrato que pode detectar mais de uma enzima dentro do grupo das poliesterases, como a cutinase (Carr *et al.*, 2022).

Quadro 1: Substratos utilizados para a bioprospecção de enzimas que atuam em poliésteres.

Substrato	Definição	Finalidade
 <p>$w+x+y+z=20$ $C_{58}H_{114}O_{26}$; Tween 20</p>	Detergente não iônico. Éster de cadeia curta	É um dos substratos para a enzima esterase, por isso é utilizado para detectá-la <i>in vitro</i>
 <p>$w+x+y+z=20$ $C_{64}H_{124}O_{26}$; Tween 80</p>	Detergente não iônico. Éster de cadeia longa	É um dos substratos para a enzima lipase, por isso é utilizado para detectá-la <i>in vitro</i>
 <p>$C_{15}H_{26}O_6$; Tributirina</p>	Triglicerídeo composto por três moléculas de butirato	É um substrato para triagem inicial de poliesterases e de lipase
 <p>$(C_6H_{10}O_2)_n$; Policaprolactona</p>	Plástico alifático biodegradável	Padrão ouro para triar poliesterases, devido à sua estrutura semicristalina e à semelhança de suas propriedades físicas e químicas com o PET

Dados adaptados de Molitor *et al.*, 2020; Sigma-Aldrich, 2020; Roberts *et al.*, 2020 (autorização no Anexo II); Galarza–Verkovitch *et al.*, 2023; Howard e McCarthy, 2023; BRENDA Enzyme Database, 2024.

1.4.2. Biossurfactantes e bioemulsificantes

Surfactantes são, por definição, substâncias capazes de alterar a tensão superficial de um líquido. Os biossurfactantes e bioemulsificantes, chamados “surfactantes microbianos”, são moléculas anfifílicas, ou seja, tem uma parte hidrofílica, que pode ser composta por açúcares, grupos ácidos ou proteicos e, outra hidrofóbica, que pode ser composta por ácidos graxos, com variações em seu comprimento e suas ramificações. Esses “surfactantes microbianos” podem ser produzidos por uma gama de microrganismos, além de serem opções mais sustentáveis do que suas alternativas sintéticas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade

(Uzoigwe *et al.*, 2015; Adetunji e Olaniran, 2021; Muriel-Millán, Millán-López e Pardo-López, 2021).

Apesar do nome “surfactantes microbianos” sugerir que essas duas substâncias (biossurfactante e bioemulsificante) tem a capacidade de alterar a tensão superficial de um líquido, somente os biossurfactantes possuem tal propriedade (Uzoigwe *et al.*, 2015). Além disso, biossurfactantes possuem uma massa molecular mais baixa e consistem majoritariamente de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos funcionais. Enquanto os bioemulsificantes têm uma massa molecular maior e são misturas complexas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas (**Quadro 2**) (Uzoigwe *et al.*, 2015). Biossurfactantes e bioemulsificantes apresentam aplicações não somente na biorremediação, mas também como agentes antimicrobianos e antibiofilme (Uzoigwe *et al.*, 2015; Freitas-Silva *et al.*, 2023; Canellas *et al.*, 2023; Dias *et al.*, 2024).

Quadro 2: Diferenças principais entre biossurfactantes e bioemulsificantes.

<u>Biossurfactantes</u>	Bioemulsificantes
↓ massa molecular	↑ massa molecular
Açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e grupos funcionais	Misturas de heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e proteínas
Capazes de reduzir tensão superficial e formar emulsão	Eficazes somente para formar emulsões

Dados adaptados de Uzoigwe *et al.*, 2015.

No campo da biorremediação, eles podem ser usados para aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos para microrganismos, como poluentes oleosos, facilitando sua biodegradação (Damasceno, Cammarota e Freire, 2012; Olkowska, Polkowska, Namieśnik, 2012). Eles também podem ser utilizados na biorremediação de metais pesados, como o cádmio (Swarnkar, Agrawal e Tomar, 2012; Santos *et al.*, 2016; Adetunji e Olaniran, 2021).

Alguns biossurfactantes e bioemulsificantes são mais estudados. Os ramnolipídeos (biossurfactante; glicolipídeo composto por uma ou duas moléculas de ramnose – parte hidrofílica – ligadas a cadeias de ácidos graxos – parte hidrofóbica), são produzidos principalmente por *Pseudomonas* spp. (Gaur e Manickam, 2021). Já os bioemulsificantes são comumente produzidos por *Acinetobacter* sp. Sendo um deles o Emulsan, composto de ácidos graxos e monômeros de trissacarídeo, sendo os ácidos

graxos hidrofóbicos e a parte composta de sacarídeo - hidrofílica (D’Almeida *et al.*, 2024).

Canellas e colaboradores (2023) isolaram bactérias com potencial bioemulsificante da plastisfera da EBJ, BG. Dentre as espécies produtoras de bioemulsificantes estão *Vibrio fluvialis* e *Acinetobacter johnsonii*, ilustrando que ambientes poluídos, ou o próprio poluente, nesse caso o lixo plástico, podem ser uma fonte de soluções biotecnológicas no âmbito da biorremediação. Ravindran e colaboradores (2020) isolaram uma estirpe de *Bacillus* sp. proveniente de uma esponja marinha da Baía de Palk na Índia. Essa estirpe produziu um biosurfactante aniônico composto de lipopeptídeo que foi capaz de biorremediar efetivamente chumbo e cádmio *in vitro*.

Vale ressaltar que ainda é bem raro na literatura relatos sobre a bioprospecção de “surfactantes microbianos” oriundos de plastisfera marinha. Assim, esse trabalho contribui para preencher esta lacuna do conhecimento.

2. Justificativa

Tendo em vista a importância social, histórica e econômica da BG, a qual tem um papel essencial para a identidade da cidade do Rio de Janeiro, fica evidente a necessidade de maior atenção para a poluição que a afeta. Visto que as bactérias desse estuário estão sob constante pressão seletiva devido à poluição ambiental, o estudo desses microrganismos apresenta-se como uma estratégia relevante para a investigação de novas soluções biotecnológicas para este problema. Ainda assim, poucos estudos foram dedicados à caracterização das comunidades bacterianas locais e, consequentemente, poucas informações estão disponíveis acerca da composição de suas comunidades bacterianas, especialmente no que se refere à caracterização de seu potencial biotecnológico. Especificamente, ainda é incipiente o conhecimento sobre as comunidades microbianas em resíduos plásticos (plastisfera) da BG, um dos principais poluentes encontrados naquelas águas. Nesse sentido, cada vez mais trabalhos na literatura se dedicam à exploração de diferentes temas relacionados à plastisfera ao redor do mundo, o que mostra a pertinência do assunto.

Uma das soluções biotecnológicas, a biorremediação, é vantajosa em termos de sustentabilidade, porque os produtos de origem microbiana tendem a impactar menos o meio ambiente quando comparados a alternativas sintéticas. Além do mais, os microrganismos aplicáveis em processo de biorremediação são uma fonte potencialmente

mais barata para a recuperação de áreas afetadas. Dentre as estratégias mais estudadas, estão o emprego de enzimas, biossurfactantes e bioemulsificantes. Atualmente, a comercialização destes produtos é cada vez mais valorizada (Carniel *et al.*, 2024), o que reflete o crescente número de patentes depositadas no setor de enzimas e substâncias tensoativas. Com isso, o projeto interdisciplinar “Orla sem Lixo” da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no qual está inserido o presente estudo, visa procurar soluções inovadoras para amenizar a poluição por resíduos sólidos na Enseada de Bom Jesus (EBJ), Ilha do Fundão, Baía de Guanabara, RJ. Além desse exemplo de esforço localizado, estamos vivendo a “Década das Nações Unidas de Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável” que foi declarada pela Organização das Nações Unidas (ONU) e abrange o período entre 2021 e 2030, sendo um esforço global para evidenciar os oceanos como agentes importantes para a garantia de um futuro mais sustentável (Ciência No Mar - MCTI, 2020).

Este projeto também está alinhado com alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU. Sendo eles “Indústria, Inovação e Infraestrutura” (ODS 9), “Cidades e Comunidades Sustentáveis” (ODS 11), “Consumo e Produção Responsáveis” (ODS 12) e “Vida na água” (ODS 14). Esses objetivos são parte de um apelo global à ação para acabar com a pobreza, proteger o meio ambiente e o clima e garantir que as pessoas, em todos os lugares, possam desfrutar de paz e de prosperidade (Nações Unidas Brasil, 2024).

Assim, o presente estudo se propõe a investigar o potencial biotecnológico de bactérias associadas a plásticos coletados na Enseada de Bom Jesus (EBJ), localizada na BG, com foco na produção de enzimas, mais especificamente esterases e lipases, e à produção de biossurfactantes e bioemulsificantes, complementando os dados previamente publicados pelo grupo de pesquisa (Canellas *et al.*, 2023). Dessa forma, este projeto pode contribuir não somente para o início do desenvolvimento de novos produtos e processos, mas também para transmitir esse conhecimento para a população da região que utiliza a BG como local de pesca para a sua subsistência e como espaço de lazer. Além disso, este estudo se apresenta como um dos pioneiros na caracterização da plastisfera do Brasil, dessa forma abrindo caminho para futuros estudos acerca da plastisfera da costa brasileira.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Este estudo visa analisar a produção de hidrolases (esterases, lipases e poliesterases) e substâncias tensoativas por bactérias isoladas de plásticos coletados na Enseada de Bom Jesus, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro (RJ – Brasil), ao longo de um período de seis meses.

3.2 Objetivos Específicos

- (i) Isolar e identificar bactérias associadas aos resíduos plásticos coletados na superfície da água e na areia da orla da Enseada de Bom Jesus, Ilha do Fundão;
- (ii) Realizar a triagem inicial de produção de esterases, e a seguir, testar as estirpes bacterianas positivas para a produção de lipases, bioemulsificantes e biossurfactantes;
- (iii) Padronizar meios de cultivo contendo tributirina e policaprolactona para a triagem de poliesterases com potencial biodegradador de plástico;
- (iv) Verificar a estabilidade da atividade de poliesterase frente à diferentes faixas de pH e temperatura;
- (v) Avaliar a potencial degradação de diferentes tipos de plásticos utilizando um consórcio bacteriano.

4. Materiais e Métodos

4.1. Coleta das amostras plásticas

Para a realização deste estudo foram realizadas três coletas das amostras de lixo plástico ao longo de seis meses no ano de 2022 na Enseada de Bom Jesus (EBJ), na Ilha do Fundão, BG, Rio de Janeiro. As coletas de plásticos foram realizadas da seguinte maneira: a primeira foi conduzida na areia da orla da “prainha” na EBJ (05/06/22) e a segunda (28/08/22) e a terceira (29/11/22) foram realizadas nas águas da enseada com o auxílio do barco do Projeto OSL. A partir dessas expedições, resultou-se na coleta de plásticos flutuantes de quatro pontos distintos da EBJ (ponto 1: 22°51'50.9''S, 43°12'36.4''O; ponto 2: 22°51'42.9''S, 43°12'50.8''O; ponto 3: 22°51'53.3''S, 43°12'50.3''O; e ponto 4: 22°51'59.4''S, 43°12'42.3''O) (**Figura 4**). Após a coleta das amostras de plásticas, o seguinte desenho experimental descrito na **Figura 5** foi realizado ao longo deste projeto.

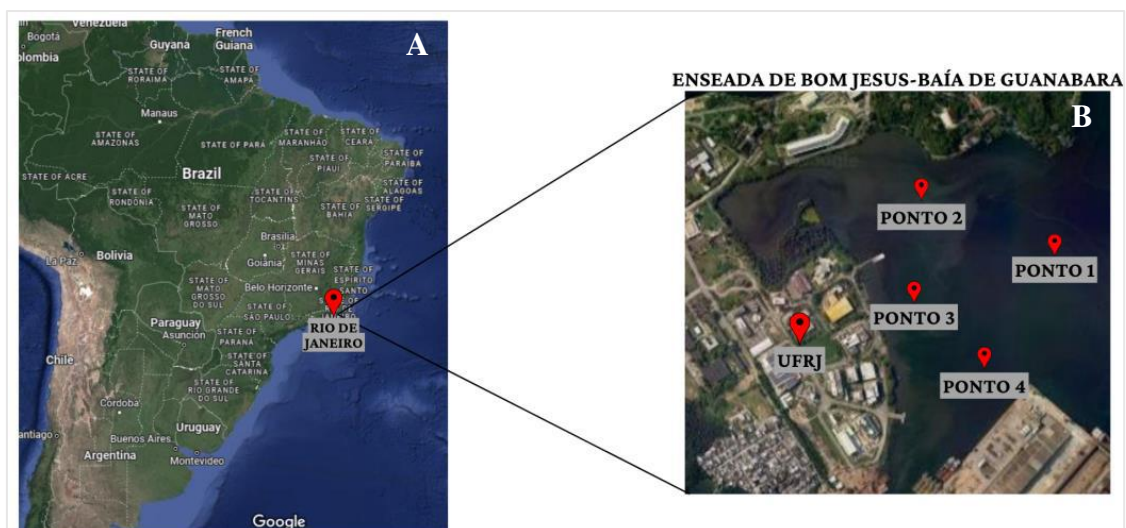


Figura 4: Pontos de coleta de plástico flutuante na Ensenada de Bom Jesus (EBJ), Ilha do Fundão, Rio de Janeiro. A: Mapa do Brasil, destacando o Rio de Janeiro. B: EBJ, com os pontos de coleta de amostras plásticas indicados (Autorização do uso de imagem no Anexo I).

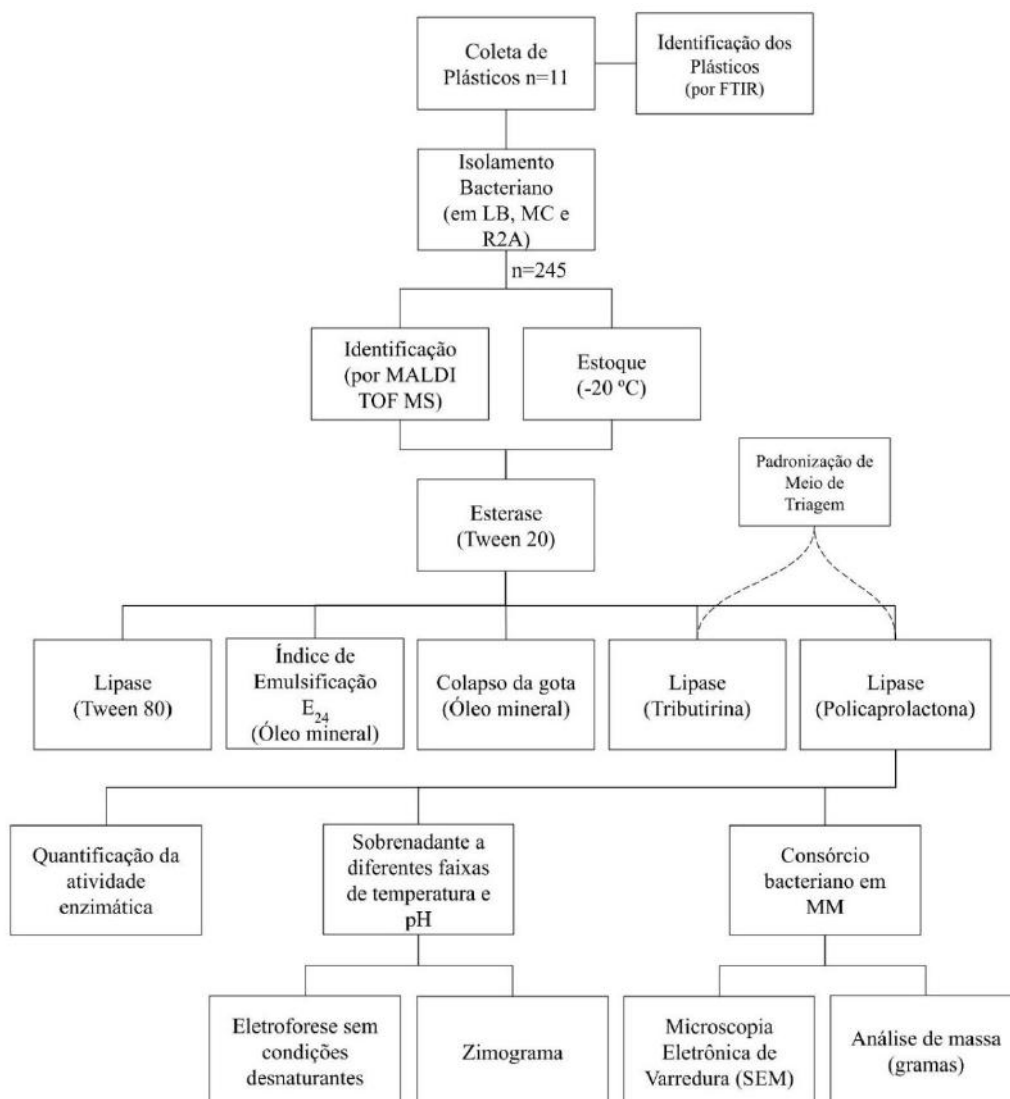


Figura 5: Desenho experimental do estudo. FTIR: Infravermelho por Transformada de Fourier; LB: Luria Bertani; MC: MacConkey; R2A: Reasoner's 2A; MALDI-TOF MS: do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*

4.2. Identificação das amostras plásticas

Os plásticos coletados foram inicialmente identificados e catalogados quanto a sua procedência (exemplo: distinção de sacolas, copos e embalagens). Além disso, estas amostras foram identificadas por meio de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR; modelo iS250; Thermo Scientific; *software* OMINIC) em colaboração com o Laboratório de Estudos Ambientais com Microplásticos (LABEAMP) do Departamento de Geoquímica da Universidade Federal Fluminense (UFF), coordenado pelo Prof. Dr. Wilson Thadeu Valle Machado. Esse método utiliza a radiação infravermelho para identificar um composto ou investigar sua composição química, e os espectros gerados serão analisados frente a uma biblioteca de dados de referência; a luz infravermelha é absorvida pela amostra em frequências específicas, que estão relacionadas com as vibrações dos grupos funcionais da molécula, com isso o resultado é um espectro que funciona como uma "impressão digital molecular" da amostra, permitindo a sua identificação (Cowger *et al.*, 2021).

4.3. Isolamento das bactérias

Duas abordagens de isolamento da plastisfera foram usadas, de acordo com Rasool e colaboradores (2021), com modificações: (1) pedaços ($2 \times 2 \text{ cm}^2$) de cada amostra foram cortados e transferidos para diferentes tubos contendo 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%, m/v) estéril. Então, cada tubo foi agitado vigorosamente, em vórtex, por 5 min para desprender as bactérias aderidas ao plástico. Posteriormente, uma alíquota de 100 μL da solução foi semeada em meio de cultura Luria Bertani (LB - Kasvi, Espanha), MacConkey (MC - Sigma-Aldrich, Alemanha) e R2A (Reasoner's 2A - Difco, França), em triplicata, para o isolamento bacteriano; (2) uma outra estratégia foi conduzida por meio da passagem de *swab* estéril diretamente na superfície plástica e, depois, o material foi semeado nos meios de cultura LB, R2A e MC. Também foi feito um meio mínimo (MM; %m/v: NaCl 1,0, Na_2HPO_4 0,5, KH_2PO_4 0,2, MgSO_4 0,02, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1) experimental suplementado com PVC em pó (0,1%, m/v).

As culturas foram incubadas a 27 °C por 24 h e a seleção de colônias foi realizada após esse tempo. Para cada morfotipo colonial, duas a três unidades formadoras de colônia (UFC) foram selecionadas, purificadas e estocadas em caldo LB acrescido de glicerol (30%) à -20 °C.

4.4. Identificação das estirpes isoladas por MALDI-TOF MS

As estirpes isoladas foram identificadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*). Para identificação bacteriana no equipamento espectrômetro de massas MicroflexLT (Bruker Daltonics, Alemanha), colônias purificadas das bactérias isoladas crescidas por 24 h a 27 °C em ágar LB foram transferidas, em duplicata, para os espaços delimitados na placa de aço polida (96 MSP, Bruker Daltonics®, Billerica, EUA) com uma haste de madeira estéril. Uma vez nesta placa, 1 µL de ácido fórmico (70%) foi colocado sobre as colônias presentes em cada espaço. Após a secagem sob temperatura ambiente, foram adicionados 1,5 µL de solução de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) e, novamente a placa foi seca à temperatura ambiente. Então, a placa foi levada ao equipamento para que ocorresse a identificação das estirpes a partir de valores de *scores* (**Quadro 3**) que, por sua vez, foram adotados para identificação das bactérias quanto ao gênero e/ou espécie de acordo com uma comparação com o banco de dados de peptídeos do equipamento. Os espectros detectados foram processados pelo *software* Biotyper versão 4.1.100 (Bruker Daltonics®), no modo operacional padrão. Como calibrador e controle para este método foi utilizada, em cada placa, a estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 em duplicata.

Quadro 3: Nível de confiança da identificação de acordo com os *scores* apresentados no MALDI-TOF MS.

<i>Scores</i> *	Identificação
2,300 ... 3,000	Altamente provável para espécie
2,000 ... 2,299	Segura para gênero, provável para espécie
1,700 ... 1,999	Provável para gênero
0,000 ... 1,699	Não confiável

* Valores considerados de acordo com as diretrizes do fabricante (Bruker Daltonics®).

4.5. Triagem enzimática: esterase e lipase

As bactérias foram cultivadas em 3 mL de caldo LB e incubadas por 48 h a 27 °C, sem agitação. Para a triagem enzimática, 20 µL das culturas das estirpes crescidas foram

inoculadas de forma puntiforme no meio ágar de Sierra (m/v: peptona 10,0; NaCl 5,0; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1; ágar 15,0) com adição dos substratos Tween 20 para esterase ou Tween 80 para lipase, ambos a uma concentração de 1% (v/v), após esterilização do meio de Sierra (Sierra, 1957). Tanto o Tween 20 quanto o 80 são detergentes não iônicos e são substratos de esterase e lipase, respectivamente, por isso são utilizados para ensaios *in vitro* para detecção de esterases e lipases (Sigma-Aldrich, 2024; BRENDA Enzyme Database, 2024). A interpretação dos resultados ocorreu pela avaliação de um halo de precipitação ao redor da colônia após incubação a 27 °C por 48 h (Sierra, 1975). O Índice Enzimático (IE) foi calculado através da razão entre o tamanho (mm) do halo e da colônia, no qual um valor de $\text{IE} \geq 2,0$ indica que a estirpe pode ser produtora da enzima (Hankin e Anagnostakis, 1975) (**Figura 6**).

Vale ressaltar que a triagem para esterases serviu como critério de seleção para os demais testes deste estudo, ou seja, apenas aquelas estirpes que apresentaram potencial positivo quanto à produção de esterases ($\text{IE} \geq 2,0$) foram testadas para produção de lipases, biossurfactantes e bioemulsificantes e poliesterases.

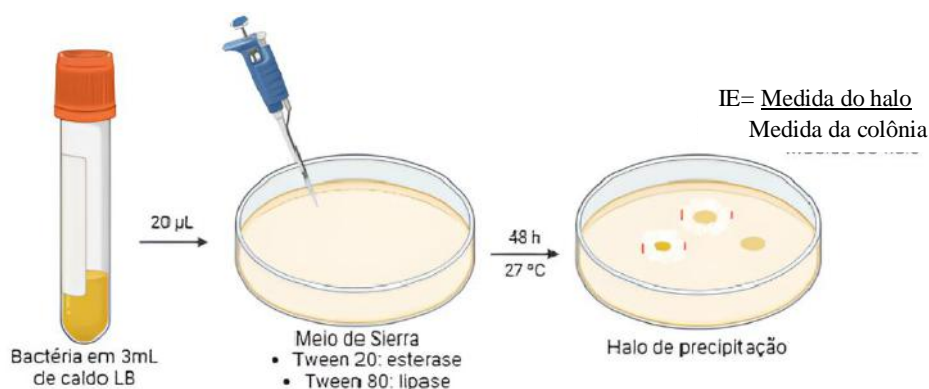


Figura 6: Etapas da triagem enzimática para detecção de esterases e lipases produzidas pelas estirpes bacterianas isoladas a partir da plastisfera da EBJ.

4.6. Triagem para produção de bioemulsificantes

A produção de bioemulsificantes foi investigada dentre as estirpes bacterianas potenciais produtoras de esterase, de acordo com Cooper e Goldenberg (1987) com modificações. Para isso, as bactérias consideradas positivas no teste de esterase foram cultivadas em meio mínimo (MM) e LB à 27 °C por 48 h. O sobrenadante livre de células

de cada cultura, obtido por centrifugação ($21.000 \times g/4^\circ\text{C}/15 \text{ min}$), e óleo mineral foram adicionados (1:1) a um tubo de vidro, seguido de agitação vigorosa em vórtex por 2 min. As misturas foram mantidas em repouso à 25°C por 24 h. O Índice de Emulsificação em 24 h (E_{24}) foi calculado pela razão entre a altura da camada de emulsão e a altura total da solução, multiplicado por 100. Foi utilizado SDS 10% (m/v) como controle positivo e meio de cultura LB ou MM estéril como controle negativo. As estirpes com $E_{24} \geq 25\%$ foram consideradas positivas.

4.7. Triagem para produção biossurfactantes

O teste qualitativo do colapso da gota avalia a presença de substâncias tensoativas (biossurfactantes) nas estirpes analisadas, e foi feito conforme descrito previamente, com adaptações (Jain *et al.*, 1991). Brevemente, esse teste consiste em adicionar uma gota de óleo mineral ($2 \mu\text{L}$) em uma superfície de poliestireno. Em seguida, a superfície é mantida em repouso por 1 h a 37°C , para o assentamento do óleo. Então, $5 \mu\text{L}$ do sobrenadante livre de células de cada estirpe crescida, obtido por centrifugação conforme descrito no item 4.6, são aplicados sobre a superfície do óleo. O formato da gota foi observado após 1 min. O achatamento da gota de óleo indicou um resultado positivo. O controle positivo foi SDS 10% e o negativo foi o meio de cultura LB ou MM estéril.

4.8. Padronização de meios de cultura para triagem da produção de poliesterases

Com o objetivo de padronizar meios de cultura para a triagem da produção de poliesterases, dois substratos distintos foram testados: tributirina (Sigma-Aldrich, Alemanha) e policaprolactona (Sigma-Aldrich, Alemanha) para todas as estirpes bacterianas que foram consideradas esterase-positivas no ensaio onde o meio foi suplementado com Tween 20.

4.8.1 Substrato enzimático: tributirina (TBT)

Para a triagem de poliesterases, um meio de cultura contendo tributirina (triglicerídeo composto por três moléculas de butirato) como substrato foi testado (Molitor *et al.*, 2020, com modificações). Brevemente, preparou-se o ágar LB ou o MM e, em seguida, foi adicionada a tributirina na concentração de 1% (v/v). Então, os meios foram agitados, autoclavados e vertidos em placas de Petri estéreis. A seguir, as estirpes foram inoculadas ($20 \mu\text{L}$) de maneira puntiforme no meio suplementado com tributirina

e incubadas a 27 °C por até 7 dias. Um resultado positivo se caracterizou pela ocorrência de um halo claro de degradação do substrato ao redor da colônia.

4.8.2 Substrato enzimático: policaprolactona (PCL)

Adicionalmente, um outro meio foi testado para a produção de poliesterases, no qual o meio mínimo autoclavado foi suplementado com uma solução de PCL 1% (m/v) preparada por meio da dissolução de *beads* de PCL em acetona (Merck, Alemanha). Após adicionar a solução de PCL-acetona ao meio de cultura autoclavado, este foi homogeneizado e vertido em placas de Petri estéreis (**Figura 7**).

As estirpes positivas para esterases foram inoculadas (20 µL) de forma puntiforme na superfície do ágar com PCL e as placas foram incubadas a 27 °C por até 7 dias. Um resultado positivo foi caracterizado com a formação de halos de degradação da PCL, caracterizados pela formação de halos de degradação da PCL, marcados por uma cor mais clara ao redor da colônia bacteriana em relação ao meio de cultura.

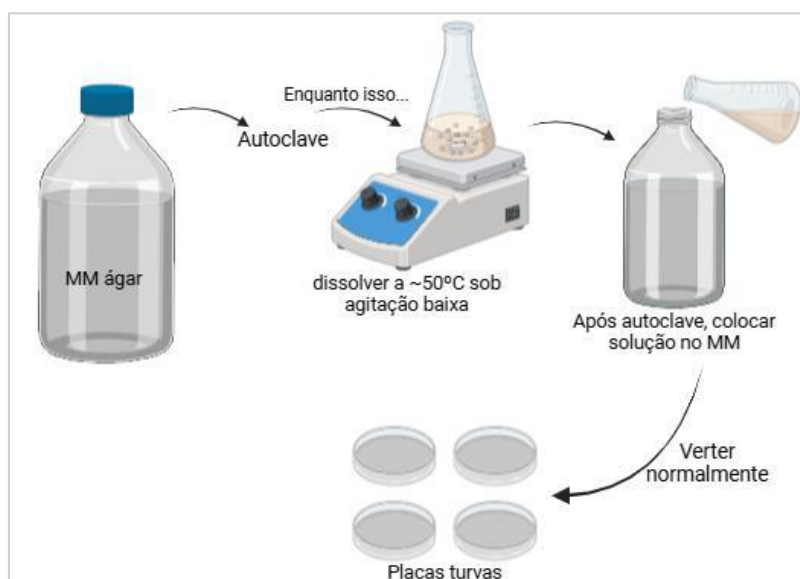


Figura 7: Esquema do preparo do meio mínimo (MM) com PCL (1%).

4.9. Investigação da atividade enzimática no sobrenadante livre de células e atividade enzimática e caracterização frente a diferentes faixas de temperatura e pH

As estirpes que apresentaram maiores halos de degradação no meio mínimo suplementado com PCL ($IE \geq 2,0$) nos testes de triagem foram selecionadas e avaliadas quanto à secreção da enzima para o meio extracelular. Para isso, o sobrenadante livre de células de cada cultura foi obtido por meio de centrifugação a 21.000 xg a 4°C por 15 min e filtrado em membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm (Biofil, China),

para minimizar a presença de células. Então, uma alíquota de 20 µL do sobrenadante filtrado foi aplicada em meio mínimo com PCL 1% e a formação de halos de degradação foi monitorada ao longo de uma semana.

Uma vez confirmada a atividade enzimática nos sobrenadantes livres de células, estes foram submetidos a diferentes faixas de temperatura (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e 65 °C durante 20 min), assim como a diferentes faixas de pH (5 a 11), que foi ajustado com NaOH (1M) ou HCl (1M) (Howard e McCarthy, 2023). A partir disso, uma alíquota de 20 µL do sobrenadante filtrado e tratado foi inoculado em meio mínimo com PCL e a formação de halos de degradação foi monitorada ao longo de uma semana. Como controle positivo foi adicionado o sobrenadante livre de células sem tratamento tanto quanto às diferentes faixas de temperatura quanto de pH.

4.10 Avaliação da atividade com sobrenadante liofilizado, filtrado e concentrado

Os sobrenadantes livres de células das estirpes que se destacaram na triagem em meio mínimo com PCL foram obtidos conforme o item 4.9. Depois, foram congelados a -20°C por 24 horas. Uma vez congelados, os sobrenadantes foram submetidos à liofilização. Após a liofilização, as amostras foram solubilizadas em água livre de nucleases e filtradas em filtros de polietersulfona de 0,22 µm (Biofil, China) para garantir a ausência de células. É válido salientar que a porção que foi ressuspensa em 500 µL de água deionizada foi pesada para que a concentração das amostras pudesse ser calculada. As amostras também foram concentradas em filtros de celulose de 3 kDa (Amicon, EUA), obtendo-se, assim, um “extrato bruto”. Para avaliar a atividade enzimática, alíquotas de 20 µL dos extratos brutos foram aplicadas em MM com PCL, juntamente de as alíquotas do sobrenadante somente após liofilização e do sobrenadante após liofilização e filtração a 0,22 µm. A formação de halos de degradação foi monitorada ao longo de uma semana

4.11 Avaliação da atividade no sobrenadante após precipitação das proteínas com sulfato de amônio

As estirpes que apresentaram os maiores halos de degradação do PCL no ágar MM foram cultivadas em 40 mL de meio LB por 48 h a 27 °C. Em seguida, os sobrenadantes livres de células das culturas das estirpes selecionadas foram transferidos (40 mL) para tubos estéreis e foi adicionado sulfato de amônio (Reagen, Brasil) a uma concentração final de 40% ou 60%, seguido de agitação (Chua *et al.*, 2013). Depois,

foram mantidos a 4 °C por 18 horas para que ocorresse a precipitação proteica. Então, as amostras foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições, exceto pela temperatura, que foi de 25°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as proteínas precipitadas foi solubilizado em água deionizada previamente autoclavada. O material ressuspensionado (denominado aqui de “precipitado”) foi aplicado de forma puntiforme (20 µL) em meio mínimo com PCL e acompanhado durante uma semana para avaliar a permanência de atividade enzimática pós-precipitação proteica.

A solução contendo o precipitado proteico foi, também, concentrada tanto em filtros de 3 kDa quanto de 50 kDa (Amicon, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Tanto a porção maior (retirada na membrana) quanto a menor que 3 e 50 kDa foram aplicados de forma puntiforme (20 µL) em MM com PCL e acompanhados durante uma semana, a fim de inferir qual porção continha a proteína responsável pela atividade enzimática observada em meio sólido.

4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem condições desnaturantes

Para a realização da eletroforese, o gel de poliacrilamida foi feito segundo descrito por Laemmli (1970), com modificações, constando de um sistema vertical e descontínuo. Foi preparado um gel de poliacrilamida 7,5% [44,9% (v/v) tampão 0,5M pH 8,8; 38,9% (v/v) acrilamida-bis-acrilamida; 15% (v/v) glicerol; 1% (v/v) persulfato de amônio 10%; 0,1% (v/v) tetrametil etileno diamina]. O gel foi colocado em um molde de vidro para eletroforese, que comporta 9 poços (BioRad, EUA).

A seguir, foi adicionado o *stacking* gel sobre o gel de poliacrilamida polimerizado que foi constituído por 56,9% (v/v) de água deionizada; 25,2% (v/v) de tampão Tris-HCl 0,5M pH6,8; 16,7% (v/v) de Acrilamida-Bis-acrilamida; 1% (v/v) de persulfato de amônio 10%; 0,1% (v/v) de tetrametil etileno diamina. Depois, os precipitados proteicos que mantiveram sua atividade foram preparados (3:1 de tampão não desnaturante) e aplicadas, de forma espelhada e em duplicata, nos respectivos poços do *stacking* gel já polimerizado.

Primeiramente, as amostras foram submetidas a eletroforese em uma corrente de 10 mA, por cerca de 30 minutos até que as proteínas chegassem ao final do *stacking* gel, para permitir que todas entrassem no gel de poliacrilamida ao mesmo tempo. Posteriormente, a eletroforese ocorreu a 20 mA por cerca de 1 hora. Ao final da eletroforese, o gel foi cortado na metade, preservando as amostras. Uma metade foi reservada em tampão Tris 20 mM pH 8 para que seja feito o zimograma e a outra foi

corada. As amostras foram aplicadas no gel para que as duas metades contivessem as mesmas amostras nas mesmas posições.

Para corar o gel e visualizar as proteínas, este foi mantido em solução corante de azul de Coomassie (USB Corporation, EUA) (0,125% de “*coomassie brilliant blue*” R-250; 50% (v/v) de metanol; 10% (v/v) de ácido acético) por cerca de 2 horas. A solução corante foi, então, descartada, e foi adicionada a solução descorante I [50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético] por cerca de 3 horas. Após esse tempo de incubação, foi adicionada a solução descorante II, que possui os mesmos reagentes da solução I, na concentração de 5 e 7%, respectivamente *overnight*. Por fim, o gel foi analisado com um transiluminador de luz branca e fotografado. Vale ressaltar que não foram utilizados marcadores de tamanho nesta eletroforese, porque foi necessária a ausência de condições desnaturantes para que o zimograma pudesse ser realizado.

4.13 Zimograma

O gel contendo as amostras de interesse foi reservado *overnight* em tampão Tris 20 mM e pH 8. Para realizar o zimograma, o gel foi retirado do tampão e colocado sobre uma placa contendo de meio mínimo com PCL. Em seguida, verteu-se 15 mL de meio mínimo com PCL sobre o gel. A placa foi mantida à 28 °C por 24 horas e inspecionada em busca de zonas mais claras sugestivas de degradação do substrato. Para fins de comparação e estimativa da fração proteica responsável pela atividade, comparou-se o zimograma ao gel corado com azul de Coomassie (Chua *et al.*, 2013).

4.14 Ensaio em microcosmos com consórcio de bactérias potenciais degradadoras de plástico

Foi feito um teste de antagonismo prévio ao inóculo, a fim de garantir que as estirpes selecionadas não iriam inibir uma à outra durante o crescimento. Esse teste foi feito a partir da semeadura de cada bactéria utilizada (a uma escala de 0,5 McFarland) com auxílio de um *swab* em placas contendo meio LB. Depois, as demais estirpes foram inoculadas de forma puntiforme (*spots* de 20 µL). Então, as culturas foram incubadas a 27 °C por 24 h. Quando não houve a formação de halo ao redor dos *spots* significou que as bactérias ali presentes não se inibiam (Nunes *et al.*, 2021).

Além disso, todos os plásticos foram previamente pesados em balança analítica (UniBloc ATX224, Shimadzu) antes de serem introduzidos nos meio microcosmos.

Aquelas estirpes que se destacaram por sua atividade de poliesterase em meio mínimo suplementado com PCL foram inoculadas juntas (250 µL de cada uma ajustadas a uma escala 0,5 McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de células) em 25 mL de meio mínimo líquido suplementado com diferentes tipos de plástico. Entre os plásticos selecionados, foram incluídos: polipropileno (PP, obtido a partir de copos, cortadas em pedaços de 2x2 cm), polietileno de alta densidade (PEAD, em *beads* e em forma de sacola plástica, cortadas em pedaços de 2x2 cm) e polietileno tereftalato (PET, obtido a partir de garrafas, cortadas em pedaços de 2x2 cm).

Com isso, foram preparados quatro *Erlenmeyers* com meio mínimo (25 mL) suplementado com cada plástico para inóculo do consórcio e quatro controles negativos, feitos com meio mínimo e plástico, sem inóculo bacteriano. Vale ressaltar que o meio foi autoclavado já na presença dos diferentes tipos de plásticos e o consórcio foi mantido por 56 dias a 27 °C, sem agitação. Ao longo desses dias, foi necessário adicionar alíquotas de glicose a 1% por duas vezes ao longo do experimento, uma após 6 dias e outra com 34 dias, para auxiliar o crescimento bacteriano nos microcosmos.

4.16 Análise por microscopia eletrônica de varredura (SEM) dos plásticos do consórcio

Para analisar possíveis alterações e/ou degradações na superfície dos plásticos após incubação com o consórcio bacteriano foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todas as amostras plásticas foram inicialmente lavadas com água estéril deionizada autoclavada, depois submersas em SDS 2% por cerca de 18 horas sob agitação baixa em temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas novamente com água e colocadas para secar em placas de Petri a 37 °C e levadas para microscopia (Zhao *et al.*, 2023 e Lv *et al.*, 2024) no Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa da UFRJ que fica localizado no campus de Duque de Caxias. Para observar a estrutura dos plásticos, estes foram cortados em pedaços menores com auxílio de estilete e alocados em *stubs* com fita de carbono e cobertos com uma fina camada de ouro e observados no microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA 3 LMU (TESCAN, República Tcheca) operando à 25 kV. A aquisição das imagens foi realizada por dois métodos: modo de varredura tradicional e método de *backscattering* (difração de retroespalhamento de elétrons) (Zhao *et al.*, 2023; Lv *et al.*, 2024).

5. Resultados

5.1. Coleta e identificação das amostras plásticas

Foram coletadas 11 amostras plásticas no total. Da coleta de lixo plástico da orla da prainha, foram obtidas cinco amostras, incluindo embalagens de biscoito, copo descartável e canudo. Já os plásticos flutuantes foram coletados da seguinte forma: uma amostra de plástico flutuante por ponto preestabelecido, conforme o item 4.1. A grande maioria dos plásticos flutuantes foram sacolas plásticas (**Figura 8**).

Vale ressaltar que na coleta do dia 29/11/2022 não foi possível encontrar plásticos nos pontos 3 e 4, por isso apenas duas amostras foram coletadas nessa expedição (pontos 1 e 2).



Figura 8: Exemplos de amostras plásticas flutuantes da EBJ (RJ – Brasil) coletadas no dia 28/06/2022.

Apenas as amostras plásticas flutuantes passaram por identificação via FT-IR. Na coleta de junho de 2022, a amostra do ponto 1 foi identificada como polietileno de baixa densidade (PEBD). As amostras provenientes dos pontos 2, 3 e 4 foram identificadas como polietileno de alta densidade (PEAD). Já em novembro de 2022 os plásticos coletados, somente dos pontos 1 e 2, foram identificados como polietileno (PE) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Catálogo das amostras plásticas utilizadas para bioprospecção bacteriana neste estudo.

Voucher da amostra plástica	Ponto	Data de Coleta	FT-IR	Tipo (observado na coleta)
C	Orla	05/06/2022	-	Canudo
PT	Orla	05/06/2022	-	Embalagem de Biscoito
R	Orla	05/06/2022	-	Embalagem de Biscoito
CD	Orla	05/06/2022	-	Copo Descartável
CH	Orla	05/06/2022	-	Embalagem de Biscoito
1.	Ponto 1	28/06/2022	PEBD	Sacola
2.1	Ponto 1	29/11/2022	PE	Sacola
2.	Ponto 2	28/06/2022	PEAD	Sacola
2.2	Ponto 2	29/11/2022	PE	Sacola
3.	Ponto 3	28/06/2022	PEAD	Sacola
4.	Ponto 4	28/06/2022	PEAD	Sacola

Identificação por FT-IR: PEBD: Polietileno de baixa densidade; PEAD: Polietileno de alta densidade; PE: Polietileno

5.2. Isolamento das bactérias da plastisfera da EBJ

Foram isoladas 245 estirpes no total, dessas, 85 (34,7%) foram provenientes do plástico da orla (amostras plásticas que não passaram por FT-IR) e 160 (65,3%) foram provenientes dos plásticos flutuantes. Do ponto 1 foram isoladas 59 bactérias, do ponto 2 foram isoladas 56, do ponto 3 foram isoladas 23 e do ponto 4, 22 estirpes (**Figura 9**).

Dentre os tipos de plásticos identificados por FT-IR o que apresentou maior número de bactérias isoladas neste estudo foi o PEAD ($n = 71$), seguido por PE ($n = 67$) e PEBD ($n = 22$) (**Figura 10**).

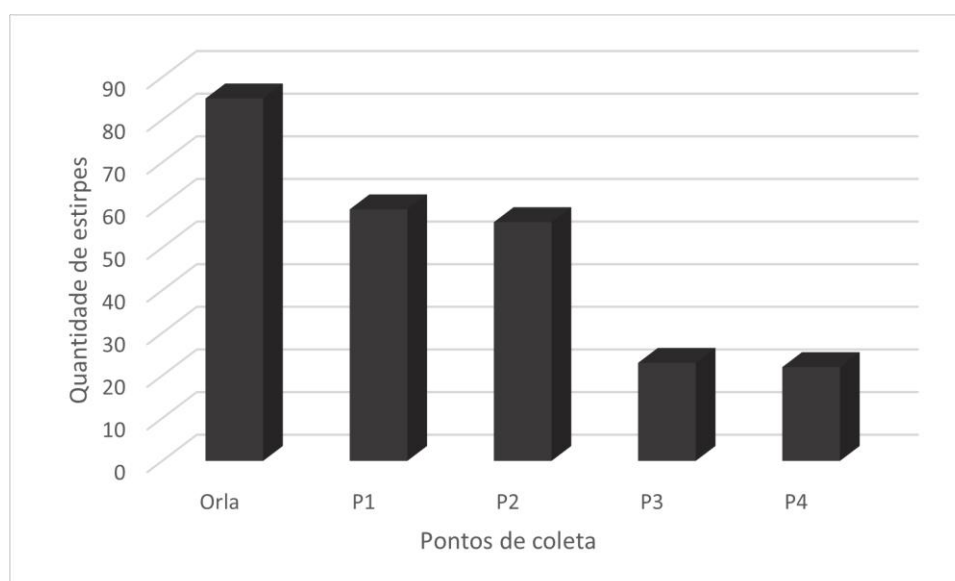


Figura 9: Quantidade de isolados (n= 245) em cada ponto de coleta de amostras plásticas ao longo do estudo.

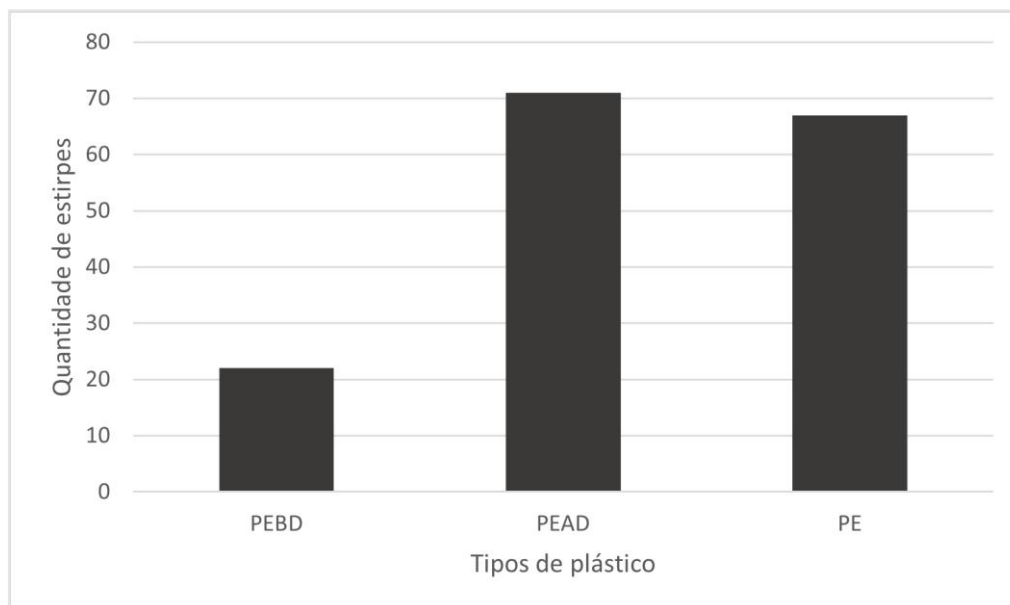


Figura 10: Número de bactérias isoladas em cada tipo de plástico identificado por FT-IR. Vale ressaltar que as amostras coletadas na orla não passaram por identificação em FT-IR, portanto não estão contabilizadas neste gráfico. PEBD: polietileno de baixa densidade; PEAD: polietileno de alta densidade; PE: polipropileno.

5.3. Identificação das estirpes isoladas por MALDI-TOF MS

Das 245 estirpes isoladas, 217 (87,8%) foram adequadamente identificadas por MALDI-TOF MS, sendo os gêneros em maior quantidade *Vibrio* ($n = 45$; 18,4%), *Aeromonas* ($n = 32$; 13%) e *Acinetobacter* ($n = 30$; 12,2%). Todos os gêneros isolados no presente estudo estão descritos na **Figura 11**. No total, 28 (11,4%) não foram identificadas por esta abordagem.

Em relação ao tipo de plástico, no PEAD, o gênero mais abundante foi *Aeromonas* sp. ($n = 12$), no PEBD foi *Bacillus* sp. ($n = 4$) e no PE foi *Vibrio* sp. ($n = 28$) (**Figura 12**). Os gêneros *Morganella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Proteus*, *Kluyvera* e *Priestia* não foram isolados nos plásticos provenientes da orla. Por outro lado, o gênero *Pantoea* foi encontrado exclusivamente em amostras plásticas oriundas da orla da prainha.

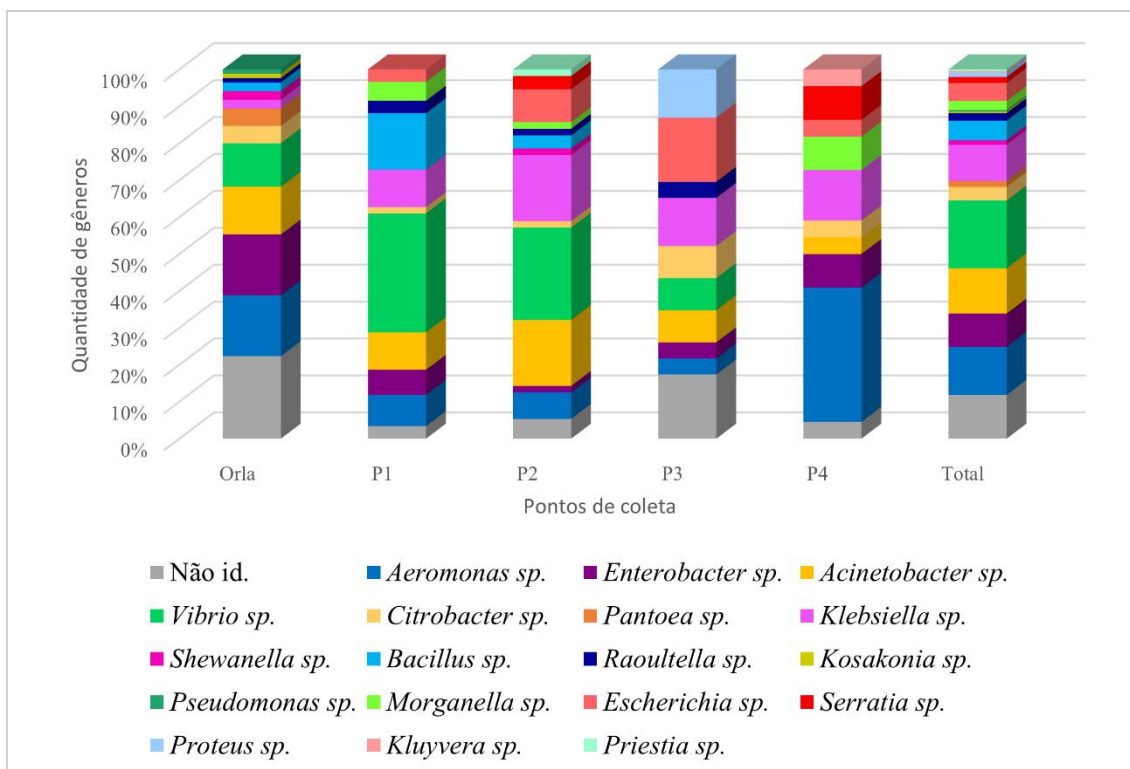


Figura 11: Quantidade de cada um dos 18 gêneros distintos isolados das amostras plásticas por ponto ao longo deste estudo. Não id: não identificado

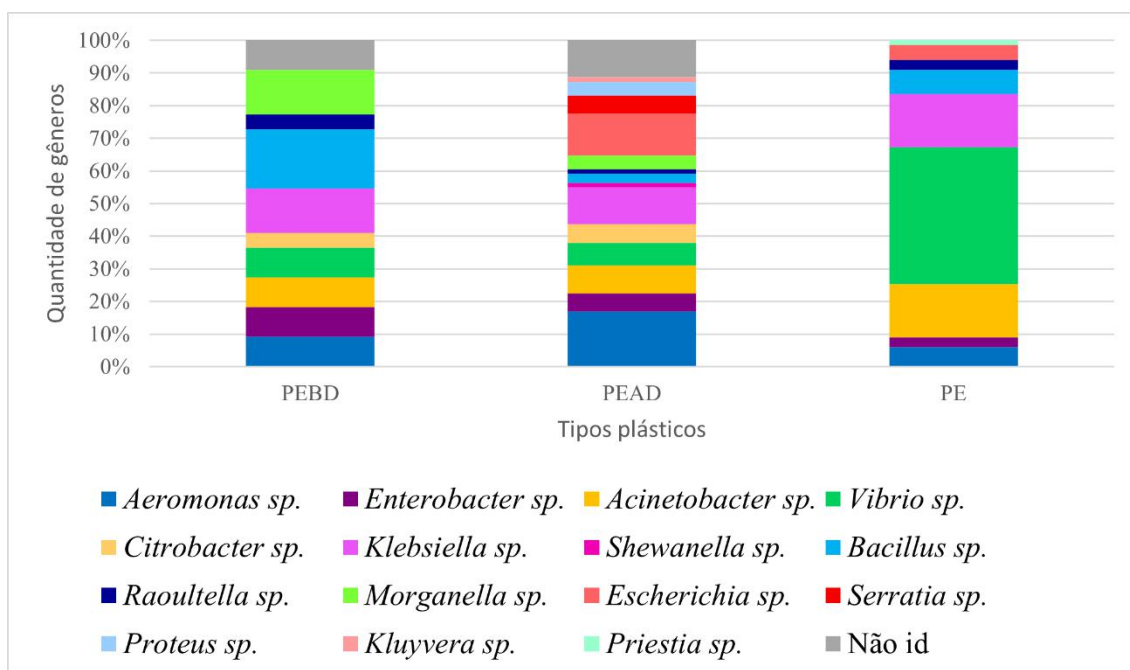


Figura 12: Diferentes gêneros bacterianos isolados por tipo de plástico. Não id: não identificado

5.4. Triagem enzimática: esterase e lipase

As 245 estirpes isoladas foram submetidas primeiramente à triagem para produção de esterase. Dessas, 75 (30,6%) apresentaram $IE \geq 2,0$, isto é, foram consideradas

positivas (**Figura 13**). Com destaque para *Serratia marcescens* L-V-2.1 que apresentou IE = 2,9.

A triagem para produção de lipase foi conduzida com as 75 bactérias positivas para esterase. Dessas, 13 (5,3%) apresentaram IE \geq 2,0, isto é, foram consideradas lipase-positivas (**Figura 14**). Com um destaque especial para a estirpe *V. fluvialis* PVC-7, que apresentou IE = 2,4. As demais estirpes com atividade estão especificadas na **tabela 2**.

Tabela 2: Estirpes com potencial produtor de esterase. Id: identificação.

Voucher	Ponto de coleta	id. MALDI-TOF	IE
PT-M-2	Orla	<i>Aeromonas</i> sp.	2,05
C-M-2	Orla	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2,04
CH-M-2	Orla	<i>Aeromonas veronii</i>	2,07
CH-M-3	Orla	<i>Aeromonas caviae</i>	2,53
CH-M-5	Orla	<i>Vibrio fluvialis</i>	2,37
CH-M-7	Orla	<i>Aeromonas caviae</i>	2,39
CH-M-8	Orla	<i>Aeromonas</i> sp.	2,7
CH-M-10	Orla	<i>Acinetobacter venetianus</i>	2,18
CH-M-11	Orla	<i>Acinetobacter</i> sp.	2,41
CH-M-12	Orla	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,48
CH-M-13	Orla	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,56
CH-L-3	Orla	<i>Aeromonas</i> sp.	2,18
CH-L-4	Orla	<i>Aeromonas</i> sp.	2,23
CH-L-6	Orla	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,42
CH-L-8	Orla	<i>Acinetobacter</i> sp.	2,34
CH-L-12	Orla	<i>Vibrio</i> sp.	2,6
PT-L-2	Orla	<i>Shewanella baltica</i>	2,21
PT-L-4	Orla	<i>Shewanella baltica</i>	2,05
PT-L-5	Orla	<i>Vibriosp.</i>	2,82
R-L-12	Orla	<i>Acinetobacter venetianus</i>	2,12
CD-M-7	Orla	<i>Pantoea</i> sp.	2,1
CD-M-9	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,3
CD-M-11	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,63
CD-L-2	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,1
CD-L-3	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,41
CD-L-4	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,39
CD-L-5	Orla	<i>Enterobacter bugandensis</i>	2,06
CD-L-6	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,05
CD-L-7	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,4
CD-L-8	Orla	<i>Enterobacter bugandensis</i>	2,08
CD-L-9	Orla	<i>Enterobacter</i> sp.	2,58
R-V-2.6	Ponto 2	<i>Aeromonas</i> sp.	2,03
R-V-3.3	Ponto 3	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,42

R-V-3.4	Ponto 3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2,43
R-V-3.6	Ponto 3	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2,01
R-S-1.1	Ponto 1	<i>Klebsiella</i> sp.	2,14
R-S-1.2	Ponto 1	<i>Citrobacter</i> sp.	2,03
R-S-1.4	Ponto 1	<i>Aeromonas</i> sp.	2,29
R-S-2.3	Ponto 2	<i>Escherichia</i> sp.	2,28
R-S-2.5	Ponto 2	<i>Escherichia coli</i>	2,19
R-S-3.5	Ponto 3	<i>Citrobacter freundii</i>	2,12
R-S-4.2	Ponto 4	<i>Citrobacter freundii</i>	2,04
R-S-4.3	Ponto 4	<i>Enterobacter</i> sp.	2,09
R-S-4.4	Ponto 4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
L-S-2.7	Ponto 2	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	2,24
L-S-3.2	Ponto 3	<i>Escherichia coli</i>	2,1
L-S-3.4	Ponto 3	<i>Escherichia coli</i>	2,63
L-S-4.1	Ponto 4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,4
L-S-4.3	Ponto 4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,49
L-S-4.4	Ponto 4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,69
L-S-4.6	Ponto 4	<i>Serratia rubidaea</i>	2,08
L-S-4.8	Ponto 4	<i>Morganella morganii</i>	2,95
L-V-1.1	Ponto 1	<i>Morganella morganii</i>	2,63
L-V-1.2	Ponto 1	<i>Morganella morganii</i>	2,28
L-V-1.3	Ponto 1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2,34
L-V-1.5	Ponto 1	<i>Bacillus megaterium</i>	2,24
PT-M-7	Orla	<i>Acinetobacter venetianus</i>	2,13
L-V-1.8	Ponto 1	<i>Enterobacter bugandensis</i>	2,68
L-V-2.1	Ponto 2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,98
L-V-2.2	Ponto 2	<i>Vibrio</i> sp.	2,18
L-V-2.3	Ponto 2	<i>Bacillus</i> sp.	2,33
L-V-2.4	Ponto 2	<i>Serratia marcescens</i>	2,57
L-V-2.5	Ponto 2	<i>Serratia nematodiphila</i>	2,39
L-V-2.6	Ponto 2	<i>Morganella morganii</i>	2,13
L-V-4.2	Ponto 4	<i>Aeromonas caviae</i>	2,27
L-V-4.3	Ponto 4	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2,23
L-V-4.4	Ponto 4	<i>Serratia marcescens</i>	2,4
PVC-8	Ponto 1	<i>Vibrio fluvialis</i>	2
2.2-L-S-6	Ponto 2	<i>Vibrio fluvialis</i>	2
2.2-L-S-4	Ponto 2	<i>Vibrio fluvialis</i>	2,48
2.2-L-S-5	Ponto 2	<i>Vibrio</i> sp.	2,13
2.1-L-S-3	Ponto 1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2,14
2.1-L-S-5	Ponto 1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2,19
PVC-6	Ponto 1	<i>Vibrio fluvialis</i>	2,03
PVC-7	Ponto 1	<i>Vibrio fluvialis</i>	2,45

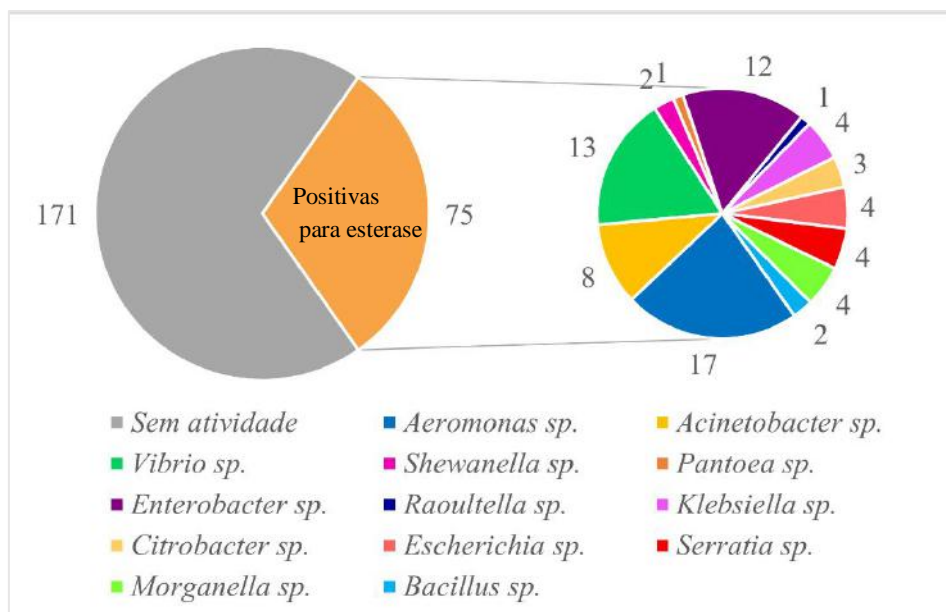


Figura 13: Bactérias potenciais produtoras de esterase e seus gêneros em quantidade absoluta.

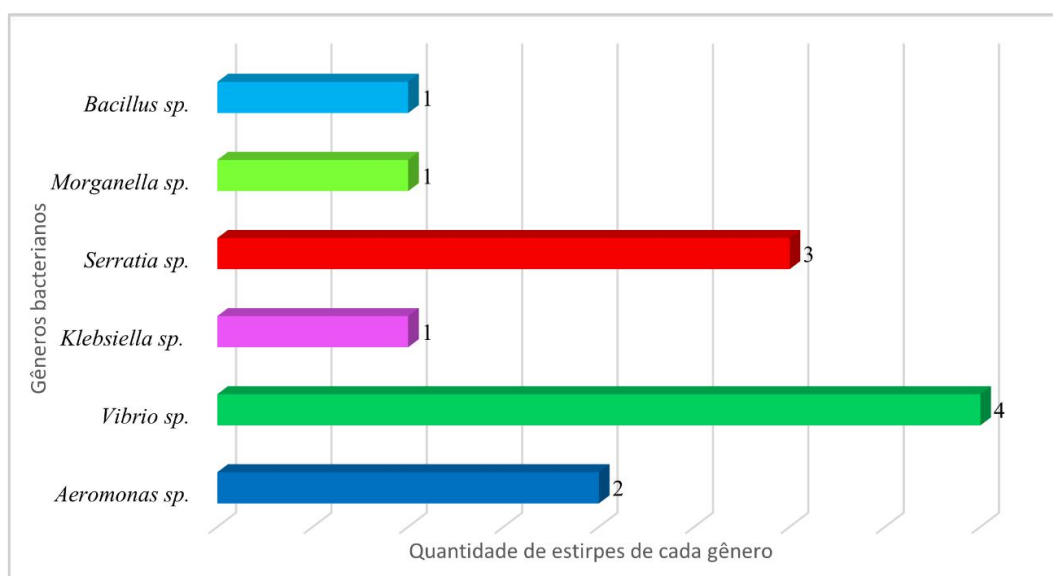


Figura 14: Bactérias potenciais produtoras de lipase testadas com Tween 80 e seus gêneros em quantidade absoluta.

5.5. Triagem para produção de bioemulsificantes e biossurfactantes

As 75 bactérias com potencial enzimático de produção de esterase pré-estabelecido foram testadas para a produção de bioemulsificantes a partir de cultivo em meio LB e meio mínimo. Das crescidas em meio mínimo, 15 (20%) foram capazes de formar emulsão e das crescidas em LB, três (4%) apresentaram formação de emulsão (**Tabela 3**). Aqui, destaca-se a estirpe *Shewanella baltica* PT-L-4 ($E_{24}=57\%$) cultivada no meio mínimo e *Pantoea sp.* CD-M-7 ($E_{24}=50\%$), cultivada no meio LB, sendo esta última positiva tanto em meio LB quanto no meio mínimo (**Figura 15**).

As 75 estirpes também foram avaliadas quanto a possível produção de biossurfactantes, assim, foram submetidas ao teste do colapso da gota, mas nenhuma delas apresentou resultado positivo.

Tabela 3: Estirpes bacterianas com potencial bioemulsificante

Estirpes	Origem	LB	MM
<i>Shewanella</i> sp.; PT-L-4	Orla		57%
<i>Pantoea</i> sp. CD-M-7	Orla	50%	50%
<i>Enterobacter</i> sp.; CD-M-9	Orla		38%
<i>Enterobacter</i> sp.; CD-L-2	Orla		42%
<i>Enterobacter</i> sp.; CD-L-4	Orla		46%
<i>Enterobacter</i> sp.; CD-L-6	Orla		47%
<i>Enterobacter</i> sp.; CD-L-7	Orla		57%
<i>Enterobacter</i> sp.; CD-L-9	Orla		56%
<i>Raoultella</i> sp.; R-V-3.4	P3		41%
<i>Serratia</i> sp.; L-V-2.5	P2		40%
<i>Morganella</i> sp.; L-V-2.6	P2		36%
<i>Serratia</i> sp.; L-V-4.4	P4		50%
<i>Vibrio</i> sp.; 2.2-L-S-4	P2		50%
<i>Vibrio</i> sp.; PVC-6	P1		50%
<i>Vibrio</i> sp.; PVC-7	P1		29%
<i>Vibrio</i> sp.; PVC-8	P1	33%	
<i>Acinetobacter johnsonii</i> ; L-S-2.7	P2	29%	
Controle positivo (SDS 10%)	-	70%	74%
Controle negativo (meio de cultura)	-	0%	0%

Foram consideradas apenas as estirpes que foram positivas em pelo menos um dos ensaios. Laranja: estirpes com atividade bioemulsificante ($E_{24} \geq 25\%$). Cinza: estirpes sem atividade bioemulsificante. LB: Teste feito com estirpes cultivadas em meio Luria-Bertani. MM: Teste feito com estirpes cultivadas em meio mínimo.

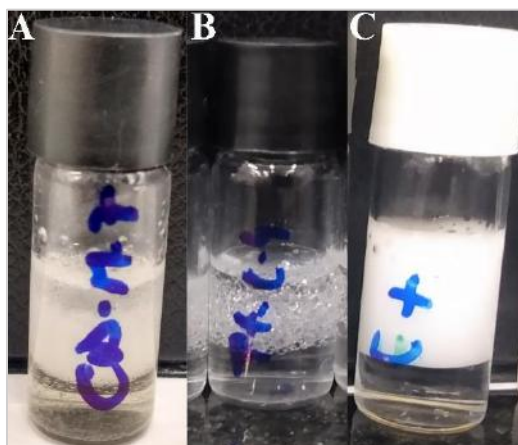


Figura 15: Imagens representativas da triagem para bioemulsificantes. A: *Pantoea* sp. CD-M-7 ($E_{24}=50\%$), cultivada em meio LB; B: *Shewanella baltica* PT-L-4 ($E_{24}=57\%$) cultivada em meio mínimo. C: Controle em MM, SDS (10%) ($E_{24}=74\%$).

5.6 Padronização de meios de cultura e triagem para lipases

5.6.1 Tributirina como substrato

Tanto o meio LB quanto o meio mínimo foram suplementados com tributirina e apresentaram resultados satisfatórios para a triagem de bactérias com atividade lipolítica (**Figura 16**). Dentre as 75 estirpes selecionadas previamente (positivas para esterase), 69 foram submetidas a triagem em meio LB. Dessas, duas (2,9%) apresentaram $IE \geq 2,0$ e foram consideradas potenciais produtoras de poliesterases. Neste ensaio, a estirpe *Enterobacter* sp. CD-M-9 apresentou $IE = 2,73$ (**Figura 16A**), com destaque dentre as demais. No ensaio em meio mínimo, 10 (14,9%) apresentaram $IE \geq 2,0$ e foram consideradas potenciais produtoras de poliesterases, com destaque para *Serratia rubidaea* L-S-4.6 que apresentou $IE = 5,38$ (**Figura 16B**).

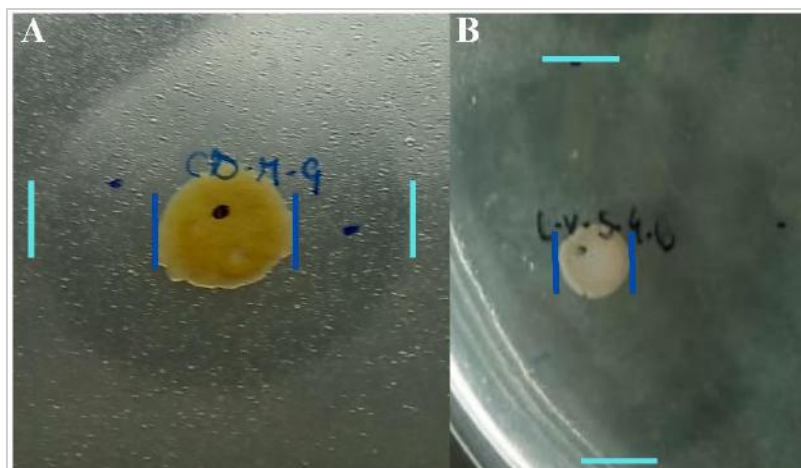


Figura 16: Triagem enzimática para poliesterases nos meios LB e mínimo suplementados com tributirina 1%. A: *Enterobacter* sp. CD-M-9 cultivado em LB com tributirina, halo de 30 mm. B: *S. rubidaea* L-S-4.6 em meio mínimo com tributirina halo de 43 mm. Em ambas as imagens a colônia bacteriana está destacada por barras em azul escuro e o halo de degradação por barras azul claro.

5.6.2 Policaprolactona como substrato

A padronização do meio mínimo suplementado com PCL 1% apresentou resultados promissores para ensaios de triagem de poliesterases. O meio ficou turvo após o preparo e as bactérias com atividade enzimática apresentaram halos de degradação do substrato ao seu redor de forma visível e possível de medir os seus tamanhos. Todas as estirpes viáveis (positivas para esterase) pré selecionadas foram submetidas à triagem nesse meio padronizado. Das estirpes esterase-positivas, 5 (8,2%, $n = 61$) apresentaram os melhores resultados indicativos de atividade enzimática. Essas estirpes incluem *V. fluvialis* PVC-7 ($IE = 1,7$), *Acinetobacter johnsonii* L-S-2.7 ($IE = 2,11$), *S. baltica* PT-L-4 ($IE = 2,13$), *S. rubidaea* L-S-4.6 ($IE = 2,4$), *Pantoea* sp. CD-M-7 ($IE = 3,12$) (**Figura**

17). Dentre as estirpes testadas, uma das estirpes, ainda que tenha obtido valor de IE < 2,0 *V. fluvialis* PVC-7 se destacou por ter atividade em todos os experimentos executados ao longo deste trabalho, exceto pelo colapso da gota (**Figura 18**).

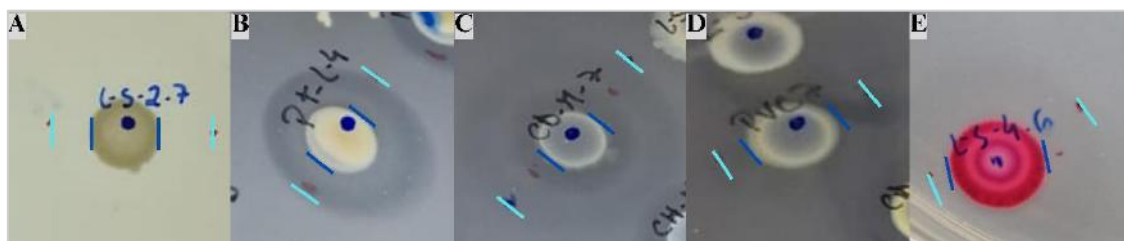


Figura 17: Triagem enzimática de poliesterases com o substrato PCL. A: *A. johnsonii* L-S-2.7, halo de degradação de 19 mm. B: *S. baltica* PT-L-4, halo de degradação de 17 mm. C: *Pantoea* sp. CD-M-7, halo de degradação de 25 mm. D: *V. fluvialis* PVC-7, halo de degradação de 17 mm. E: *S. rubidaea* L-S-4.6, halo de degradação de 24 mm. Em todas as imagens a colônia bacteriana está destacada por barras em azul escuro e o halo de degradação por barras azul claro.

	Esterase (Tween 20)	Lipase (Tween 80)	Lipase (TBT) MM	Lipase (TBT) LB	Bioemulsificante MM	Bioemulsificante LB	Biossurfactante	Lipase (PCL)
<i>Acinetobacter johnsonii</i> L-S-2.7								
<i>Shewanella baltica</i> PT-L-4								
<i>Pantoea</i> sp. CD-M-7								
<i>Vibrio fluvialis</i> PVC-7								
<i>Serratia rubidaea</i> L-S-4.6								

Figura 18: Panorama geral das cinco estirpes que apresentaram atividade em meio mínimo suplementado com PCL e nos demais ensaios de triagem enzimática e de substâncias tensoativas. Testes negativos em cinza e positivos em laranja.

5.7. Investigação da atividade enzimática no sobrenadante livre de células e caracterização frente a diferentes faixas de temperatura e pH

As estirpes analisadas foram aquelas com melhor resultado na triagem em meio mínimo com PCL, totalizando cinco selecionadas: *Pantoea* sp. CD-M-7, *V. fluvialis* PVC-7, *S. rubidaea* L-S-4.6, *A. johnsonii* L-S-2.7 e *S. baltica* PT-L-4. Dessas cinco, três mantiveram atividade no sobrenadantes após filtração (0,45 µm), sendo elas *S. baltica* PT-L-4, *S. rubidaea* L-S-4.6 e *V. fluvialis* PVC-7 (**Figura 19**). Com isso, os

sobrenadantes livres de células das três estirpes passaram por testes em diferentes faixas de temperatura (40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C e 65 °C) e pH (4, 6 e 10). O sobrenadante filtrado de *V. fluvialis* PVC-7 manteve sua atividade em todas as faixas de temperatura testadas, inclusive quando a cultura foi incubada a 37°C. A cultura de *S. rubidaea* L-S-4.6 manteve atividade somente quando testada em uma incubação de 37°C (**Figura 20**).

Todas os sobrenadantes livres de células foram sensíveis a mudança de pH em relação a atividade enzimática. Quanto às diferentes temperaturas, *S. rubidaea* L-S-4.6 não manteve atividade em nenhuma das condições testadas. Sendo a “condição controle positivo” na qual os sobrenadantes apresentaram atividade primariamente a 27 °C e pH 7,0.

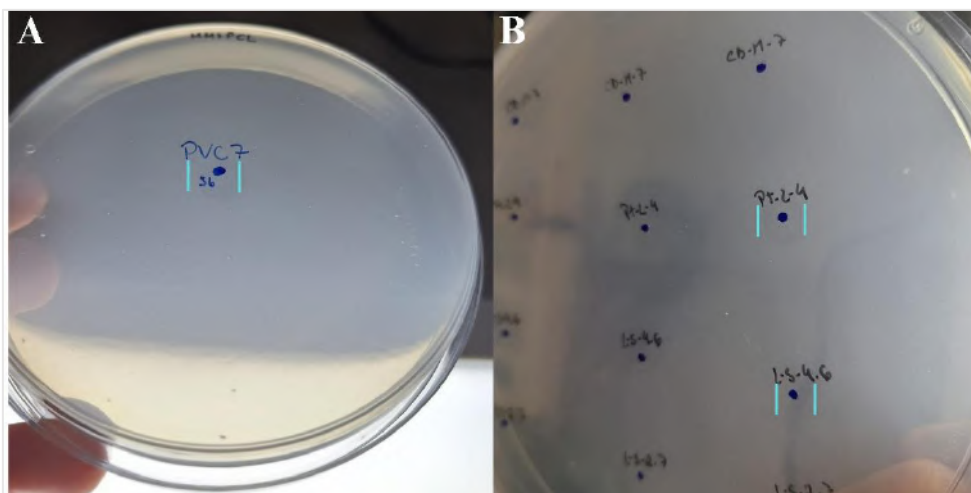


Figura 19: Testes de permanência da atividade de poliesterase envolvendo sobrenadantes filtrados. A: Atividade enzimática mantida na estirpe *V. fluvialis* PVC-7 B: *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6. B: Atividade enzimática mantida nas estirpes *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6.

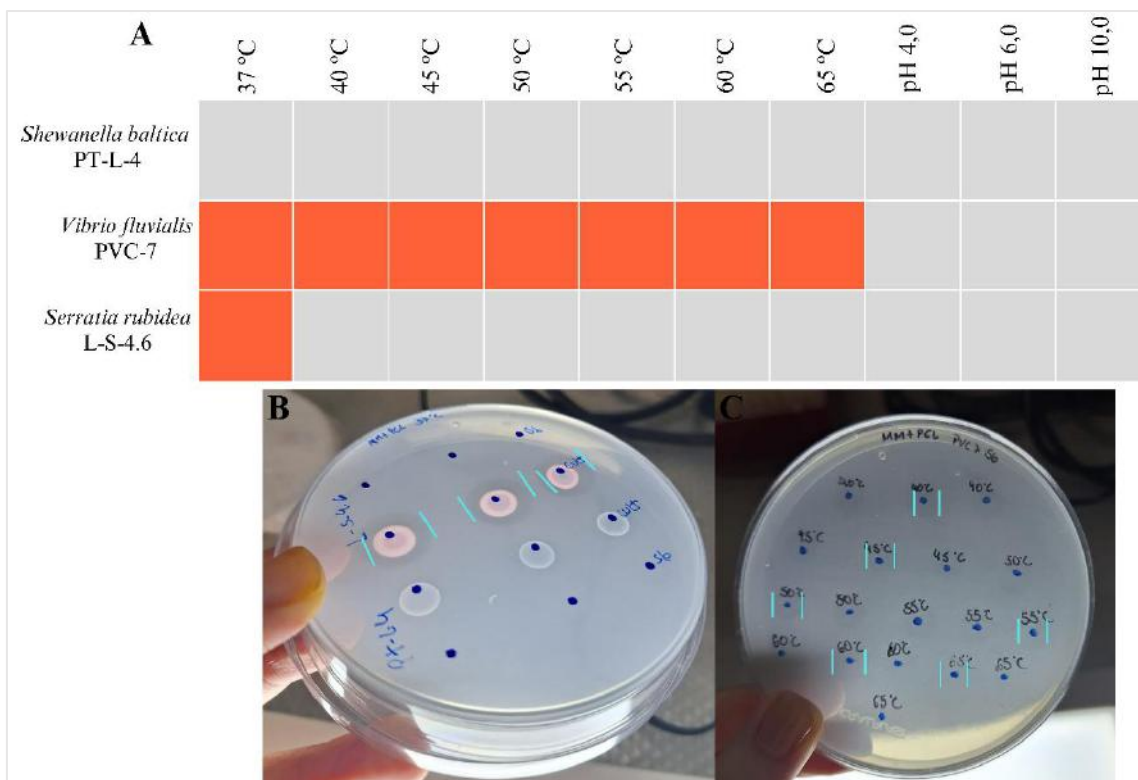


Figura 20: Panorama dos resultados dos testes envolvendo os sobrenadantes que mantiveram atividade de poliesterase após filtração. A: Atividade enzimática frente às diferentes condições de temperatura e pH testadas. Laranja: positivo; cinza: negativo. B: Atividade enzimática da estirpe *S. rubidaea* L-S-4.6 mantida após cultivo a 37° C. C: Atividade enzimática de poliesterase mantida no sobrenadante da estirpe *V. fluvialis* PVC-7 nas diferentes faixas de temperatura testadas. Condições controle positivo: 27 °C pH 7,0.

5.8. Avaliação da atividade com sobrenadante liofilizado, filtrado e concentrado

Os três sobrenadantes que mantiveram atividade de poliesterase foram testados (20 µL) em meio mínimo com PCL após liofilização, filtração em filtros de polietersulfona de 0,22 µm e concentração em filtros de celulose de 3 e 50 kDa e a filtração em filtros de polietersulfona de 0,22 µm. Os sobrenadantes liofilizados foram aplicados no MM com PCL nas seguintes concentrações: *S. rubidaea* L-S-4.6 a 11,4 g/L; *S. baltica* PT-L-4 a 13,6 g/L e *V. fluvialis* PVC-7 a 6,4 g/L.

O sobrenadante da estirpe *S. baltica* PT-L-4 apresentou atividade após ser liofilizada e solubilizada em água deionizada estéril (**Figura 21**). Nenhuma das três estirpes manteve atividade mediante a filtração e concentração.

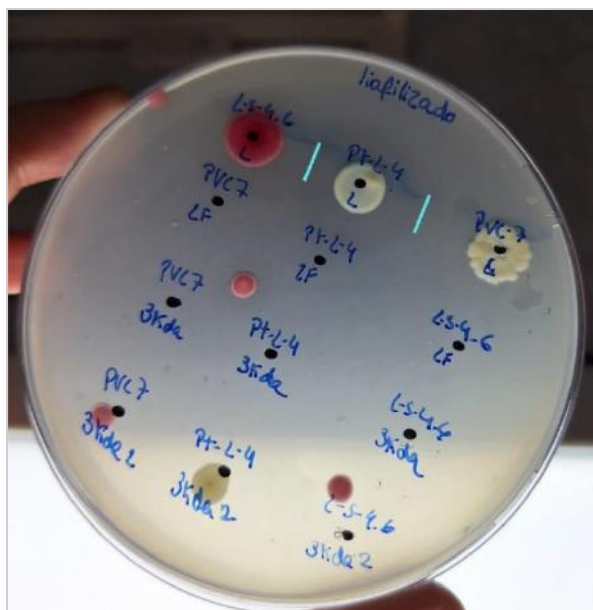


Figura 21: Atividade de poliesterase mantida na estirpe *S. baltica* PT-L-4 após ser liofilizada e solubilizada em água deionizada. Outras estirpes testadas sem atividade visível.

5.9 Avaliação da atividade de poliesterase após precipitação com sulfato de amônio e separação por massa molecular

Os sobrenadantes das estirpes *S. baltica* PT-L-4, *S. rubidaea* L-S-4.6 e *V. fluvialis* PVC-7 tiveram suas proteínas precipitadas com sulfato de amônio 40% e 60% bem como separadas em filtro Amicon (3 kDa 50 kDa). Como a atividade não foi mantida após concentração inicial em precipitação a 40% e separação a 3 kDa foi feito o teste em 50 kDa junto da precipitação a 60%. Foi observada atividade enzimática nos precipitados das estirpes *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6 (**Figura 22A**). Dessa vez (sulfato de amônio a 60%), apenas a estirpe *S. rubidaea* L-S-4.6 manteve atividade em seu extrato, sem filtração (**Figura 22B**). Logo, de acordo com a **Figura 22 A e B**, a porção proteica responsável pela atividade de poliesterase tem > 50 kDa.

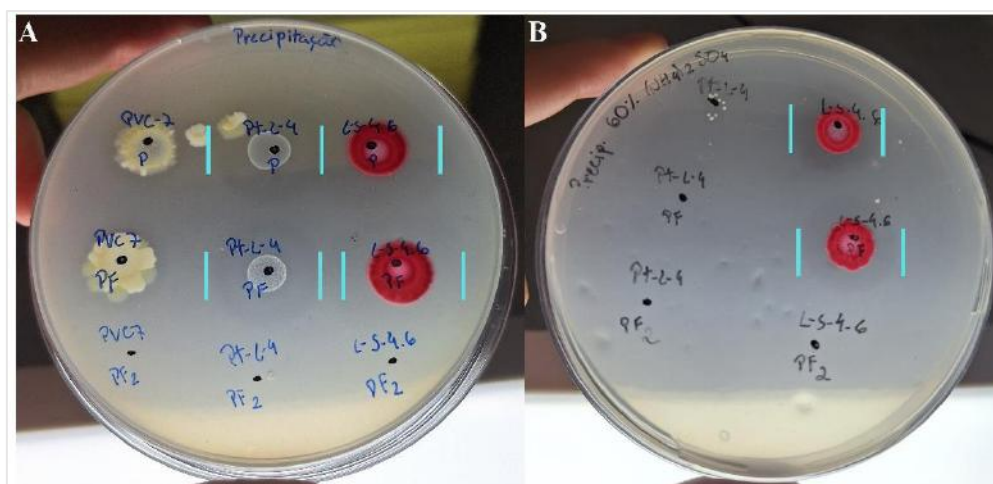


Figura 22: Atividade de poliesterase do extrato proteico (precipitado), indicado por “P” na placa. Atividade enzimática mantida na porção do extrato com proteínas > 3kDa, indicado por “PF” (A) e >50 kDa também indicado por “PF” (B). Ausência de atividade na porção do extrato com proteínas < 3kDa e <50 kDa, indicado por “PF₂”. Halos de degradação do substrato (PCL) indicados pelas barras em azul claro. A: Precipitação a uma concentração de sulfato de amônio de 40% e concentrada a 3 kDa. B: Precipitação a uma concentração de sulfato de amônio de 60% e concentrada a 50 kDa.

5.10 Perfil de proteínas e atividade enzimática

As proteínas presentes no extrato e a atividade enzimática, obtidas com sulfato de amônio a 40%, foram avaliadas por Native-PAGE e zimograma. Assim, os extratos proteicos das estirpes *S. rubidaea* L-S-4.6 e *S. baltica* PT-L-4 apresentaram os seguintes perfis proteicos (bandas) na **Figura 23A**, no entanto, a atividade enzimática sobre PCL ainda não foi observada nas condições testadas, de acordo com a comparação entre as bancas no gel e o zimograma (**Figura 23B**).

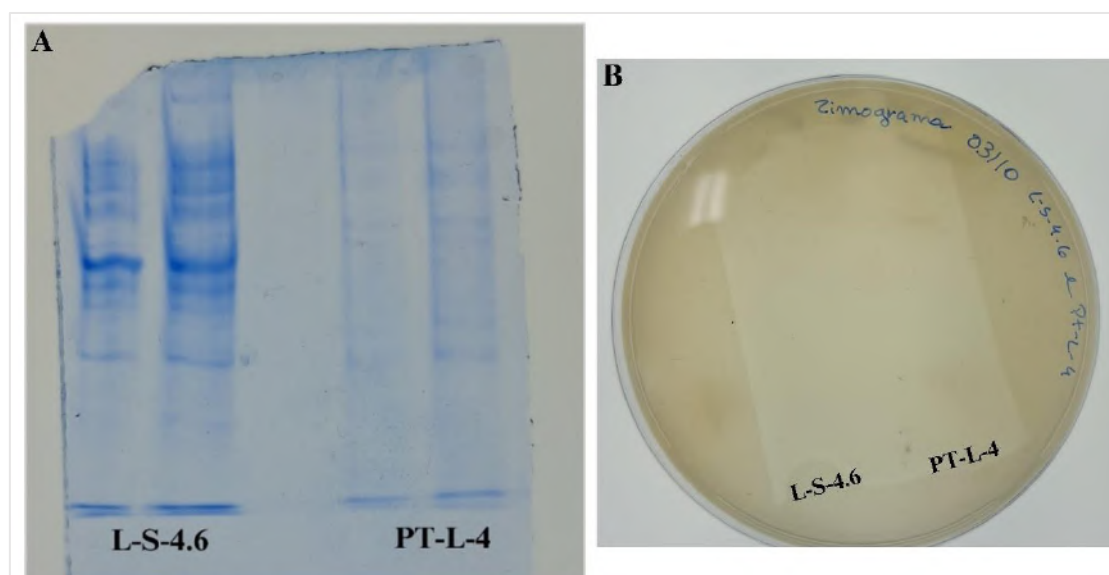


Figura 23: Resultados da eletroforese e do zimograma. A: perfil de proteínas em gel de poliácridamida corado com azul de Coomassie após eletroforese sem condições desnaturantes das estirpes *S. rubidaea* L-S-4.6 e *S. baltica* PT-L-4; B: Zimograma sem atividade nas estirpes *S. rubidaea* L-S-4.6 e *S. baltica* PT-L-4.

5. 11 Microcosmos com bactérias com potencial degradador de plástico

5.11.1 Antagonismo bacteriano, crescimento do consórcio e peso seco das amostras plásticas

Antes de iniciar o microcosmos contendo o consórcio bacteriano selecionado com as estirpes degradadoras de PCL: *Pantoea* sp. CD-M-7, *V. fluvialis* PVC-7, *S. rubidaea* L-S-4.6, *A. johnsonii* L-S-2.7 e *S. baltica* PT-L-4, todas estas foram analisadas quanto a uma possível atividade antagonista entre elas. Esta etapa foi essencial para evitar que uma estirpe tivesse ação inibitória sobre a outra do consórcio, inviabilizando assim a degradação do plástico usado como fonte de carbono no microcosmos. O teste de antagonismo realizado entre elas indicou que essas estirpes não se inibiam, portanto estavam aptas para a formulação do consórcio (**Figura 24**).

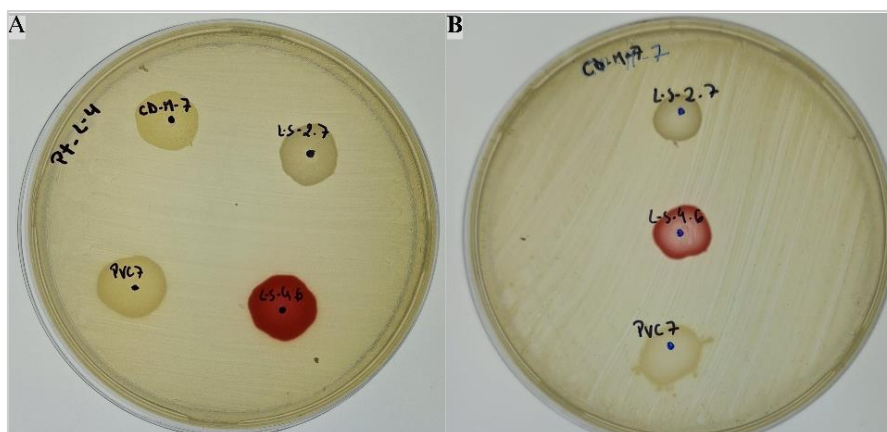


Figura 24: Testes de antagonismo (atividade antimicrobiana) entre as estirpes selecionadas para compor o consórcio de bactérias potenciais degradadoras de plástico. Não houve formação de halos de inibição, portanto não houve inibição entre as estirpes. A: atividade antimicrobiana de *Pantoea* sp. CD-M-7; *A. johnsonii* L-S-2.7; *V. fluvialis* PVC-7 e *S. rubidaea* L-S-4.6 contra *S. baltica* PT-L-4 (indicadora). B: atividade antimicrobiana de *A. johnsonii* L-S-2.7; *S. rubidaea* L-S-4.6 e *V. fluvialis* PVC-7 contra *Pantoea* sp. CD-M-7 (indicadora).

Inicialmente, foi observado que após o inóculo somente com os diferentes plásticos (PEAD em *beads*, PEAD em sacola, PET e PP) como fonte de carbono não houve crescimento bacteriano satisfatório, analisado pela turbidez do meio de forma visual. Portanto, após 6 dias, foi adicionada 1% de glicose e, novamente, após 34 dias do inóculo inicial. Desde a primeira adição de glicose houve um maior crescimento bacteriano (**Figura 25**). Uma das amostras de PEAD (sacola plástica) foi excluída do estudo porque foi observada contaminação no controle negativo. Logo, não foi realizada a análise de peso e nem a análise de degradação da superfície por microscopia nesta amostra.

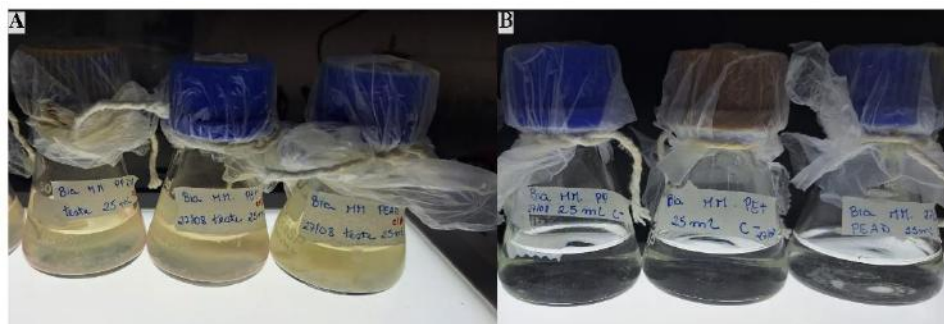


Figura 25: Consórcios bacterianos após 38 dias. A: Consórcio bacteriano com potencial degradador de plástico. B: Controle negativo (sem inóculo bacteriano).

As amostras plásticas foram pesadas antes da realização do inóculo e após a lavagem. Não houve grande perda do peso seco em nenhuma amostra (**Tabela 4**).

Tabela 4: Valores de pesos seco dos plásticos utilizados no consórcio bacteriano antes e depois do inóculo. Antes do tratamento antes da barra (/), depois do tratamento após a barra (/).

Teste/Controle	Tipos de Plástico			
	PEAD, 3 beads	PEAD, sacola	PET	PP
Teste	82,6 mg/ 82,5 mg	2,8 mg/ -	150,9 mg/ 150,3 mg	60,9 mg/ 61,2 mg
Controle -	86,9 mg/ 86,6 mg	2,9 mg/ -	143,6 mg/ 142,9 mg	60,2 mg/ 60,1 mg

PEAD: polietileno de alta densidade; PET: polietileno tereftalato; PP: polipropileno

5.11.2 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos plásticos do microcosmos

Após todos os plásticos retirados do microcosmos terem sido pesados, estes foram tratados para a análise por MEV, com o objetivo de avaliar se o consórcio bacteriano consumiu o plástico como fonte de carbono, revelando alguma possível degradação na superfície dos mesmos. A **Figura 26** representa algumas imagens e, assim, conclui-se que durante o tempo do microcosmos não foi possível detectar alterações na superfície das amostras plásticas sob as condições testadas. No entanto, como estes foram experimentos piloto, servirão de base para que futuras análises sejam melhoradas e o potencial degradador de plástico do consórcio bacteriano seja novamente avaliado.

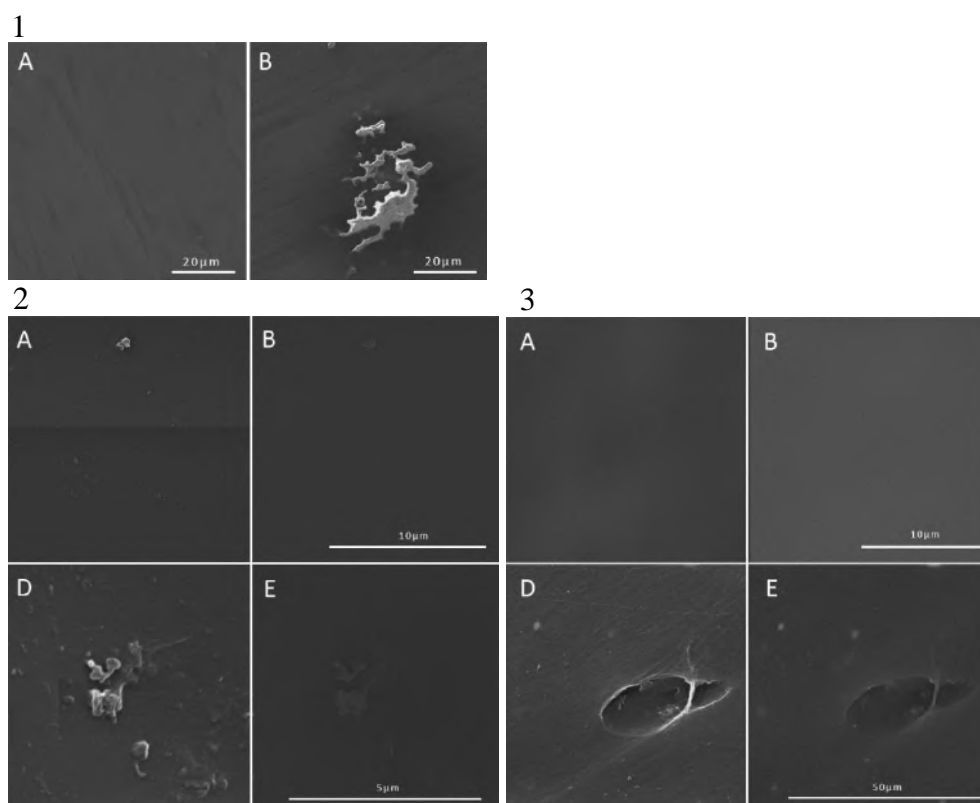


Figura 26: Imagens representativas das amostras plásticas removidas do microcosmos após 56 dias e analisadas por MEV. Amostras de plástico: (1) PEAD, A: controle negativo B: amostras plásticas após 56 dias no microcosmo. (2) PET e (3) PP. Para 2 e 3, A e B: Controle negativo, e D e E: amostras plásticas após 56 dias no microcosmo.

6. Discussão

Um dos plásticos mais utilizados em todo o mundo é o polietileno, presente em embalagens de shampoo, por exemplo (Atlas do Plástico, 2020). Sendo assim, é também um dos mais descartados, o que corrobora os resultados aqui observados mediante a análise por FT-IR. Quanto ao isolamento bacteriano, é importante lembrar que em uma das coletas não foram encontrados plásticos flutuantes nos pontos 3 e 4 da EBJ, o que configura um grande motivo para que os pontos 1 e 2 tenham sido a maior fonte de estirpes provenientes de plástico flutuante e também influencia na quantidade de estirpes isoladas por tipo de lixo plástico. Ademais, fatores como mudanças nos níveis de temperatura, pH da água, maré, quantidade de matéria orgânica presente no ambiente e salinidade influenciam a formação dessas comunidades bacterianas (Huang *et al.*, 2024). Por exemplo, as águas da EBJ na BG, região da coleta, sofrem alterações dessas condições. De acordo com Eichler e colaboradores (2020), a salinidade da água é maior na entrada da baía, por onde entra a água do mar, considerando que na parte central da BG o índice de salinidade varia de 30 a 34 pontos. Já a temperatura varia de 22 °C a 26 °C e, no verão, essa faixa sobe para 30 °C a 32 °C. O estudo de Eichler e colaboradores

(2020) também estudou as condições da BG por pontos e aquele mais próximo da EBG, Ilha do Fundão, teve as seguintes condições: a temperatura variou de 20 °C a 24 °C, os índices de salinidade ficaram entre 31 e 35 pontos, sendo que esses índices sofrem maior variação em águas superficiais.

Das estirpes isoladas, uma pequena quantidade (11,4%) não foi identificada pela metodologia empregada. Isso pode ocorrer por conta da ausência de padrões de identificação no banco de dados do MALDI-TOF, visto que esse equipamento possui em sua maioria padrões bacterianos de interesse clínico, o que faz com que algumas bactérias do âmbito ambiental não sejam contempladas e, portanto, não sejam identificadas por esse método. No entanto, a partir de dados de identificação molecular (marcadores genéticos sequenciados por exemplo) destas estirpes não identificadas pode-se alimentar o banco de dados do equipamento (Singhal *et al.*, 2015). Ademais, caso seja imprescindível a identificação destas estirpes, existem testes bioquímicos que podem ser empregados, que viabilizam a diferenciação de espécies com base em seus requerimentos nutricionais e atividades metabólicas. Também, a identificação poderá ser feita pelo sequenciamento do gene *rrs* (16S RNA).

O gênero *Vibrio* foi o mais abundante dentre a plastisfera analisada, o que corrobora com o fato de que esse gênero é ubíquo em ambientes marinhos (Canellas *et al.*, 2021). Assim como *Vibrio*, o gênero *Aeromonas*, segundo mais observado neste estudo, também é amplamente presente em ambientes aquáticos (Canellas e Laport, 2023). Estes gêneros bacterianos já foram previamente descritos em associação a partículas plásticas. Por exemplo, o estudo de Kimura e colaboradores (2023), descreveu o isolamento e caracterização de uma PBSase (enzima capaz de degradar PBS) proveniente de uma estirpe de *Vibrio ruber* isolada da plastisfera de PBS (polibutileno succinato) do mar de Usujiri, Japão, que estava a 10,6 °C no momento da coleta. A enzima heteróloga se manteve ativa quando expressa por *E. coli* BL21, com um nível de degradação estimado de 42 mg de filme de PBS por mg de proteína/enzima em um dia, a uma temperatura de 30 °C (Kimura *et al.*, 2023). *Aeromonas* spp. já foi isolada de resíduos plásticos e de microplásticos do mar Adriático com potencial atividade de degradação desses resíduos (Viršek *et al.*, 2017; Canellas e Laport, 2022).

Muitos estudos envolvendo a plastisfera têm as análises metagenômicas como modo principal de caracterização e bioprospecção da comunidade associada. Mas, para que ocorra um entendimento mais robusto e completo dos fenótipos e genótipos presentes nesse micro-ecossistema é importante integrar as análises metagenômicas às

análises dependentes de cultivo (Chen *et al.*, 2024). Para além de quais são os microrganismos ali presentes, a metagenômica permite estudar as possíveis relações das bactérias com o plástico e entre elas. Uma série de estudos prévios baseados em estratégias independentes de cultivo relatam a detecção de enzimas potencialmente ativas em plásticos (Pérez-García *et al.*, 2021; Chow *et al.*, 2022; Karunatilaka, Jaroszewski e Godzik, 2022; Effendi *et al.*, 2024). Contudo, é importante ressaltar que os plásticos são substratos relativamente recentes e a ocorrência de enzimas voltadas exclusivamente para a degradação destes polímeros é extremamente rara. Mais comumente, encontram-se na natureza hidrolases adaptadas à degradação de polímeros naturais como cutina, e que podem vir a ser aproveitadas como uma estratégia de assimilação de polímeros artificiais (Carr, Clarke e Dobson, 2020; Verschoor *et al.*, 2022). Ademais, a plastisfera não exerce papéis importantes somente na degradação do plástico, sendo especialmente importante quando se trata do ciclo do nitrogênio, contribuindo para nitrificação e emissão de óxido nitroso (Yang *et al.*, 2023; Su *et al.*, 2024).

O filo Pseudomonadota, (chamado anteriormente de Proteobacteria), do qual tanto o gênero *Vibrio* quanto *Aeromonas* fazem parte, foi ilustrado por Saleem e colaboradores (2023), por meio de *shotgun* metagenômica, como um dos mais abundantes na comunidade bacteriana presente em resíduos de polietileno (54%) provenientes de um local de despejo de resíduos em uma praia da China, o que está de acordo com os resultados obtidos a partir de estratégias dependentes de cultivo empregadas no presente trabalho. No estudo de Saleem e colaboradores (2023) também foi possível observar o potencial biotecnológico bacteriano da plastisfera, no qual observou-se a presença de diversos genes codificadores de enzimas potencialmente envolvidas com a biodegradação de PHA e de plásticos sintéticos, como as esterases e lipases, bem como a presença de genes codificadores de biosurfactantes. Dentre os genes de hidrolases detectadas no estudo, a lipase foi a segunda mais abundante ficando atrás apenas da peroxidase. No entanto, o isolamento e caracterização das moléculas não foi realizado.

No presente estudo, a estirpe *S. marcescens* L-V-2.1, isolada de uma sacola (PEAD) proveniente do ponto 2 de coleta na EBJ, destacou-se no teste de esterase por possuir um IE = 2,9. Existem relatos na literatura sobre estirpes da espécie *S. marcescens* como produtoras de esterase, porém, grande parte de trabalhos recentes citam estirpes que foram isoladas de solo contaminado ou intestino de insetos e não de ambientes marinhos (Bhardwaj *et al.*, 2021; Lou *et al.*, 2022), o que evidencia uma ausência na literatura em relação a bioprospecção de estirpes de *S. marcescens* produtoras de esterase isoladas de

plastisferas, oriundas de ambientes aquáticos. Por exemplo, Bhardwaj e colaboradores (2021) isolaram uma estirpe de *S. marcescens* de solo contaminado com plástico e óleo na Índia que foi capaz de produzir uma esterase extracelular caracterizada como de alta massa molecular e termotolerante (ativa em temperaturas de 50 °C a 60 °C, sendo 50 °C sua temperatura ótima a um pH de 8,5). Outro estudo realizou a clonagem de um gene codificador de esterase, *estS*, de uma estirpe de *Serratia* sp. proveniente de ambiente marinho e a expressou em *E. coli* BL21 (DE3). A enzima heteróloga foi capaz de manter boa atividade a 10 °C (termotolerante) e a 4 M de NaCl (sal-tolerante), o que a torna interessante industrialmente (Jiang *et al.*, 2016).

A estirpe *V. fluvialis* PVC-7 se destacou no teste de lipase com o substrato Tween 80 por ter o IE = 2,4. No teste de lipase que utilizou tributirina como substrato, a estirpe *S. rubidaea* L-S-4.6 se destacou. A espécie *V. fluvialis* já foi descrita como potencial degradadora de plásticos. Por exemplo, a revisão de Zhou e colaboradores (2024) chama atenção para uma estirpe de *V. fluvialis* isolada de resíduo plásticos da costa da Índia que apresentou atividade lipolítica após triagem em meio suplementado com polietileno de baixa densidade. A produção de lipase também já foi descrita no gênero *Serratia*. Nehal e colaboradores (2019) isolaram uma estirpe de *S. rubidaea* de resíduos de óleo capaz de produzir uma lipase com atividade máxima de 41,13 U/mL após otimização de condições de temperatura, pH, fonte de carbono e concentração de sais.

Vale citar que *Serratia* sp. possui um potencial biotecnológico exímio para além das enzimas. Pode-se fazer uma menção honrosa para o pigmento vermelho, prodigiosina, produzido por *Serratia* sp., que além de possuir aplicações na indústria têxtil, no tingimento de tecidos, por exemplo, também possui importância médica, como a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (Venil, Zakaria e Ahmada, 2013; Orlandi *et al.*, 2022). Conforme mostrado nas figuras 16, 19, 20, 21 e 23 dos resultados, o pigmento vermelho das estirpes de *Serratia* sp. foi presente nas culturas desse estudo, indicando a produção da prodigiosina, apesar de não ter sido caracterizada quimicamente.

A triagem para bioemulsificantes foi conduzida com as estirpes cultivadas tanto em meio LB quanto MM. O propósito de utilizar esses dois meios durante a triagem foi observar a diferença entre um meio rico, com muitos nutrientes (LB) e um meio composto apenas por elementos traços, com poucos nutrientes (MM), sendo que ao cultivar ou realizar triagens no MM espera-se que a bactéria seja forçada a metabolizar o substrato proposto para sobreviver, visto que não têm muitos nutrientes disponíveis no MM. Esta

hipótese está de acordo com os resultados encontrados, nos quais os resultados mais promissores foram detectados quando as estirpes foram cultivadas em MM. No E₂₄, a estirpe de destaque foi *S. baltica* PT-L-4, por possuir um E₂₄ = 57% após cultivo em MM, maior do que as outras estirpes positivas neste teste. Os relatos na literatura sobre essa espécie com origem marinha como potencial produtora de bioemulsificantes são escassos. Além dessa *S. baltica*, outras 16 estirpes também foram potenciais produtoras de bioemulsificantes, mas nenhuma apresentou potencial produção de biosurfactantes. Tanto as esterases, lipases e os bioemulsificantes ajudariam as bactérias a sobreviverem no ambiente hostil da BG, fazendo com que elas suportem melhor a pressão seletiva na qual estão inseridas (Narayanan, Ali e El-Sheekh, 2023). É importante ressaltar que para além do potencial biotecnológico previsto nessas biomoléculas, estas apresentam papéis fisiológicos que auxiliam na sua adaptação ao meio em que estão inseridas, como mecanismos de defesa contra outros microrganismos ou de aquisição de nutrientes (Freitas-Silva *et al.*, 2023).

A triagem de poliesterases foi feita inicialmente em MM ou LB suplementado com TBT. Carr e colaboradores (2022), utilizaram a tributirina como substrato inicial na bioprospecção de poliesterases oriundas de bactérias isoladas de esponjas marinhas ao norte do Oceano Atlântico. Com essa triagem inicial, foi possível identificar a estirpe *Brachybacterium ginsengisoli* B129SM11, que apresentou uma cutinase poliesterase-like em seu genoma, capaz de degradar outros substratos mais específicos como a PCL. No presente estudo, cinco estirpes (*A. johnsonii* L-S-2.7; *Pantoea* sp. CD-M-7; *V. fluvialis* PVC-7; *S. rubidaea* L-S-4.6) positivas para produção de poliesterase em MM suplementado com TBT também foram positivas em MM suplementado com PCL, reforçando a relação entre esses dois substratos.

Quando foi realizada a triagem de poliesterases com PCL como substrato em meio sólido, cinco estirpes se destacaram (*A. johnsonii* L-S-2.7; *S. baltica* PT-L-4; *Pantoea* sp. CD-M-7; *V. fluvialis* PVC-7; *S. rubidaea* L-S-4.6) pois apresentaram IE > 2,0. Conforme supracitado, os gêneros *Vibrio* e *Serratia* são conhecidos como produtores das enzimas aqui estudadas. O gênero *Pantoea* e a espécie *S. baltica* não são conhecidos como produtores de lipases. Já a espécie *A. johnsonii* e o gênero *Acinetobacter* como um todo foram descritos como potenciais produtores de enzimas, como a lipase e, são frequentemente isolados de áreas com alto impacto antropogênico (Dahal, Paul e Gupta, 2023; Nimkande, Krishnamurthi e Bafana, 2023), como a região da EBJ da BG. Um artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado a atividade

enzimática das estirpes supracitadas, sendo um dos poucos que relatam essa atividade em *Pantoea* sp. e *S. baltica* provenientes de plastisfera marinha (Canellas *et al.*, 2023).

Ademais, chamam atenção os resultados em comum do presente estudo, ou seja, estirpes que apresentaram resultados positivos em dois ou mais testes. Como um dos melhores métodos de triagem para poliesterases dependente de cultura atualmente é a suplementação de meio com PCL (Molitor *et al.*, 2020; Galarza–Verkovitch *et al.*, 2023), foi mais relevante observar as capacidades metabólicas das cinco estirpes que apresentaram melhor atividade nesse meio suplementado com PCL. Como destaque tem-se a estirpe *V. fluvialis* PVC-7 que apresentou atividade em todos os ensaios realizados neste trabalho (exceto no de biossurfactantes). Vale ressaltar que a estirpe PVC-7 foi isolada a partir de um meio suplementado com policloreto de vinila (PVC), o que pode priorizar certas vias metabólicas e favorecer a produção de enzimas e bioprodutos envolvidas na biorremediação (Howard e Mcarthy, 2023; Howard *et al.*, 2023).

Com o objetivo de concentrar as proteínas presentes nos sobrenadantes que mantiveram sua atividade (*S. baltica* PT-L-4; *V. fluvialis* PVC-7; *S. rubidaea* L-S-4.6) foi feita a liofilização. A estirpe *S. baltica* PT-L-4 manteve atividade. Porém os outros dois sobrenadantes não mantiveram atividade, o que significa que a enzima pode ser sensível ao congelamento prévio, condição necessária para liofilizar uma substância (Tamiya *et al.*, 1985; Privalov, 1990). Com isso, foi feita a precipitação com sulfato de amônio, também para concentrar as proteínas do sobrenadante. Essa metodologia é comumente empregada em trabalhos de bioprospecção de hidrolases com potencial degradador de plásticos (Chua *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2021; Khandare, Chaudhary e Jha, 2024). Dessa vez, mais sobrenadantes mantiveram sua atividade, sendo eles *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6, reforçando que a precipitação com sulfato de amônio é uma estratégia mais eficaz para este estudo.

A eletroforese em condições não desnaturantes foi realizada a partir do extrato proteico de *S. baltica* PT-L-4 e *S. rubidaea* L-S-4.6 obtido a partir da precipitação com sulfato de amônio a uma concentração de 40%. Já o zimograma não mostrou atividade até o momento. Nesta etapa do trabalho, ressalta-se o baixo número de trabalhos publicados que utilizam tal metodologia para a caracterização de enzimas ativas em plásticos. Dentre um desses trabalhos, tem-se o estudo de Chua e colaboradores (2013), no qual os autores relatam que foi possível observar bandas sugestivas de atividade enzimática ao realizar o zimograma em meio com PCL. Mas ao invés de ser realizado com o meio de cultura sólido com PCL, como foi feito neste estudo, foi utilizado o próprio

gel de poliacrilamida a 8% suplementado com PCL. Essa seria uma alternativa futura, caso a atividade enzimática ainda não apareça nos próximos testes. Essa atividade enzimática visível no zimograma é importante, pois a partir dela é possível realizar um SDS-PAGE (com condições desnaturantes) a partir da banda que mostrou atividade e, assim, caracterizar a enzima quanto ao seu tamanho molecular.

Ainda para caracterizar as proteínas responsáveis pela atividade de poliesterasas observada em placa, foi feito um primeiro ensaio colorimétrico para sua quantificação, com os substratos *p*-nitrofenil butirato (Sigma-Aldrich, Alemanha; esterase) e *p*-nitrofenil laurato (Sigma-Aldrich, Alemanha; lipase) (resultados não apresentados). Esse ensaio primário foi realizado no Laboratório de Engenharia de Sistemas Biológicos da Escola de Química no Centro de Tecnologia da UFRJ. Os resultados prévios chegaram a apresentar alta atividade de esterase para a estirpe *S. baltica* PT-L-4, porém, ao repetir o teste para lipase e testar os sobrenadantes sob diferentes diluições, houve inconsistências quanto a atividade apresentada previamente. Essas inconsistências podem ser provenientes de uma concentração alta da enzima no sobrenadante ou do fato que o substrato de lipase é sensível à luz e pode ter sofrido alterações antes/durante o teste. Um ensaio colorimétrico semelhante foi conduzido por Kim e colaboradores (2024), que além de apresentarem o ensaio colorimétrico como uma forma de quantificar a atividade enzimática por meio da medição da densidade óptica, também apresenta métodos colorimétricos como uma forma de otimizar o processo laborioso de bioprospecção dessas enzimas com métodos dependentes de cultivo.

Conforme previamente demonstrado por Howard e colaboradores (2023), Robert e colaboradores (2020) e Joshi e colaboradores (2022), consórcios bacterianos podem ser uma forma de aumentar a eficiência e rapidez do processo de degradação de plástico por enzimas bacterianas. Com isso, foi feito um teste piloto com o objetivo de analisar se a eficiência de cada enzima seria aumentada quando combinada a outras em um microcosmos. Podem-se especular fatores que podem ter influenciado os resultados obtidos neste estudo apresentados a partir do microcosmos: a maioria dos plásticos disponíveis no momento (cortados de embalagens usadas) do experimento eram plásticos usados, portanto alguns danos presentes na superfície do plástico observada pelo MEV podem ser marcas de uso e não devido à degradação bacteriana; além disso o PET usado no dia a dia é altamente cristalino e resistente, o que dificulta muito a sua degradação; o tempo de incubação de 56 dias pode não ter sido suficiente para que algum sinal de degradação do plástico pelo consórcio bacteriano fosse detectado nas imagens obtidas.

Para contornar esses desafios, algumas das soluções para melhorar o desenho experimental do microcosmos proposto seriam: utilizar plásticos novos, utilizar PET amorfo (possui a estrutura menos cristalina, ou seja, menos resistente) nas primeiras triagens e aumentar o tempo de incubação do consórcio como realizado por Chen e colaboradores (2024). Portanto, esse microcosmos piloto serviu para que, futuramente, ele seja refeito de uma forma adaptada visando maximizar a eficiência de degradação de plásticos pelas enzimas microbianas. Um outro ponto que pode ser mencionado é o fato de que as estirpes utilizadas nos experimentos foram as selvagens. Dessa maneira, abordagens de biologia molecular e sintética, por exemplo, podem ser úteis para otimizar a expressão das enzimas-alvo e maximizar sua aplicabilidade na degradação de poliésteres (Kimura *et al.*, 2023; Salem *et al.*, 2023).

7. Conclusões e perspectivas futuras

No atual trabalho, foi possível o isolamento e identificação de estirpes bacterianas a partir de amostras plásticas coletadas na EBJ. Além de testá-las para a produção de enzimas e substâncias tensoativas com potencial para biorremediação e, a partir disso, estabelecer a EBJ (ambiente cronicamente poluído) como um modelo de estudo com fontes sustentáveis e promissoras para a bioprospecção de soluções biotecnológicas com potencial biorremediador. Os meios padronizados com os substratos TBT e PCL funcionaram como esperado mediante as referências que serviram de base. Com destaque para as cinco estirpes que obtiveram melhor atividade em MM suplementado com PCL, *A. johnsonii* L-S-2.7; *S. baltica* PT-L-4; *Pantoea* sp. CD-M-7; *V. fluvialis* PVC-7; *S. rubidaea* L-S-4.6. A caracterização mais específica das enzimas do grupo das poliesterases, realizada a partir do sobrenadante bacteriano, foi iniciada e será conduzida no futuro, graças a colaborações estabelecidas ao longo do trabalho. Esse estudo também reforça a relevância da abordagem dependente de cultivo e como é favorável buscar microrganismos com potencial biorremediador no próprio ambiente poluído, devido à pressão seletiva na qual eles estão inseridos. Importante ressaltar estudos acerca da identificação da plastisfera da BG e caracterização de seu potencial biotecnológico são escassos, ainda mais vislumbrando a caracterização do seu potencial biotecnológico.

8. Referências Bibliográficas

- Alves, V. E., e Figueiredo, G. M. (2019). Microplastic in the sediments of a highly eutrophic tropical estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 326-335
- Adetunji, A. I., e Olaniran, A. O. (2021). Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 669-679

- Anjana, K., Hinduja, M., Sujitha, K., e Dharani, G. (2020). Review on plastic wastes in marine environment—Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110733
- Ayilara, M. S., e Babalola, O. O. (2023). Bioremediation of environmental wastes: the role of microorganisms. *Frontiers in Agronomy*, 5, 1183691
- Bartaburu, X. e Johnson, A. (2023). The endless struggle to clean up Rio de Janeiro's highly polluted Guanabara Bay. Disponível em: <<https://news.mongabay.com/2023/08/the-endless-struggle-to-clean-up-rio-de-janeiros-highly-polluted-guanabara-bay/>>. Acesso em 10 jun. 2024
- Belli, I. M., Cavali, M., Garbossa, L. H. P., Franco, D., Bayard, R., e de Castilhos Junior, A. B. (2024). A review of plastic debris in the South American Atlantic Ocean coast—Distribution, characteristics, policies and legal aspects. *Science of The Total Environment*, 938, 173197
- Bhardwaj, K. K., Kishen, S., Mehta, A., Sharma, A., e Gupta, R. (2021). Purification of high molecular weight thermotolerant esterase from *Serratia* sp. and its characterization. *3 Biotech*, 11(6), 308
- Bracco, P., van Midden, N., Arango, E., Torrelo, G., Ferrario, V., Gardossi, L., e Hanefeld, U. (2020). *Bacillus subtilis* lipase A—Lipase or Esterase?. *Catalysts*, 10(3), 308
- BRENDA Enzyme Database (2024). Disponível em:< <https://brenda-enzymes.org/>>. Acesso em 12 jun. 2024
- Brito, G. F., Agrawal, P., Araújo, E. M., e Mélo, T. J. A. (2011). Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 6(2), 127-139
- Canellas, A. L. B., Abdon, B. B., Diniz, M. N., da Silva Oliveira Alves, G., de Paula Lourenço, M. F., Machado, W. T. V., Giambiagi-de Marval, M., de Oliveira, B. F. R., e Laport, M. S. (2023). Antimicrobial resistance and biotechnological potential of plastic-associated bacteria isolated from an urban estuary. *Environmental Microbiology*, 25(12), 2851-2863
- Canellas, A. L. B., e Laport, M. S. (2023). The biotechnological potential of *Aeromonas*: A bird's eye view. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(5), 543-555
- Canellas, A. L., Lopes, I. R., Mello, M. P., Paranhos, R., de Oliveira, B. F., e Laport, M. S. (2021). *Vibrio* species in an urban tropical estuary: Antimicrobial susceptibility, interaction with environmental parameters, and possible public health outcomes. *Microorganisms*, 9(5), 1007
- Carr, C. M., Clarke, D. J., e Dobson, A. D. (2020). Microbial polyethylene terephthalate hydrolases: current and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 11, 571265
- Carr, C. M., de Oliveira, B. F. R., Jackson, S. A., Laport, M. S., Clarke, D. J., e Dobson, A. D. (2022). Identification of BgP, a cutinase-like polyesterase from a deep-sea sponge-derived *Actinobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 888343
- Carniel, A., dos Santos, N. F., Buarque, F. S., Resende, J. V. M., Ribeiro, B. D., Marrucho, I. M., Coelho, M. A. Z. e Castro, A. M. (2024). From trash to cash: current strategies for bio-upcycling of recaptured monomeric building blocks from poly (ethylene terephthalate) (PET) waste. *Green Chemistry*, 10.1039
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, L. S., e Suh, S. (2020). Degradation rates of plastics in the environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494-3511
- Chang, T., Yin, H., Yu, X., Wang, L., Fan, L., Xin, J. H., e Yu, H. (2022). 3D PCL/collagen nanofibrous medical dressing for one-time treatment of diabetic foot ulcers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 214, 112480
- Chen, J., Jia, Y., Sun, Y., Liu, K., Zhou, C., Liu, C., Li, D., Liu, G., Zhang, C., Yang, T., Huang, L., Zhuang, Y., Wang, D., Xu, D., Zhong, Q., Guo, Y., Li, A., Seim, I., Jiang, L., Wang, L., Lee, S. M. Y., Liu, Y., Wang, D., Zhang, G., Liu, S., Wei, X., Yue, Z., Zheng, S., Shen, X., Wang, S., Qi, C., Ye, C., Zhao, F., Wang, J., Fan, J., Li, B., Sun, J., Jia, X., Xia, Z., Zhang, H., Liu, J., Zheng, Y., Liu, X., Wang,

- J., Yang, H., Kristiansen, K., Xu, X., Mock, T., Li, S., Zhang, W., e Fan, G. (2024). Global marine microbial diversity and its potential in bioprospecting. *Nature*, 1-9
- Chow, J., Pérez-García, P., Dierkes, R. F., Zhang, H., e Streit, W. R. (2022). The PET-degrading potential of global metagenomes: from in silico mining to active enzymes. In *Metagenomics: Methods and Protocols* (pp. 139-151). New York, NY: Springer US
- Chowdhury, H., Chowdhury, T., e Sait, S. M. (2021). Estimating marine plastic pollution from COVID-19 face masks in coastal regions. *Marine Pollution Bulletin*, 168, 112419
- Chua, T. K., Tseng, M., & Yang, M. K. (2013). Degradation of Poly (ϵ -caprolactone) by thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2. *Amb Express*, 3, 1-7
- Cooper, D. G., e Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 224-229
- Cowger, W., Steinmetz, Z., Gray, A., Munno, K., Lynch, J., Hapich, H., Primpke, S., De Frond, H., Rochman, C., e Herodotou, O. (2021). Microplastic Spectral Classification Needs an Open Source Community: Open Specy to the Rescue! *Analytical Chemistry*, 93, 7543-7548
- Dahal, U., Paul, K., e Gupta, S. (2023). The multifaceted genus *Acinetobacter*: from infection to bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 134(8), 1xad145
- Damasceno, F. R., Cammarota, M. C., e Freire, D. M. (2012). The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 241-246
- Dave, S., e Das, J. (2021). Role of microbial enzymes for biodegradation and bioremediation of environmental pollutants: challenges and future prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability*, 325-346
- Dias, G. R., Freitas-Silva, J., de Carvalho, M. M., dos Santos Ramos, V. F., Muricy, G., Rodrigues, J. C. F., Costa, B. R. F. V., de Oliveira B. F. R. e Laport, M. S. (2024). Bioemulsifier from sponge-associated bacteria reduces staphylococcal biofilm. *Microbial Pathogenesis*, 106856
- Effendi, S. S. W., Hu, R. E., Hsiang, C. C., Ting, W. W., Huang, C. L., e Ng, I. S. (2024). Exploring PETase-like enzyme from shotgun metagenome and co-expressing Colicin E7 in *Escherichia coli* for effective PET degradation. *Process Biochemistry*, 140, 78-87
- Eichler, P. P. B., Amorim, A. C., dos Santos Costa, R., e de Miranda, L. B. (2020). Seasonality of hydrographic conditions and foraminiferal species in Guanabara Bay (Rio de Janeiro, Brazil). *Regional Studies in Marine Science*, 35, 101141
- Filiciotto, L., e Rothenberg, G. (2021). Biodegradable plastics: Standards, policies, and impacts. *ChemSusChem*, 14(1), 56-72
- Fistarol G. O., Coutinho F. H., Moreira A. P., Venas T., Cánovas A., de Paula S. E. Jr, Coutinho R., de Moura R. L., Valentin J. L., Tenenbaum D. R., Paranhos R., do Valle R. A., Vicente A. C., Amado Filho G. M., Pereira R.C., Kruger R., Rezende C. E., Thompson C. C., Salomon P. S., e Thompson F. L. (2015). Environmental and Sanitary Conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. *Frontiers in Microbiology*, 6 (2015): 1232
- Freitas-Silva, J., de Oliveira, B. F. R., Dias, G. R., de Carvalho, M. M., e Laport, M. S. (2023). Unravelling the sponge microbiome as a promising source of biosurfactants. *Critical Reviews in Microbiology*, 49(1), 101-116
- Fundação Heinrich Böll Stiftung. (2020). Atlas do Plástico - Rio de Janeiro Office. Disponível em: <<https://br.boell.org/pt-br/atlas-do-plastico>> Acesso em: 10 jun. 2024
- Galarza-Verkovich, D., Turak, O., Wiese, J., Rahn, T., Hentschel, U., e Borchert, E. (2023). Bioprospecting for polyesterase activity relevant for PET degradation in marine Enterobacterales isolates. *AIMS Microbiology*, 9(3), 518

- Gaur, V. K., e Manickam, N. (2021). Microbial production of rhamnolipid: synthesis and potential application in bioremediation of hydrophobic pollutants. In *Microbial and Natural Macromolecules* (pp. 143-176). Academic Press
- Gharibshahian, M., Salehi, M., Beheshtizadeh, N., Kamalabadi-Farahani, M., Atashi, A., Nourbakhsh, M. S., e Alizadeh, M. (2023). Recent advances on 3D-printed PCL-based composite scaffolds for bone tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1168504
- Gopinath, K. P., Nagarajan, V. M., Krishnan, A., e Malolan, R. (2020). A critical review on the influence of energy, environmental and economic factors on various processes used to handle and recycle plastic wastes: Development of a comprehensive index. *Journal of Cleaner Production*, 274, 123031
- Gricajeva, A., Nadda, A. K., e Gudiukaite, R. (2022). Insights into polyester plastic biodegradation by carboxyl ester hydrolases. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 97(2), 359-380
- Guimarães, M. A. (2022). Desenvolvimento de membranas de nanofibras biodegradáveis de PCL contendo óleo essencial de rosa mosqueta. Monografia (Bacharelado em Farmácia) - Instituto de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió
- Guo, W., Duan, J., Shi, Z., Yu, X., e Shao, Z. (2023). Biodegradation of PET by the membrane-anchored PET esterase from the marine bacterium *Rhodococcus pyridinivorans* P23. *Communications Biology*, 6(1), 1090
- Gupta, K. K., e Devi, D. (2020). Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface. *Heliyon*, 6(7) e04398
- Hankin, L., e Anagnostakis, S. L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607
- Ho, B. T., Roberts, T. K., e Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Critical reviews in biotechnology*, 38(2), 308-320
- Hosaka, M., Kamimura, N., Toribami, S., Mori, K., Kasai, D., Fukuda, M., e Masai, E. (2013). Novel tripartite aromatic acid transporter essential for terephthalate uptake in *Comamonas* sp. strain E6. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 6148-6155
- Howard, S. A., e McCarthy, R. R. (2023). Modulating biofilm can potentiate activity of novel plastic-degrading enzymes. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 72
- Huang, H., Wang, F., Ma, S., Yuan, X., Li, J., Chen, H., Yuan, R., Luo, S., e Gai, N. (2024). The Aquatic Plasticsphere: Methodology, Biofilm Formation Mechanism, and Microbial Diversity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 262(1), 15
- IBG (2015) Instituto Baía de Guanabara. Disponível em: <https://www.gov.br/cgu/pt-br/governo-aberto/iniciativas-de-governo-aberto/organizacoes-da-sociedade-civil/de-a-a-z/instituto-baia-de-guanabara-ibg>. Acesso em: 23/06/2024
- IBGE (2024). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo, Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/rio-de-janeiro/historico> . Acesso em: 31 mar. 2024
- IBGE (2023). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Brasil: 500 anos de povoamento: território brasileiro e povoamento portugueses, imigração restrita (1500-1700). Disponível em: <https://brasil500anos.ibge.gov.br/territorio-brasileiro-e-povoamento/portugueses/imigracao-restrita-1500-1700>.
- IPEA (2014). Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Em águas turvas: governança do Programa de Despoluição da Baía de Guanabara. Disponível em: <https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/6762> Acesso em: 10 jun. 2024
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., e Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271-279

- Jenkins, S., Quer, A. M. I., Fonseca, C., e Varrone, C. (2019). Microbial degradation of plastics: new plastic degraders, mixed cultures and engineering strategies. *Soil microenvironment for Bioremediation and Polymer Production*, 213-238
- Jiang, H., Zhang, S., Gao, H., Hu, N. (2016). Characterization of a cold-active esterase from *Serratia* sp. and improvement of thermostability by directed evolution. *BMC Biotechnology*, 16, 1-11
- Jin, J., e Jia, Z. (2024). Characterization of Potential Plastic-Degradation Enzymes from Marine Bacteria. *ACS omega*, 9(29), 32185-32192
- Johan, U. U. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Kamarudin, N. H. A., e Ali, M. S. M. (2021). An integrated overview of bacterial carboxylesterase: Structure, function and biocatalytic applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 205, 111882
- Joshi, G., Goswami, P., Verma, P., Prakash, G., Simon, P., Vinithkumar, N. V., e Dharani, G. (2022). Unraveling the plastic degradation potentials of the plastisphere-associated marine bacterial consortium as a key player for the low-density polyethylene degradation. *Journal of Hazardous Materials*, 425, 128005
- Kour, D., Khan, S. S., Kour, H., Kaur, T., Devi, R., Rai, P. K., Judy, C., McQuestion, C., Bianchi, A., Spells, S., Mohan, R., e Yadav, A. N. (2022). Microbe-mediated bioremediation: Current research and future challenges. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 10(2), 6-24
- Khandare, S. D., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2024). Isolation and purification of esterase enzyme from marine bacteria associated with biodegradation of polyvinyl chloride (PVC). *Biodegradation*, 36(1), 4
- Kim, S. H., Shin, N., Jeon, J. M., Yoon, J. J., Joo, J. C., Kim, H. T., Bhatia, S. K. e Yang, Y. H. (2024). Application of liquid-based colorimetric method for high throughput screening of bioplastic-degrading strains using esterase assay. *Analytical Biochemistry*, 685, 115390
- Kimura, Y., Fukuda, Y., Otsu, R., Yu, J., Mino, S., Misawa, S., Maruyama, S., Ikeda, Y., Myamachi, R., Noguchi, H., Kato, S., Yanamoto, Y., e Sawabe, T. (2023). A lesson from polybutylene succinate plastisphere to the discovery of novel plastic degrading enzyme genes in marine *vibrios*. *Environmental Microbiology*, 25(12), 2834-2850
- Krause, S., Molari, M., Gorb, E. V., Gorb, S. N., Kossel, E., e Haeckel, M. (2020). Persistence of plastic debris and its colonization by bacterial communities after two decades on the abyssal seafloor. *Scientific Reports*, 10(1), 9484
- Karunatillaka, I., Jaroszewski, L., e Godzik, A. (2022). Novel putative polyethylene terephthalate (PET) plastic degrading enzymes from the environmental metagenome. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 90(2), 504-511
- Krise, M. K. (2021). Enzymes: Moving at the Speed of Life. Disponível em: <https://www.acs.org/education/outreach/celebrating-chemistry-editions/2021-ncw/enzymes.html>> Acesso em 10 jun. 2024
- Kumar, G., Lal, S., Soni, S. K., Maurya, S. K., Shukla, P. K., Chaudhary, P., Bhattacharjee, A. K. e Garg, N. (2022). Mechanism and kinetics of chlorpyrifos co-metabolism by using environment restoring microbes isolated from rhizosphere of horticultural crops under subtropics. *Frontiers in Microbiology*, 13, 891870
- Kumar, M., Chen, H., Sarsaiya, S., Qin, S., Liu, H., Awasthi, M. K., Kumar, S., Singh, L., Zhang, Z., Bolan, N. S., Pandey, A., Varjani, S., e Taherzadeh, M. J. (2021). Current research trends on micro-and nano-plastics as an emerging threat to global environment: a review. *Journal of Hazardous Materials*, 409, 124967
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685
- Laghezza, M., Fiore, S., e Berruti, F. (2024). A review on the pyrolytic conversion of plastic waste into fuels and chemicals. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 106479

Leite, A. E. T. (2021). Estudos bioquímicos e biofísicos de esterases de *Bacillus licheniformis* e suas possíveis aplicações biotecnológicas. Dissertação (Doutorado em física) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos

Lens Patent Search (2024). Disponível em: <<https://www.lens.org/lens/search/patent/structured>> Acesso em: 15/05/2024

Liu, F., Fan, C., Li, J., e Tan, Q. (2023). Unraveling the driving factors of the plastic waste trade network formation and dynamics. *Journal of Environmental Management*, 348, 119422.

Liu, X., Lei, T., Boré, A., Lou, Z., Abdouraman, B., e Ma, W. (2022). Evolution of global plastic waste trade flows from 2000 to 2020 and its predicted trade sinks in 2030. *Journal of Cleaner Production*, 376, 134373

Lopes, I. R. L. (2020) Análise da produção de hidrolases por bactérias associadas à esponja marinha *Plakina cyanorosea* do litoral de Cabo Frio (RJ). Monografia (Bacharelado em Microbiologia e Imunologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Lou, H., Fu, R., Long, T., Fan, B., Guo, C., Li, L., Zhang, J., e Zhang, G. (2022). Biodegradation of polyethylene by *Meyerozyma guilliermondii* and *Serratia marcescens* isolated from the gut of waxworms (larvae of *Plodia interpunctella*). *Science of the Total Environment*, 853, 158604

Lucas, N., Bieniaime, C., Belloy, C., Queneudec, M., Silvestre, F., e Nava-Saucedo, J. E. (2008). Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques—A review. *Chemosphere*, 73(4), 429-442

Lv, S., Wang, Q., Li, Y., Gu, L., Hu, R., Chen, Z., e Shao, Z. (2024). Biodegradation of polystyrene (PS) and polypropylene (PP) by deep-sea psychrophilic bacteria of *Pseudoalteromonas* in accompany with simultaneous release of microplastics and nanoplastics. *Science of The Total Environment*, 948, 174857

Lv, S., Li, Y., Zhao, S., e Shao, Z. (2024). Biodegradation of typical plastics: from microbial diversity to metabolic mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 593

Mahmoud, G.AE. (2021). Microbial Scavenging of Heavy Metals Using Bioremediation Strategies. In: Kumar, V., Prasad, R., Kumar, M. (eds) *Rhizobiont in Bioremediation of Hazardous Waste* (Springer, Singapore), pp. 265-289

MCTI (2020). Ministério da Cultura, Tecnologia e Inovação. Década da Ciência Oceânica. Disponível em: <<https://ciencianomar.mctic.gov.br/decada-pesquisa-oceanica-brasil/>> Acesso em: 10/06/2024

Meijer, L. J., Van Emmerik, T., Van Der Ent, R., Schmidt, C., e Lebreton, L. (2021). More than 1000 rivers account for 80% of global riverine plastic emissions into the ocean. *Science advances*, 7(18), eaaz5803. Processed by Our World In Data. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/plastic-pollution>> Acesso em: 26 out. 2024

Meng, Q., Yi, X., Zhou, H., Song, H., Liu, Y., Zhan, J., e Pan, H. (2024). Isolation of marine polyethylene (PE)-degrading bacteria and its potential degradation mechanisms. *Marine Pollution Bulletin*, 207, 116875

Messias, J. M., Costa, B. Z. D., Nascimento, V. M. G. D., Giese, E. C., Dekker, R. F., e Barbosa, A. D. M. (2011). Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, 32 (2), 213-234

Molitor, R., Bollinger, A., Kubicki, S., Loeschcke, A., Jaeger, K. E., e Thies, S. (2020). Agar plate-based screening methods for the identification of polyester hydrolysis by *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 274-284

Muriel-Millán, L. F., Millán-López, S., e Pardo-López, L. (2021). Biotechnological applications of marine bacteria in bioremediation of environments polluted with hydrocarbons and plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-15, 105

Nações Unidas Brasil (2024). Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Disponível em: <<https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>> Acesso em: 13/08/2024

Nanayakkara, C. J., Senadheera, V., Anuththara, V., Rathnaweera, P., Nishshanka, P., Piyatissa, P.,

Munasingha, H., Dushyanta, N., e Kuruppu, G. N. (2024). The collateral effects of COVID-19 on marine pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 205, 116595

Napper, I. E., e Thompson, R. C. (2023). Plastics and the Environment. *Annual Review of Environment and Resources*, 48(1), 55-79

Narayanan, M., Ali, S. S., e El-Sheekh, M. (2023). A comprehensive review on the potential of microbial enzymes in multipollutant bioremediation: Mechanisms, challenges, and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 334, 117532

Nauendorf, A., Krause, S., Bigalke, N. K., Gorb, E. V., Gorb, S. N., Haeckel, M., Wahl, M. e Treude, T. (2016). Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1-2), 168-178.

Nehal, F., Sahnoun, M., Dab, A., Sebahia, M., Bejar, S., e Jaouadi, B. (2019). Production optimization, characterization, and covalent immobilization of a thermophilic *Serratia rubidaea* lipase isolated from an Algerian oil waste. *Molecular Biology Reports*, 46, 3167-3181

Nimkande, V. D., Krishnamurthi, K., e Bafana, A. (2023). Potential of Antarctic lipase from *Acinetobacter johnsonii* Ant12 for treatment of lipid-rich wastewater: screening, production, properties and applications. *Biodegradation*, 34(6), 549-566

Nunes, S. O., Oliveira, B. F. R., Giambiagi-Demarval, M., e Laport, M. S. (2021). Antimicrobial and antibiofilm activities of marine sponge-associated bacteria against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from canine skin. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104612

OECD (2023) – processed by Our World in Data. OECD, “Global Plastics Outlook - Plastics waste by region and end-of-life fate”. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/grapher/plastic-fate>>. Acesso em: 26 out. 2024

Oliveira, S. M. M. C., Barcellos, F. C., Cardoso, R. L., e Carvalho, P.G. M. (2014). Entorno da Baía de Guanabara: território das desigualdades demográfica e socioambiental. Resumo, In XIX Encontro Nacional de Estudos Populacionais, ABEP, realizado em São Pedro/SP – Brasil

Olkowska, E., Polkowska, Ż., e Namieśnik, J. (2012). Analytical procedures for the determination of surfactants in environmental samples. *Talanta*, 88, 1-13.

Orla Sem Lixo. (2022). Disponível em: <<https://orlasemlixo.wordpress.com/>>. Acesso em: 13 jun. 2024

Orlandi, V. T., Martegani, E., Giaroni, C., Baj, A., e Bolognese, F. (2022). Bacterial pigments: A colorful palette reservoir for biotechnological applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3), 981-1001

Pabortsava, K., e Lampitt, R. S. (2020). High concentrations of plastic hidden beneath the surface of the Atlantic Ocean. *Nature communications*, 11(1), 4073

Plastics For Change. (2021). Disponível em: <<https://www.plasticsforchange.org/>> . Acesso em 10 jun. 2024

Pérez-García, P., Danso, D., Zhang, H., Chow, J., e Streit, W. R. (2021). Exploring the global metagenome for plastic-degrading enzymes. In *Methods in enzymology* (Vol. 648, pp. 137-157). Academic Press

Portal MultiRio (2016). O Rio do século XVI. Disponível em: <<https://multirio.rio.rj.gov.br/index.php/historia-do-brasil/rio-de-janeiro/2436-a-cidade-do-rio-de-janeiro-no-seculo-xvii>> . Acesso em: 31 mar. 2024

Privalov, P. L. (1990). Cold denaturation of protein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(4), 281-306

Rasool, F. N., Saavedra, M. A., Pamba, S., Perold, V., Mmochi, A. J., Maalim, M., Simonsen, L., Buur,

- L., Pedersen, R. H., Syberg, K., e Jelsbak, L. (2021). Isolation and characterization of human pathogenic multidrug resistant bacteria associated with plastic litter collected in Zanzibar. *Journal of Hazardous Materials*, 405, 124591
- Ravindran, A., Sajayan, A., Priyadharshini, G. B., Selvin, J., e Kiran, G. S. (2020). Revealing the efficacy of thermostable biosurfactant in heavy metal bioremediation and surface treatment in vegetables. *Frontiers in Microbiology*, 11, 222
- Rezania, S., Park, J., Din, M. F. M., Taib, S. M., Talaiekhosani, A., Yadav, K. K., e Kamyab, H. (2018). Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 191-208
- RFI. (2020). Sem capacidade para reciclar, Malásia devolve lixo para países desenvolvidos. Disponível em: <<https://www.rfi.fr/br/mundo/20200120-sem-capacidade-para-reciclar-mal%C3%A1sia-devolve-lixo-para-pa%C3%ADses-desenvolvidos>>. Acesso em: 26 out. 2024
- Roberts, C., Edwards, S., Vague, M., León-Zayas, R., Scheffer, H., Chan, G., Swartz, A. N., e Mellies, J. L. (2020). Environmental consortium containing *Pseudomonas* and *Bacillus* species synergistically degrades polyethylene terephthalate plastic. *Mosphere*, 5(6), 10-1128
- Rodrigues, M. D. S. F., e de Miranda, A. C. (2014). História Ambiental: o saneamento da cidade do Rio de Janeiro. *Revista Práxis*, 6(11)
- Sadler, J. C., e Wallace, S. (2021). Microbial synthesis of vanillin from waste poly (ethylene terephthalate). *Green Chemistry*, 23(13), 4665-4672
- Saleem, M., Yahya, S., Razzak, S. A., Khawaja, S., e Ali, A. (2023). Shotgun metagenomics and computational profiling of the plastisphere microbiome: unveiling the potential of enzymatic production and plastic degradation. *Archives of Microbiology*, 205(11), 359
- Santos, D. K., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., e Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401
- Saranya, P., Selvi, P. K., e Sekaran, G. (2019). Integrated thermophilic enzyme-immobilized reactor and high-rate biological reactors for treatment of palm oil-containing wastewater without sludge production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 1053-1064
- Scott, W. G. (2007). Ribozymes. *Current opinion in structural biology*, 17(3), 280-286.
- Shahnawaz, M., Sangale, M. K., & Ade, A. B. (2019). *Bioremediation technology for plastic waste*. Springer, Singapore, pp. 93–101
- Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23, 15-22
- Sigma-Aldrich. (2020) Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>>. Acesso em 12 jun. 2024
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., e Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791
- Sonune, N. (2021). Microbes: A Potential Tool for Bioremediation. In: Kumar, V., Prasad, R., Kumar, M. (eds) *Rhizobiont in Bioremediation of Hazardous Waste* (Springer, Singapore), pp 391-407
- Su, X., Huang, X., Zhang, Y., Yang, L., Wen, T., Yang, X., Zhu, G., Zhang, J., Tang, Y., Li, Z., Ding, J., Li, R., Pan, J., Chen, X., Huang, F., Rilling, M. C., e Zhu, Y. G. (2024). Nitrifying niche in estuaries is expanded by the plastisphere. *Nature Communications*, 15(1), 5866
- Swarnkar, V., Agrawal, N., e Tomar, R. (2012). Sorption of Chromate and Arsenate by Surfactant Modified Erionite (E-SMZ). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33, 919 – 927

- Tamiya, T., Okahashi, N., Sakuma, R., Aoyama, T., Akahane, T., e Matsumoto, J. J. (1985). Freeze denaturation of enzymes and its prevention with additives. *Cryobiology*, 22(5), 446-456
- Tang, K. H. D. (2024). Terrestrial and Aquatic Plastisphere: Formation, Characteristics, and Influencing Factors. *Sustainability*, 16(5), 2163
- Trata Brasil (2022). Painel Saneamento Brasil - Minha Localidade - Indicadores. Disponível em: <<https://www.painelsaneamento.org.br/localidade?id=33>>. Acesso em: 10/06/2024
- Ugwu, K., Herrera, A., e Gómez, M. (2021). Microplastics in marine biota: A review. *Marine pollution Bulletin*, 169, 112540
- Uzoigwe, C., Burgess, J. G., Ennis, C. J., e Rahman, P. K. (2015). Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. *Frontiers in Microbiology*, 6, 129446
- Van Cauwenberghe, L., Devriese, L., Galgani, F., Robbens, J., e Janssen, C. R. (2015). Microplastics in sediments: a review of techniques, occurrence and effects. *Marine Environmental Research*, 111, 5-17
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., e Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079
- Verschoor, J. A., Kusumawardhani, H., Ram, A. F., e de Winde, J. H. (2022). Toward microbial recycling and upcycling of plastics: prospects and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 821629
- Viršek, M. K., Lovšin, M. N., Koren, Š., Kržan, A., e Peterlin, M. (2017). Microplastics as a vector for the transport of the bacterial fish pathogen species *Aeromonas salmonicida*. *Marine pollution bulletin*, 125(1-2), 301-309
- Yang, L. Y., Huang, X. R., Neilson, R., Li, Z. L., Yang, X. R., e Su, X. X. (2023). Characterization of microbial community, ecological functions and antibiotic resistance in estuarine plastisphere. *Science of the Total Environment*, 866, 161322
- Yek, P. N. Y., Chan, Y. H., Foong, S. Y., Mahari, W. A. W., Chen, X., Liew, R. K., Ma, L. N., Tsang, F. Y., Sonne, C., Cheng, W. Y., Tan, H. Y., e Lam, S. S. (2024). Co-processing plastics waste and biomass by pyrolysis–gasification: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 22(1), 171-188
- Zhao, K., Wei, Y., Dong, J., Zhao, P., Wang, Y., Pan, X., e Wang, J. (2022). Separation and characterization of microplastic and nanoplastic particles in marine environment. *Environmental Pollution*, 297, 118773
- Zhou, J., Chen, M., Li, Y., Wang, J., Chen, G., e Wang, J. (2024). Microbial bioremediation techniques of microplastics and nanoplastics in the marine environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 117971
- Zhao, S., Liu, R., Wang, J., Lv, S., Zhang, B., Dong, C., e Shao, Z. (2023). Biodegradation of polyethylene terephthalate (PET) by diverse marine bacteria in deep-sea sediments. *Environmental Microbiology*, 25(12), 2719-2731

9. Anexos

Anexo I: Autorização do uso de imagem da figura 1.

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 19, 2024

This Agreement between Instituto de Microbiologia Paulo de Góes ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5807721103990
License date	Jun 14, 2024
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Environmental Microbiology
Licensed Content Title	Antimicrobial resistance and biotechnological potential of plastic-associated bacteria isolated from an urban estuary

Anexo II: Licença para adaptar os dados do Quadro 1 de Roberts *et al.*, 2020

Production of esterases, lipases and bioemulsifiers by plastisphere from Bom Jesus Cove, Fundão Island, Guanabara Bay, Rio de Janeiro © 2024 by Beatriz Balthazar Abdon is licensed under [CC BY 4.0](#)

Anexo III: Coautoria em *Brief Report* publicado na revista científica *Environmental Microbiology*

Received: 30 June 2023 | Accepted: 30 October 2023
DOI: 10.1111/1462-2920.16540

BRIEF REPORT

ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY
Applied Microbiology
Technology

Antimicrobial resistance and biotechnological potential of plastic-associated bacteria isolated from an urban estuary

Anna Luiza Bauer Canellas¹ | Beatriz Balthazar Abdon¹ |
Matheus Nunes Diniz¹ | Gabrielle da Silva Oliveira Alves¹ |
Marcos Felipe de Paula Lourenço² | Wilson Thadeu Valle Machado² |
Marcia Giambiagi-deMarval¹ | Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira³ |
Marinella Silva Laport¹

Anexo IV: Participação no 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia e recebimento de Menção Honrosa pelo prêmio Isaac Roitman para Iniciação Científica



Anexo V: Integrante do projeto de extensão da UFRJ “Aprender a Lavar as Mãos Previne Doenças” como bolsista

 **Pró-Reitoria de Graduação-PR-I**
Divisão de Registro de Estudantes-DRE

Declaração

O(A) aluno(a) **BEATRIZ BALTHAZAR ARDON**, registrado(a) nesta Universidade sob a matrícula **121088795**, do curso **Química (Biologia, Microbiol e Imunologia, e biofísica)** do(a) seguinte(s) bols(a):

Bolsa de Extensão II
Aprender a Lavar as Mãos Previne Doenças
CNPQ Nº 40020

10 de Fevereiro de 2023, emitido às 10:35h


Guilherme Rocha de Carvalho
Diretor de Registro de Estudantes

Código de verificação:
CINE 3484 3436 ACDF 0033 0308 A808 5434

Exatidão das informações e validade da Declaração sob responsabilidade do signatário.

Este documento é o sistema PDI
Assinatura digitalizada em 10/02/2023
Data de emissão: 10/02/2023
Data de validade: 10/02/2023

Anexo VI: Apresentações orais na 12º SIAC



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **MICROCOMBATE: APRENDER A LAVAR AS MÃOS PREVINE DOENÇAS**, orientado por **LEONARDO ROCCHETTO COELHO**, **ROSANA BAURETO RICHIA FERREIRA**, **MARINELLA SILVA LAPORT** e **BERNADETE TEIXEIRA FERREIRA CARVALHO** e de autoria de **BEATRIZ BALTHAZAR ARDON**, **ANNA LUIZA BAUER CANELLAS**, **ISABELLE RODRIGUES LOPES**, **MARIANA ANJO**, **YAN RODRIGUES DE OLIVEIRA MOURA BATISTA**, **DENILSON HEROLD DA CRUZ**, **BRUNA GONÇALVES RIBEIRO ARAUJO**, **IZABELLE BONFIM BARBOSA**, **JESSICA ANDRESSA REIS DE SOUZA**, **MATHEUS OLIVEIRA DE ASSIS**, **ALA REGO DE ALMEIDA MENEZ**, **ANA BEATRIZ DOS SANTOS ROMUALDO DA SILVA**, **PALOMA DIAS**, **EVELYN DA SILVA DE MELO**, **TAMIRES AVILA DE SOUZA CLEMENTE**, **PAMELLA DOULART TEIXEIRA**, **JULIA RIBEIRO CAVALCANTE**, **DANIELLA DA SILVA DE SOUZA**, **GIOVANNA TREBISACCE**, **VICTORIA DE OLIVEIRA COSTA**, **JULIANA DE OLIVEIRA RIBEIRO**, **SARAH VITORIA MARTINS DA SILVA**, **LAIS PIRES DO VALLE TÓTOLA** e **YASIA CRISTINA SANTOS BRAZ DE ALMEIDA DE ANDRADE CARVALHO** foi apresentado no formato ORAL durante a 12ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ, realizada no período de 29 de maio a 02 de junho de 2023.

Rio de Janeiro, 13 de julho de 2023


Prof. Ivana Bentes
Pro-reitora de Extensão


Prof. Marcelo de Pádua
Pro-reitor de Graduação


Prof. Denise Maria Guimarães Freire
Pro-reitora de Pós-Graduação

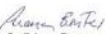
A validade deste documento certificado, para ser considerado válido de acordo com a legislação, fica condicionada à verificação da autenticidade e validade da assinatura digitalizada.



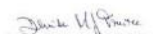
CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho **POTENCIAL ENZIMÁTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LIXO PLÁSTICO NA ENSEADA DE BOM JESUS, ILHA DO FUNDÃO, RIO DE JANEIRO**, orientado por **MARINELLA SILVA LAPORT** e de autoria de **BEATRIZ BALTHAZAR ARDON** e **ANNA LUIZA BAUER CANELLAS** foi apresentado no formato ORAL durante a 12ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ, realizada no período de 29 de maio a 02 de junho de 2023.

Rio de Janeiro, 13 de julho de 2023


Prof. Ivana Bentes
Pro-reitora de Extensão


Prof. Marcelo de Pádua
Pro-reitor de Graduação


Prof. Denise Maria Guimarães Freire
Pro-reitora de Pós-Graduação

A validade deste documento certificado, para ser considerado válido de acordo com a legislação, fica condicionada à verificação da autenticidade e validade da assinatura digitalizada.

Anexo VII: Menção Honrosa no evento “Explica Orla Sem Lixo”



Anexo VIII: Apresentação de trabalhos durante a Jornada de Integração Orla Sem Lixo



Anexo IX: Participação na 4ª e 5ª Feira de Inovação Biotecnológica



Anexo X: Apresentação de trabalho na XLV JICTAC



Anexo XI: Participação na XXVII Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ



UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Coordenação de Extensão

DECLARAÇÃO

Declaro, para fins de comprovação de participação em evento de extensão promovido pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes que **Beatriz Balthazar Abdon** (apresentadora), Anna Luiza Bauer Canellas e Marinella Silva Laport apresentaram o trabalho intitulado POTENCIAL ENZIMÁTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LIXO PLÁSTICO NA ENSEADA DE BOM JESUS, ILHA DO FUNDÃO, RIO DE JANEIRO na XXVIII Semana de Microbiologia e Imunologia realizado de 28 de novembro a 2 de dezembro de 2022. O evento foi coordenado pela professora Gabriella da Silva Mendes.

Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2023

Ana Maria Mazotto de Almeida
Ana Maria Mazotto de Almeida
Coordenadora de Extensão do IMPC/UFRJ

Centro de Ciências da Saúde – Rua Carlos Chagas Filho, nº 373 – Bloco 1
Cidade Universitária – Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 21.941-590 – Caixa Postal nº 68.040 – Tel./Fax: (21)2560-8344 /2562-6735
E-mail: coordenação.extensao@micro.ufrj.br



UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Coordenação de Extensão

DECLARAÇÃO

Declaro, para fins de comprovação de participação em evento de extensão promovido pelo Instituto de Microbiologia Paulo de Góes que **Beatriz Balthazar Abdon** participou como ouvinte da XXVIII Semana de Microbiologia e Imunologia realizada de 28 de novembro a 2 de dezembro de 2022, totalizando 10h de participação. O evento foi coordenado pela professora Gabriella da Silva Mendes.

Rio de Janeiro, 16 de outubro de 2023

Ana Maria Mazotto de Almeida
Ana Maria Mazotto de Almeida
Coordenadora de Extensão do IMPC/UFRJ

Centro de Ciências da Saúde – Rua Carlos Chagas Filho, nº 373 – Bloco 1
Cidade Universitária – Ilha do Fundão – Rio de Janeiro – RJ
CEP: 21.941-590 – Caixa Postal nº 68.040 – Tel./Fax: (21)2560-8344 /2562-6735
E-mail: coordenação.extensao@micro.ufrj.br

Anexo XII: Apresentação de pôster na XXIX Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ



Anexo XIII: Menção Honrosa por apresentação de pôster na XXX Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ



Digitalizado com CamScanner

Anexo XIV: Minicurso realizado durante a XXX Semana de Microbiologia e Imunologia da UFRJ



Anexo XV: Apresentação de trabalho no Congresso online "Microbiologia 2024"

