**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação da dinâmica de Bacteroidetes no processo de biodegradação de
blenda polimérica Poli (ϵ -caprolactona)/ amido/ proteína isolada de soja em
distintos solos**

Leandro Fonseca de Souza

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2015**

Leandro Fonseca de Souza
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas
Bacharel em Ciência e Tecnologia

Avaliação da dinâmica de Bacteroidetes no processo de biodegradação de blenda polimérica Poli (ϵ -caprolactona)/ amido/ proteína isolada de soja em distintos solos

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **CLAUDIA BARROS MONTEIRO VITORELLO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Souza, Leandro Fonseca de

Avaliação da dinâmica de Bacteroidetes no processo de biodegradação de blenda
polimérica Poli (ϵ -caprolactona)/ amido/ proteína isolada de soja em distintos solos /
Leandro Fonseca de Souza. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018
de 2011. - - Piracicaba, 2015.
63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Bacteroidetes 2. PCL 3. Microbiologia do solo 4. Biodegradação 5. CL/A/PIS
Chitinophagaceae 6. PCR-DGGE I. Título

CDD 631.46
S729a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

À minha esposa, Leonara.

OFEREÇO

À minha mãe, Luzinete.

À minha tia, Luzimar.

Agradecimentos

à **agência de fomento** CAPES e à FEALQ, porque pelas bolsas concedidas tive suporte para realizar este trabalho | **minha orientadora** profa. claudia vitorello, que me inspirou a sonhar mais longe, com quem aprendi do como se faz ciência e por toda a liberdade oferecida para desenvolver meu trabalho, em ambiente propício | à **pilar mariani**, que me coorientou na prática, por toda discussão e ajuda | **prof. fernando andreote** e colegas de seu laboratório, que me ajudaram a pensar a pesquisa e a contornar muitas dificuldades técnicas, além dos recursos e auxílios oferecidos | profa. tsai, **acacio e lucas mendes**; me deram orientações valiosas, e ajudaram a tomar decisões importantes no decorrer da pesquisa | profa. carol quecine e colegas, zezo e joelma, pelas conversas, ajudas e recursos | prof. labate, na pessoa da dra. monica, pelos recursos compartilhados | prof. francisco tanaka, por todo o apoio com a microscopia eletrônica de varredura | profa. eiko kuramae, pelo apoio na tentativa de estágio no exterior junto à fapesp | a meus **amigos e colegas** de laboratório: **ana, daniel, leila, gicka, filipe, suzane e ninfim** – por toda ajuda com os problemas da vida, conversas, palavras de ânimo e apoio; carol kmit, lucas, nathalia, gustavo, pedro, paty, juliana, gabriel molina, mariana, taty, gorga, elaine – por toda ajuda e prontidão quando preciso, pelo companheirismo | à minha **mãe**, que sempre fez tudo por mim e para meu melhor; a meu pai e irmão, que amo | à minha tia **luzimar**, que me inspirou desde cedo e sempre me apoio a seguir com meus estudos | à minha **esposa** e melhor amiga, que sempre me ajudou a pensar e fazer o possível, compartilhando tudo, alegrias e pesares | a Deus, que me deu existência, vida e sonhos: “pois nele vivemos, nos movemos e existimos”.

Leandro F. de Souza

"There is nothing like looking, if you want to find something. You certainly usually find something, if you look, but it is not always quite the something you were after."

J.R.R. Tolkien, The Hobbit

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Resíduos plásticos como problema ambiental.....	17
2.2 Plásticos biodegradáveis como alternativa.....	18
2.3 Importância do estudo da microbiota do solo na pesquisa de plásticos biodegradáveis.....	19
2.4 Biodegradação de polímeros no solo e presença de Bacteroidetes.....	20
2.5 Bacteroidetes.....	21
2.6 PCR-DGGE em estudo de microrganismos no solo.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Obtenção dos materiais plásticos.....	29
4.2 Amostragem dos solos.....	30
4.3 Ensaio de Biodegradação.....	31
4.4 Determinação da biodegradação.....	32
4.5 Extração de DNA Genômico do Solo.....	33
4.6 Amplificação de regiões variáveis do RNA ribossomal 16S de Bacteroidetes.....	33
4.8 Isolamento e sequenciamento de amplicons 16S rDNA separados por DGGE.....	36
4.9 Desenho de primers específicos para genes de interesse.....	37
4.10 Purificação dos Produtos de PCR.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Seleção de primers para estudo de Bacteroidetes em solos.....	39
5.2 Avaliação da presença do filo Bacteroidetes em momentos distintos da biodegradação....	41
5.3 Tipo de solo como fator determinante na dinâmica de Bacteroidetes.....	43
5.4 Influência da presença de plásticos no solo na dinâmica de Bacteroidetes.....	45
5.5 Influência da presença dos plásticos sobre comunidade de Bacteroidetes em Solo Arenoso	49
5.6 Solo Argiloso e sua influência sobre a comunidade de Bacteroidetes.....	52
5.7 Construção de primers para genes de Lipase e Protease, potenciais atuantes na degradação de blenda polimérica.....	55
5.8 Avaliação da presença de Lipases nas amostras ambientais.....	56

6 CONCLUSÕES.....58
REFERÊNCIAS.....59

RESUMO

Avaliação da dinâmica de Bacteroidetes no processo de biodegradação de blenda polimérica Poli (ϵ -caprolactona)/ amido/ proteína isolada de soja em distintos solos

Resíduos produzidos em atividades industriais podem trazer danos significativos ao ambiente, principalmente quando estes não são degradáveis (ou são dificilmente degradáveis) por processos naturais. Polímeros sintéticos estão entre os principais resíduos descartados na natureza, permanecendo inertes por séculos e interferindo em processos ecológicos. Diante deste contexto, explorar o potencial biodegradável de plásticos é uma alternativa na substituição de embalagens descartáveis. Para a construção e otimização de materiais biodegradáveis, faz-se necessária a compreensão da ação da microbiota natural em processos de biodegradação natural. Neste trabalho, buscou-se compreender a dinâmica de microrganismos do filo Bacteroidetes no processo de biodegradação de blenda polimérica Poli (ϵ -caprolactona)/ Amido/ Proteína Isolada de Soja (PCL/A/PIS), considerando solos e materiais plásticos distintos, como também a presença de genes notadamente associados à degradação biológica. Para tanto, partindo de amostras de DNA obtidas do solo ao longo do processo de biodegradação, foram utilizadas técnicas de PCR e PCR-DGGE (Reação de Polimerização em Cadeia – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante). Observou-se que: Bacteroidetes estão presentes em todos os momentos avaliados do processo de biodegradação da Blenda e do PCL; o solo Arenoso, onde a biodegradação é mais efetiva, apresenta comunidades com perfis bem delimitados, que se diferenciam na degradação da Blenda e do PCL; a dinâmica no solo Argiloso não exhibe um padrão claro de influência dos plásticos sobre a comunidade, apontando, porém para uma convergência de similaridade das comunidades sobre blenda e PCL no momento de maior atividade degradativa. Chitinophagaceae é uma família presente na biodegradação, sendo *Chitinophaga pinensis* uma das espécies presentes; genes exclusivos a esta espécie e outras da mesma família que codificam lipases e proteases, associados à degradação de polímeros pela literatura científica, estão presentes nas amostras de solo avaliadas, sendo possíveis atores na biodegradação dos plásticos. Bacteroidetes aparenta ser um filo importante em processos naturais de biodegradação de polímeros em solos, e explorar o potencial deste grupo e da família Chitinophagaceae pode oferecer subsídios para a construção de plásticos mais eficientes em sua biodegradação.

Palavras-chave: Bacteroidetes; PCL; Microbiologia do solo; Biodegradação; PCL/A/PIS
Chitinophagaceae; PCR-DGGE

ABSTRACT

Evaluation of Bacteroidetes dynamics in biodegradation process of polymeric blend Poly (ϵ -caprolactone) / starch / soy protein isolate in different soils

The human productive activity has brought significant damage to the environment, particularly by the disposal of non-degradable waste (or poorly degradable) by natural processes. Synthetic polymers are among the main materials discarded, remaining inert for centuries, causing damage to the natural wildlife or interfering with ecological processes. Given this context, the potential use of biodegradable plastics is an alternative, both for agriculture and for the replacement of disposable packaging. For the construction and optimization of biodegradable materials it is necessary to understand the action of natural microbial communities in the process. Microorganisms have predominant and diversified roles in the biodegradation process, with complex ecological relationships in their responses, either by their phylogenetic relationships or the enzymes used during the process. In this work, we sought to understand the dynamics of Bacteroidetes phylum in the biodegradation process of polymer blend poly (ϵ -caprolactone) / starch / Soy Protein Isolate (PCL/ A/ SPI), considering different soils and plastics, and also the presence of genes associated with biological degradation. Therefore, starting from DNA samples taken from the soil during the biodegradation process, PCR techniques and PCR-DGGE (Polymerization Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) were used. It was observed that: the Phylum Bacteroidetes is present in all periods evaluated of the biodegradation process of Blend, PCL and even soils without the addition of plastics; the sandy soil, where the biodegradation is more effective, presents communities with well defined profiles that differ in the degradation of blends and PCL; the dynamics in clay soil does not show a clear pattern of plastics influence over the community, pointing to a convergence of communities similarity in blends and PCL over greater degradation activity. Chitinophagaceae is a family present in biodegradation, *Chitinophaga pinensis* being one of the species present; genes unique to this species and others of the same family encoding lipases and proteases, associated with the degradation of polymers reported in the scientific literature, are present in the evaluated soil samples, potentially acting on plastics biodegradation. Bacteroidetes appears to be an important phylum in natural processes of polymer biodegradation in soils, and to explore the potential of this taxon and of Chitinophagaceae family can shed light on the construction of more efficient biodegradable plastics.

Keywords: Bacteroidetes; PCL; Soil microbiology; Biodegradation; PCL/ A/ SIP
Chitinophagaceae; PCR-DGGE

1 INTRODUÇÃO

O estudo de comunidades microbianas para compreensão de processos biológicos em ecossistemas naturais é fundamental, tanto do ponto de vista da conservação como no uso dos serviços ecossistêmicos a favor das necessidades humanas. Neste sentido, compreender a resposta da microbiota ambiental diante de materiais engenheirados estranhos ao ambiente natural, como plásticos sintéticos, pode facilitar a criação de materiais menos danosos ao meio e não persistentes, tal qual os materiais biodegradáveis.

Este trabalho traz o estudo da dinâmica do filo Bacteroidetes diante de plásticos diferencialmente biodegradáveis expostos a solos naturais, visando um melhor entendimento dos impactos do processo de degradação dos plásticos sobre esta microbiota no solo. Como a biodegradação na natureza se dá por um processo de degradação biológica que está sujeito à ação de forças naturais, físicas e químicas, estas variáveis foram excluídas ou padronizadas através de um ensaio *in vitro* com condições controladas, a fim de se perceber somente o efeito da degradação microbiana. Os estudos foram iniciados pela Dra. Pilar Drummond Sampaio Corrêa Mariani em sua pesquisa de pós-doutorado, realizada nesta Universidade, partindo de solos da região de Piracicaba. Prosseguem aqui na utilização de técnicas de biologia molecular para avaliação da presença ou ausência do filo em momentos distintos do processo de biodegradação, dos padrões de organização do filo em relação aos plásticos e solos avaliados e da capacidade de restabelecimento da comunidade, após degradação microbiana dos plásticos.

Desta forma, buscando contextualizar os resultados obtidos e apontar as bases teóricas em discussão, será apresentada a seguir uma revisão da literatura científica atual, considerando: danos ambientais da poluição por plásticos e as vantagens do uso de materiais biodegradáveis para remediar tais danos; o que se sabe atualmente sobre microbiota e degradação de plásticos; qual a relação do filo Bacteroidetes com a degradação de polímeros de alto peso molecular e por fim, uma apresentação das técnicas utilizadas, ponderando suas vantagens e limitações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos plásticos como problema ambiental

Plásticos são uma versátil tecnologia humana, com um relativo baixo custo de produção e ampla diversidade de aplicações. Sua produção em massa tomou força a partir da década de 1950 e em algumas décadas atingiu um patamar mundial de difusão, ao ponto de ser difícil imaginar hoje uma sociedade sem estes materiais. Desde então a quantidade de resíduos plásticos no ambiente aumentou em três a quatro ordens de magnitude (DERRAIK, 2002, BARNES et al., 2009), sendo o sudeste asiático um dos maiores poluidores da atualidade (Figura 1).

Figura 1 - Resíduos plásticos lançados no ambiente sujeitos a ir para os oceanos (modificado de JAMBECK et al., (2015))

Resíduos plásticos são encontrados nos mais diversos ambientes, desde solos e costa marinha a ilhas remotas e mares profundos. A forma e tamanho destes resíduos varia, mas se observa uma tendência à redução de tamanho ao nível de micro fragmentos (BARNES et al., 2009). MCDERMID e MCMULLEN (2004) observaram que 43% dos fragmentos plásticos encontrados em ilhas do Havaí pertencem à categoria de micro fragmentos (de 1,0 a 2,8 mm de tamanho), o que causa preocupação à medida que o tamanho destas partículas é um fator importante quanto ao impacto poluente dos plásticos. Nesta faixa, os plásticos podem ser

ingeridos por organismos planctônicos, sendo acumulados ao longo da cadeia alimentar e gerando efeitos não previsíveis sobre a vida selvagem. Estudos realizados por todo o mundo tem apontado resultados similares quanto à detecção de micro fragmentos no ambiente, como no Brasil (DA SILVA et al., 2015), Canadá (ZBYSZEWSKI et al., 2014) e Coréia do Sul (HEO et al., 2013).

A persistência de plásticos no ambiente é estimada entre centenas e milhares de anos, mas ao fim acabam por sofrer degradação (BARNES et al., 2009). A degradação destes materiais se dá por processos que alteram as propriedades (mecânicas, óticas ou elétricas) dos polímeros por ação de forças físicas e químicas, como ação da luz, calor, atrito, condições químicas ou por ação biológica. Neste último caso, denomina-se biodegradação, ocorrendo quando há mineralização dos constituintes moleculares do plástico ao nível de dióxido de carbono e água (sob condições aeróbias), ou metano e dióxido de carbono (em condições anaeróbias) (BARNES et al., 2009; SHAH et al., 2008; SINGH; SHARMA, 2008).

2.2 Plásticos biodegradáveis como alternativa

Polímeros biodegradáveis são aqueles degradados pela ação de organismos vivos, importantes por oferecer uma alternativa aos polímeros tradicionais não recicláveis. Seu uso é interessante diante do problema com a disposição de resíduos sólidos, do acúmulo de materiais em aterros e a poluição de ambientes marinhos que se agrava em todo o mundo. Para a construção destes polímeros utiliza-se comumente de materiais naturalmente degradáveis como fibra de banana, celulose, proteína de soja, quitina, pectina ou amido (MAKHIJANI et al., 2015). A proteína de soja, também de baixo custo, tem sido estudada devido ao seu uso potencial em embalagens, resinas e adesivos, demonstrando melhoras nas propriedades físicas dos materiais. O amido, barato e produzido em grandes quantidades a partir de milho e outras culturas, tem sido muito utilizado; alguns exemplos de materiais biodegradáveis comercializados mundialmente que o utilizam em sua composição, em combinação com seus respectivos polímeros de origem fóssil, são: Mater-bi® (Poli ϵ -caprolactona (PCL)), Biopropylene® (Polipropileno) e Cardia Biohybrid® (Polipropileno e Poliestireno) (BASTIOLI, 1998; MAKHIJANI et al., 2015).

O poli ϵ -caprolactona (PCL) é um poliéster alifático biodegradável de origem fóssil, com alto peso molecular, que tem vários usos na indústria de plásticos; tem sido utilizado em

blendas (misturas de polímeros em um mesmo plástico) com amido, onde suas propriedades de biodegradação são aumentadas (BASTIOLI, 1998). Blendas poliméricas são uma classe de materiais nos quais ao menos dois polímeros são misturados e unidos para criar um novo material, com propriedades físicas distintas; o objetivo ao combinar materiais distintos, como nas blendas de PCL-Amido, é incorporar propriedades favoráveis dos dois materiais (biodegradabilidade do amido e resistência do PCL) (MAKHIJANI et al., 2015).

O objetivo final da pesquisa com plásticos biodegradáveis é criar materiais com uma ótima performance técnica, de uso seguro e com menor necessidade de reparos que sejam completamente biodegradáveis no ambiente e possuam custo acessível (MAKHIJANI et al., 2015).

2.3 Importância do estudo da microbiota do solo na pesquisa de plásticos biodegradáveis

O ambiente final dos resíduos plásticos tipicamente tem sido solos e mares, mesmo que não intencionalmente. Resíduos biodegradáveis devem ter seus efeitos compreendidos nestes ambientes quanto aos mecanismos envolvidos em sua biodegradação e aos microrganismos associados, antes que seu uso se faça de forma massiva. Tipicamente, a atenção da pesquisa neste campo tem sido dada à influência da estrutura química dos polímeros no processo, o que limita o entendimento de como a biodegradação ocorre na natureza. Compreender quais são as características dos plásticos, que podem efetivamente promover a biodegradabilidade destes materiais exige conhecer como se dá o desenvolvimento da microbiota associada (quais condições de: pH, temperatura, oxigênio, nutrientes, etc.) e os tipos de enzimas que utilizam (intracelulares e extracelulares, etc.) (TOKIWA et al., 2009).

Bactérias e fungos de solo são frequentemente associados à degradação de plásticos, no entanto, pouco se sabe sobre como as comunidades se distribuem em vários ambientes e como interagem com os plásticos; compreender a dinâmica da microbiota ambiental associada aos processos de biodegradação, juntamente com o seu papel bioquímico neste processo, pode oferecer subsídios para a construção de novos materiais e melhoria de materiais existentes, como também otimização de suas propriedades degradativas e redução dos impactos que possam decorrer de seu uso (MOORE-KUCERA et al., 2014; TOKIWA et al., 2009).

2.4 Biodegradação de polímeros no solo e presença de Bacteroidetes

Dentre os trabalhos que avaliam biodegradação de plásticos, poucos avaliam a composição de toda a microbiota presente em determinado momento. ZETTLER et al. (2013) fizeram a primeira caracterização de comunidades microbianas – principalmente bacterianas – vivendo junto a fragmentos plásticos em oceano aberto, o que definiram por “plastisphere”. Neste trabalho, que visa compreender a extensão do impacto ambiental destes resíduos sobre a microbiota natural dos oceanos, os autores descrevem uma interação intensa da microbiota com os resíduos plásticos. Observaram o estabelecimento diferenciado de grupos microbianos, tomando por referência a composição do ambiente marinho em geral, dentre estes o filo Bacteroidetes.

Em estudo de filmes plásticos biodegradáveis em solos para uso na agricultura, MOORE-KUCERA et al. (2014) observam forte efeito da origem dos solos sobre a composição das comunidades microbianas sobre os plásticos, independente do tipo de blenda utilizando amido ou celulose. Após 180 dias, analisaram a composição da microbiota dos plásticos em solos distintos, detectando a família Chitinophagaceae como uma das mais abundantes em todas as condições analisadas.

MARIANI (2009) em sua tese de doutorado, propõe uma nova blenda polimérica, baseada em PCL, PCL/A/PIS, estudando como se dá a biodegradação deste polímero em diferentes solos. A blenda proposta em sua pesquisa inova no sentido de explorar uma característica da biodegradação microbiana, a relação Carbono: Nitrogênio (C:N) dos materiais, na própria composição da blenda, de forma que o amido contribui com o C e a proteína de soja com o N, em proporções ideais à biodegradação em solos naturais. A velocidade e o sucesso do processo biodegradativo são dependentes da relação existente entre os elementos carbono e nitrogênio, pois esta relação dita o como a microbiota utilizará o material disponível (MARIANI et al., 2009).

A autora, prosseguindo com sua pesquisa, desenvolveu pós-doutorado onde buscou compreender como as comunidades microbianas de bactérias e fungos, em diferentes solos, estão envolvidas com a biodegradação de sua blenda. Utilizou solos de textura arenosa e argilosa, coletados em um mesmo período do ano na região de Piracicaba/ SP. Deste solo, criou microcosmos utilizando vidros vedados contendo o solo, além da blenda, de PCL puro e celulose, referencial para biodegradação. Avaliou por respirometria a biodegradação dos

polímeros por 180 dias, coletando periodicamente amostras de solo para extração do DNA total ali presente. Aos 90 dias do processo de biodegradação, utilizou o DNA extraído para realizar técnica de pirosequenciamento visando compreender quais os fungos e bactérias abundantes neste momento crítico do processo biodegradativo. Ao fim, obteve as curvas de biodegradação trazidas na Figura 2, bem como identificou o filo bacteriano Bacteroidetes como predominante neste momento da biodegradação, além de apontar a família Chitinophagaceae como uma das principais ali presentes.

Figura 2 - Curvas de biodegradação dos polímeros em solos arenoso e argiloso, ao longo do tempo obtido por MARIANI, P.D.S.C. em pesquisa em andamento. Percentual de biodegradação medido pela liberação de CO₂

Bacteroidetes é um filo bacteriano amplamente disperso na Terra, encontrado em habitats distintos que vão do gelo Antártico a lagos de águas frescas e salinas, fontes hidrotermais e solo (GUPTA, 2008). Microrganismos pertencentes a este filo são constituintes básicos da microbiota animal associada ao trato intestinal (THOMAS et al., 2011) e junto a Firmicutes, são os táxons bacterianos dominantes na microbiota do intestino grosso de humanos e outros mamíferos (MARTENS et al., 2009). Até o momento desta pesquisa, existem aproximadamente 100 genomas referentes ao filo foram sequenciados e estão acessíveis publicamente, em bancos de dados *on line* GenBank (National Center of Biotechnology Information) e GOLD (Genomes OnLine Database).

O filo Bacteroidetes é muito diverso, tendo sido definido e redefinido muitas vezes nos últimos anos. Sua nomenclatura já passou por Cytophaga/ Flavobacteria, Cytophaga/

Flavobacteria/ Bacteroides ou Cytophaga/ Flexibacter/ Bacteroides e atualmente encontra-se definida por Bacteroidetes, sendo delimitado por quatro classes: Bacteroidia, Flavobacteriia, Sphingobacteriia e Cytophagia, as quais representam mais de 7000 espécies (LUDWIG et al., 2010; PEREIRA E SILVA et al., 2012; THOMAS et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Filogenia de Bacteroidetes. Filo com 15 famílias classificadas em 4 classes. Destaque para família Chitinophagaceae, importante neste trabalho. Adaptado de Ludwig et al. (2010)

Microrganismos pertencentes a este filo são comumente heterotróficos e gram-negativos, variando de anaeróbios estritos (como em Bacteroidia) a aeróbios estritos (Flavobacteriia). Com morfologias que variam de microrganismos em filamentosos a bastonetes, não apresentam flagelos para movimentação, movendo-se por “deslizamento” - *gliding movement* (THOMAS et al., 2011). As divisões filogenéticas do grupo se baseiam muitas vezes exclusivamente em similaridades de sequências 16S rDNA, como ocorre na classificação de Sphingobacteriia e Cytophagia. A maior classe dentro do filo, considerando o número de espécies, é a classe Flavobacteriia, mas é a classe Sphingobacteriia que abriga algumas das espécies melhor conhecidas (THOMAS et al., 2011). A maior parte das bactérias que compõem Sphingobacteriia são móveis, aeróbias e heterotróficas, sendo a família Chitinophagaceae caracterizada por similaridades de sequência do gene 16S rDNA,

concentrando espécies em três gêneros distintos, com genomas completamente sequenciados: *Chitinophaga pinensis*, *Niastella koreensis* e *Niabella soli* (BAILEY et al., 2013).

BAILEY et al. (2013) apontam a família Chitinophagaceae como associada a alta atividade β -glicosídica em solos, atividade metabólica esta que é passo essencial na decomposição de celulose; identificam uma abundância maior de membros deste grupo em solos com maior atividade degradativa, sendo este um dos poucos grupos bacterianos que tem presença diferenciada em seu estudo. Neste trabalho avaliam também riqueza microbiana, o que não aponta diferença significativa entre os solos com condições de atividade β -glicosídica contrastantes (alta x baixa), indicando que a maior abundância de membros desta família é essencial para esta atividade, e não sua presença-ausência.

Os genomas sequenciados de Bacteroidetes revelam a presença de genes que levam a muitas enzimas atuantes na hidrólise de carboidratos, capazes de utilizar um amplo espectro de substratos, de origem vegetal ou animal (THOMAS et al., 2011). Análises comparativas de genomas revelam loci específicos para utilização de carboidratos, compartilhados por membros do filo com relações filogenéticas distantes, e com nichos ecológicos que vão da vida livre em solos a espécies que compõem o microbioma intestinal de animais (THOMAS et al., 2011). Destaque para a espécie *Chitinophaga pinensis*, da família Chitinophagaceae; esta espécie detém o maior genoma detectado até o momento dentre Bacteroidetes, contendo o maior número de genes, possivelmente por seu nicho ecológico ser o solo, de vida livre em um ambiente heterogêneo (Figura 4). Além disto, os genomas de Bacteroidetes apresentam alta plasticidade e rearranjos genéticos, duplicações gênicas e transferência horizontal de genes, um conjunto de características que pode ter garantido a adaptação do grupo a nichos ecológicos tão diversos (THOMAS et al., 2011).

Figura 4 - Número total de proteínas em função do tamanho do genoma em espécies de Bacteroidetes (THOMAS et al., 2011). Destaque para *Chitinophaga pinensis*, espécie importante neste trabalho

As interações entre Bacteroidetes e seus hospedeiros são tipicamente mutualística, e não comensalistas, à medida que ambos organismos tem seu *fitness* aumentados quando em conjunto, sendo a presença do filo essencial para um desenvolvimento normal da microbiota intestinal (THOMAS et al., 2011). Martens et al. (2009), considerando Bacteroidetes da microbiota intestinal humana, afirmam que seu papel está associado normalmente à metabolização de uma variedade de carboidratos complexos, com potencial de quebra da sacarose e na quebra de glicanos, o que evidencia um potencial de organismos do táxon na expressão de genes associados a enzimas degradativas. Nesta mesma linha, (KIRCHMAN, 2002) falam sobre o papel de Bacteroidetes na degradação de materiais de alto peso molecular e sua importância para os ciclos biogeoquímicos, especialmente nos oceanos e Fierer et al. (2007) destacam uma relação entre a abundância de microrganismos deste filo e o conteúdo de carbono disponível no solo, onde a presença destes está associada a um aumento das taxas de mineralização deste elemento.

Diante do conhecimento disponível sobre Bacteroidetes, a relação em estudo entre a presença de microrganismos do filo e os plásticos biodegradáveis no solo leva à inferência de uma relação direta de participação do filo no processo de biodegradação de polímeros.

2.6 PCR-DGGE em estudo de microrganismos no solo

O solo é um ambiente rico e diverso em microrganismos, onde estima-se haver de $4\text{-}6 \times 10^{30}$ células microbianas em toda a Terra, sendo que estas células são compostas por 10^6 a 10^7 genomas distintos (SLEATOR et al., 2008). Em 1g de solo, calcula-se que haja mais do que 10 células procarióticas, sendo que menos do que 1% destas é cultivável por meios tradicionais de cultivo e isolamento (MOCALI; BENEDETTI, 2010). Fatores que levam à dificuldade de cultivo destes microrganismos em laboratório incluem crescimento fastidioso, pH, temperatura e níveis de oxigênio específicos, altas concentrações de substrato requeridas ou ausência de nutrientes necessários ao crescimento microbiano, além de diferenças genóticas e fenóticas que ainda desconhecemos em relação aos 1% cultiváveis (MOCALI; BENEDETTI, 2010).

Há algumas décadas, o conhecimento disponível sobre microrganismos do solo vinha basicamente de estudos com microrganismos cultiváveis. Atualmente sabe-se que o conhecimento obtido por esta via não representa toda a complexidade das comunidades bacterianas no ambiente (VARTOUKIAN et al., 2010). Somente com o uso de técnicas moleculares independentes de cultivo tornou-se possível a caracterização total de populações bacterianas em seus ambientes, utilizando de comparação de sequência de ácidos nucleicos e caracterização molecular, oferecendo classificações que permitem conhecer as relações filogenéticas entre os grupos (VARTOUKIAN et al., 2010; ZHAO et al., 2011).

As técnicas de biologia molecular utilizadas para distinguir diferenças genéticas entre populações microbianas de amostras distintas, partindo do DNA ali presente, são denominadas “DNA *fingerprinting*”; estas técnicas tem como vantagem a possibilidade de avaliar muitas amostras por vez, bem como de utilizar sequências de DNA que são filogeneticamente ou funcionalmente informativas para formação dos perfis das amostras, tal qual a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – gel de eletroforese por gradiente desnaturante) (ZHAO et al., 2011).

A técnica de DGGE se baseia na separação de fragmentos de DNA de tamanhos idênticos, porém com sequências distintas, utilizando de um gradiente desnaturante linearmente crescente de Uréia-Formamida, que afeta a mobilidade eletroforética das moléculas de DNA. A mudança na motilidade dos fragmentos está associada a uma dissociação (*melting*) parcial do DNA dupla fita em regiões específicas (domínios de dissociação - “*melting domains*”), devido a conteúdos distintos de sequências G-C (Guanina-

Citosina) em domínios da sequência, onde regiões com alto percentual GC são de difícil desnaturação, em relação a A-T, por conter ligações triplas de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, ao invés de duplas. Esta técnica oferece um método rápido para a caracterização e monitoramento da estrutura e dinâmica populacional de comunidades microbianas (HURST et al., 2007), além de menor custo em relação a técnicas de sequenciamento em larga escala.

Para que possa ser aplicada, a DGGE demanda uma amplificação prévia via PCR da região de interesse na sequência. Além das questões técnicas que devem ser levadas em consideração de uma PCR convencional (exemplo: formação de *heteroduplex*, sequências quiméricas e erros de cópia da polimerase), as quais podem vir a gerar artefatos em um gel de DGGE, um fator limitante em seu uso é o tamanho de fragmentos que podem ser utilizados, relativamente pequenos, até 500 pares de bases (pb) (MUYZER; SMALLA, 1998). Tem-se também que a detecção de variantes de sequências é limitada, demandando o uso de sequências “grampo” ricas em G-C “*GC-clamps*” para uma melhor resolução e separação das bandas no gel; estas sequências de aproximadamente 40 pb são inseridas à extremidade 5' de um dos oligonucleotídeos iniciadores - “*primers*” - da PCR, sendo coamplificadas junto ao fragmento de interesse, agindo como um domínio que dificulta o desemparelhamento das fitas de DNA, impedindo uma completa dissolução em simples fitas e, conseqüentemente, levando aos fragmentos a se estabilizarem em porções visíveis do gel (MUYZER; SMALLA, 1998). A região do genoma tipicamente escolhida para estudo refere-se ao gene 16S rDNA, dado seu vasto uso e existência de bancos de dados disponíveis, seu poder de discriminação para estudos filogenéticos e aplicabilidade de uso a todos os domínios da vida (WEISBURG et al., 1991). A escolha desta região alvo traz questões a serem consideradas, onde sabe-se que há variações nos *operons* de rDNA em um mesmo microrganismos, de forma que espécies tem múltiplas cópias e mesmo variações de sequência entre elas, o que leva a espécies individuais que podem gerar um perfil de múltiplas bandas em um gel (HURST et al., 2007).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a dinâmica do filo Bacteroidetes no processo de biodegradação de Blenda PCL/A/PS em solos arenoso e argiloso, considerando o perfil das comunidades do filo presentes nas amostras. Para tanto, buscou-se alcançar os seguintes objetivos específicos:

- 1 – Avaliar se a presença de Bacteroidetes é constante em todo o processo de biodegradação.
- 2 – Compreender quais fatores são determinantes para o estabelecimento das comunidades do filo.
- 3 – Avaliar o efeito do tipo de solo e dos plásticos sobre a comunidade.
- 4 – Identificar táxons específicos do filo que estejam presentes no processo.
- 5 – Identificar genes de interesse para biodegradação e avaliar sua eficiência em reações de PCR, visando futuras PCRs quantitativas (qPCR).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo” no Departamento de Genética da Universidade de São Paulo, ESALQ/ USP, na cidade de Piracicaba/ SP. Deu-se exclusivamente sobre amostras de DNA total de solos coletados e submetidos a ensaio de biodegradação pela Dra. Pilar D. C. S. Mariani, em trabalho de pós-doutorado desenvolvido nesta universidade, entre os anos de 2012 e 2013, conforme apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema resumido da metodologia empregada neste trabalho e no desenvolvido previamente por Mariani (2010) e em pesquisa em andamento

4.1 Obtenção dos materiais plásticos

Para realização do ensaio de biodegradação utilizou-se dos materiais plásticos PCL (Poli ϵ -caprolactona) e Blenda PCL/A/PIS, como também celulose como parâmetro de referência de biodegradação. O PCL foi preparado pela sua adição na forma de pélete no homogeneizador, a 1800 rpm por 2 min. O material fundido foi rapidamente colocado na

prensa aquecida a 120°C e mantido a 4,5t por 5 min. O PCL - CAPA 6800 cedido pela ARTECOLA Indústrias Químicas Ltda. A blenda composta por: 40% de Poli (ϵ -caprolactona), 36,5% de amido de milho, 3,5% de Proteína Isolada de Soja e 20% de D-sorbitol (% p/p) foi preparada em homogeneizador de alta rotação e cisalhamento (Drais) e posterior prensagem a quente, primeiramente adicionando-se o PCL puro ao homogeneizador, nas mesmas condições anteriores, e após a fusão do mesmo, adicionou-se a pré-mistura de amido, sorbitol e proteína isolada de soja. A mistura foi mantida a 1800 rpm por 1 min. e rapidamente colocada na prensa aquecida a 120°C. O amido de milho SNOW-FLAKE 6704, foi cedido pela Corn Products Brasil e a proteína Isolada de Soja, a produzida pela Nutraceutics. O Plastificante D-sorbitol utilizado foi o Synth e a celulose microcristalina fabricado pela Avicel - Fluka.

Ambos os materiais foram confeccionados no Laboratório de Processamento de Polímeros do Departamento de Tecnologia de Polímeros da FEQ/Unicamp durante o doutorado da Dra. Pilar D. S. C. Mariani e início do pós doutorado, entre os anos de 2009 e 2011.

4.2 Amostragem dos solos

Neste trabalho foram utilizadas amostras de dois diferentes tipos de solo: Neossolo Quartzarênico, de textura arenosa, e Nitossolo Vermelho Eutroférico, de textura argilosa, coletadas na região de Piracicaba/ SP (Figura 6). Ambos encontravam-se recobertos por gramínea de crescimento espontâneo. A grama foi removida e a camada superficial dos solos coletada até uma profundidade de 10 cm.

Figura 6 - Localidade de coleta e estudo dos solos: cidade de Piracicaba, São Paulo. Adaptado de Abreu (2015)

Figura 7 - Microcosmos para estudo de biodegradação, destacando dois tipos de solo utilizados (Arenoso e argiloso) e ilustrando plástico* em processo de biodegradação

4.3 Ensaio de Biodegradação

Os ensaios de biodegradação foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Solo – ESALQ/ USP.

O experimento de biodegradação foi realizado pelo método da respirometria, seguindo a norma ASTM D 5988 – 03 (“Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting”), com modificações, e a metodologia proposta por Anderson (1982), dividido em: 1) solo de textura argilosa e 2) solo de textura arenosa. Para cada condição (1 e 2) foram incubados, em frascos separados, amostra de PCL puro, amostra da blenda PCL/A/PIS e celulose microcristalina Avicel®, utilizada como controle positivo em testes de biodegradação. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

Para cada solo foram utilizados frascos de vidro de 2,0 L, com tampas vedantes, contendo 300,0 g de solo peneirado a 2,0 mm e a dose de Carbono (C) adicionada na forma de plástico foi de 1,2 mg C.g⁻¹ solo (Figura 7). A umidade do solo foi corrigida a 60% da capacidade de retenção máxima de água de acordo com a metodologia descrita na norma ISO 17512-1. A reposição de água foi feita a cada 15 dias no primeiro mês e posteriormente a cada 30 dias, através do acompanhamento periódico da massa total dos frascos.

O dióxido de carbono (CO₂), produzido pela biodegradação do polímero, foi capturado por uma solução de NaOH 0,5 M, mantida em um béquer de 50 mL no interior do frasco vedante. Após incubação a 28 °C, por períodos de três dias, os frascos foram abertos e o CO₂, capturado pela solução NaOH 0,5 M, foi precipitado através da adição de 1,0 mL de solução saturada de BaCl₂. A solução de NaOH excedente foi titulada com HCl 0,5 M, usando-se 1 gota de fenolftaleína como indicador. As leituras de CO₂ foram realizadas duas vezes por semana até se completarem os 90 dias de incubação, passando para uma vez por semana até o final do experimento.

Periodicamente, nos tempos 7, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 d, amostras de solo foram coletadas e armazenadas em UltraFreezer (Forma Scientific, Marietta, USA) a -80°C para a extração do DNA genômico utilizados nas análises moleculares.

4.4 Determinação da biodegradação

A biodegradação foi determinada através do cálculo da relação entre o CO₂ liberado e o CO teórico, conforme eq. (1):

$$\text{Biodegradação (\%)} = \frac{\text{MpCO}_2}{\text{MtCO}_2} \times 100 \quad (1)$$

onde:

MpCO₂ = Massa de dióxido de carbono produzido (mg)

MtCO₂ = Massa de dióxido de carbono teórico (mg)

A análise estatística da biodegradação foi feita através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de médias (Tukey p = 0,05), gerando o gráfico na Figura 2.

4.5 Extração de DNA Genômico do Solo

Para a extração de DNA total de solo foi utilizado o *Kit Power Soil DNA* (MOBIO, Carlsbad, CA, CAT. Nº 12888-50), seguindo-se o protocolo conforme recomendação do fabricante. O DNA total extraído foi quantificado por comparação com padrão de massa após eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v). Foram utilizados 2µL de DNA, aplicados com 2µL de *Loading Buffer* (glicerol, TE, Azul de bromofenol) contendo corante SYBR Gold® (*Invitrogen - Life Technologies, Paisley, UK*) 500X (1/1000) em tampão TBE 0,5X. O padrão de DNA para tamanho e quantificação foi o 1Kb *ladder* (*Fermentas - Life Technologies, Paisley, UK*). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

4.6 Amplificação de regiões variáveis do RNA ribossomal 16S de Bacteroidetes

Visando o estudo específico de microrganismos do filo Bacteroidetes utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) apresentados na literatura científica como específicos e eficazes no anelamento a sequências de rDNA da subunidade menor do ribossomo (16S). Dois pares de iniciadores foram utilizados, conforme Tabela 1. Em ambas, para realização do DGGE, utilizou-se a sequência de nucleotídeos para grampo GC proposta por Muyzer et al. (1993), adicionada ao iniciador de replicação, à montante (*forward*).

Tabela 1 – Sequências de *primers* utilizados

Sequências dos <i>primers</i>	Sequência (5'-3')	Referência
CF418	CCC TAT GGG TTG TAA ACT	DÍEZ-VIVES et al. (2012)
907RM	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	DÍEZ-VIVES et al. (2012)
798cfbF	CR AAC AGG ATT AGA TAC CCT	BACCHETTI DE GREGORIS et al. (2011)
cfb967R	GGT AAG GTT CCT CGC GTA T	BACCHETTI DE GREGORIS et al. (2011)
Grampo GC	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	MUYZER et al. (1993)

As reações de PCR foram realizadas em equipamento Veriti *Thermal Cycler* (*Applied Biosystems - Life Technologies, Paisley, UK*), sob as mesmas condições de amplificação da PCR propostas pelos autores em seus trabalhos referência, sendo:

- CF418/ 907RM – Fragmentos de 418 a 435 pb. Ciclagem de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C; 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. As concentrações finais de solução, em 25µL: 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 0.2 µM de primers, 2 mM de MgCl, 1× Tampão PCR e 1 U Taq DNA polimerase (Fermentas - *Life Technologies, Paisley, UK*).

- 798cfbF e cfb967R - Fragmento de 240 pb. Ciclagem de 5 min 95°C; 30 ciclos de 15 seg a 95°C; 15 seg a 61,5°C; 30 seg a 72°C, e extensão final por 5 min a 72°C. As concentrações finais de solução, em 25µL: 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 0.4 µM de primers, 2 mM de MgCl, 1× Tampão PCR e 1 U Taq DNA polimerase (Fermentas - *Life Technologies, Paisley, UK*).

O DNA amplificado foi quantificado por comparação com padrão de massa após eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). Foram utilizados 4µL de DNA, aplicados com 2µL de *Loading Buffer* (glicerol, TE, Azul de bromofenol) contendo corante SYBR *Gold*® (*Invitrogen - Life Technologies, Paisley, UK*) 500X (1/1000) em tampão TBE 0,5X. O padrão de DNA para tamanho e quantificação foi o 1Kb *ladder* (Fermentas - *Life Technologies, Paisley, UK*). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

4.7 PCR-DGGE

Para realização da técnica de DGGE, partiu-se do uso de produtos de PCR amplificados com os *primers* 798F/ 967R sobre as amostras de DNA. Primeiramente, todas as amostras sofreram uma PCR com estes primers, sem grampo GC, para garantir uma melhor segunda reação de PCR, com quantidade suficiente de DNA, conforme reação padrão citada previamente. A segunda reação de PCR se deu com o mesmo par de primers, desta vez com grampo GC. Estes produtos de PCR foram quantificados com o uso do acessório nanocell para Biomate 3 (Thermo Scientific, Waltham, EUA) e a quantidade de DNA aplicada por canaleta padronizada em 4000 ng, 4µL de *Loading Buffer* (glicerol, TE, Azul de bromofenol) e água ultra pura completando um volume de 20µL.

O gel de DGGE foi feito utilizando aparelho PhorU2 System (Ingeny, Leithen, NL). Foram preparadas solução estoque A (8% - acrilamida [30%] /uréia formamida 0%) e B (8% - acrilamida [30%]/ uréia formamida [70%]), para formar uma solução de alta concentração *High* (4,69 mL de A e 20,31 mL de B) e outra de baixa concentração *Low* (10,94 mL de A e 14,06 mL de B). Utilizou-se 75µL de persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈) 20% e 12µL de TEMED (C₆H₁₆N₂) para polimerização do gel, em cada uma das soluções, *High* e *Low*. A mistura das soluções gerou um gel com gradiente variando de 45% a 65% de desnaturação. O gel de aplicação para formação das canaletas (*stacking*) foi formado utilizando 7mL de solução A, com 45µL de persulfato de amônio 20% e 10µL de TEMED (*Invitrogen - Life Technologies, Paisley, UK*). A corrida foi realizada a 60°C, 100V por 16h.

Após a eletroforese, os géis foram removidos e corados com 1µL SYBR *Gold* ® (*Invitrogen - Life Technologies, Paisley, UK*) 500X em 10 mL de tampão 0,5 X de TAE. A plataforma de software do BioNumerics versão 5.1 (Applied Maths, NV, Belgium) foi utilizada para analisar os perfis de DGGE. Análises de agrupamento hierárquico foram feitas utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages*) e a correlação foi calculada usando o coeficiente de similaridade de Jaccard, conforme recomendado por Fromin et al. (2002). A medida aplicada no grau de ajuste entre a matriz de similaridade original e a matriz dada pelo método de agrupamento foi o índice de correlação cofenética, sendo quanto mais próximos de 1 o valor gerado, menor a distorção provocada pelo agrupamento com o método de UPGMA (BUSSAB; MIAZAKI; ANDRADE, 1990 apud REIS, 2012).

Buscando testar o efeito das variáveis Solo, Tempo e Tipo de plástico sobre os perfis das comunidades observados no DGGE, utilizou-se de análises de similaridade (ANOSIM), com auxílio do programa Primer6 para Windows versão 6.0 (Plymouth, UK). Para isto, construiu-se uma matriz de distâncias sem transformação dos dados utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis como medida de distância (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998 apud NAVARRETE, 2009). Os valores de R obtidos a partir daí, utilizando 1000 permutações, expressam o nível de separação das estruturas de comunidades microbianas em função das variáveis delimitadas. Interpretam-se os valores de $R > 0,75$ como indicativos de grupos bem separados; $R > 0,5$ como grupos com sobreposição, mas claramente diferenciados e $R < 0,25$ como grupos pouco separados (CLARKE; GORLEY, 2001 apud NAVARRETE, 2009).

4.8 Isolamento e sequenciamento de *amplicons* 16S rDNA separados por DGGE

Bandas foram excisadas de géis de DGGE de Bacteroidetes e eluídas em 20 μ L de água ultra-pura (Milli-Q) esterilizada. O DNA difundido foi usado como molde em reações de PCR com os *primers* 798F/967R, sem grampo GC, gerando 200 μ L de produto, purificados com o kit GFX PCR DNA em 20 μ L de solução. A seguir, a solução foi concentrada à metade do volume inicial em *SpeedVac* - Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg, GE), sendo o produto quantificado em gel por comparação com padrão de massa após eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). Foram utilizados 4 μ L de DNA, aplicados com 2 μ L de *Loading Buffer* (glicerol, TE, Azul de bromofenol) contendo corante SYBR Gold® (*Invitrogen* - *Life Technologies, Paisley, UK* - *Life Technologies, Paisley, UK*) 500X (1/1000) em tampão TBE 0,5X. O padrão de DNA para tamanho e quantificação foi o 1Kb *ladder* (*Fermentas* - *Life Technologies, Paisley, UK* - *Life Technologies, Paisley, UK*). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

Os amplicons foram submetidos a um sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems* - *Life Technologies, Paisley, UK* - *Life Technologies, Paisley, UK*) para sequenciamento. As sequências obtidas foram comparadas para afiliação com sequências do *Ribosomal Database Project* (RDP) (WANG et al., 2007), em busca restrita a sequências com alta qualidade, maiores que 1200 pb.

4.9 Desenho de *primers* específicos para genes de interesse

Na busca por compreender o papel de Bacteroidetes na degradação dos plásticos, realizou-se um estudo de genes com papel potencial na biodegradação dos plásticos em genomas do filo Bacteroidetes, partindo da família bacteriana Chitinophagaceae. As espécies referência foram: *Niastella koreensis*, *Niabella soli* e *Chitinophaga pinensis*. Foram escolhidos os genes para Protease e Lipase, contendo sequências típicas a peptídeos sinais. Utilizando software CLC Genomic Workbench v.5.5.1 (CLCbio, Aarhus, Dinamarca), as sequências referentes a estes genes nos genomas foram separadas, alinhadas e somente as que se mostraram presentes nos genomas das três espécies foram selecionadas para a etapa posterior, considerando a maior abrangência possível daqueles genes na família Chitinophagaceae. Destas realizou-se um novo alinhamento, com seleção de porções conservadas na sequência. Foram desenhados *primers* que amplificassem exclusivamente fragmentos internos a estas regiões, contendo produtos de no máximo 250pb, considerando um possível uso dos *primers* para reações de RT-qPCR. Os *primers* foram desenhados contendo no máximo 20 pb e mínimo 17 pb. A seguir foram testados diante de DNA de *Chitinophaga pinensis* DSM 2588 adquirido do DSMZ (*Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) para uso como DNA de referência em PCRs, com reações padronizadas em:

- LipaseF/ LipaseR: Ciclagem de 5 min 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C; 30 seg a 55°C; 30 seg a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. As concentrações finais de solução, em 25µL: 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 0.2 µM de *primers*, 2 mM de MgCl, 1× Tampão PCR e 1 U Taq DNA polimerase (Fermentas - *Life Technologies, Paisley, UK*).
- ProteaseF/ ProteaseR: Ciclagem de 5 min 95°C; 30 ciclos de 15 seg a 95°C; 15 seg a 61,5°C; 30 seg a 72°C, e extensão final por 5 min a 72°C. As concentrações finais de solução, em 25µL: 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfatados, 0.4 µM de *primers*, 2 mM de MgCl, 1× Tampão PCR e 1 U Taq DNA polimerase (Fermentas - *Life Technologies, Paisley, UK*).

4.10 Purificação dos Produtos de PCR

Para a purificação dos produtos de PCR a ser sequenciados os amplicons dos genes para Protease e Lipase foram previamente amplificados até se obter 200µL de produto. Foi

utilizado o *Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Fairfield, USA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado por comparação com padrão de massa após eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). Foram utilizados 4µL de DNA, aplicados com 2µL de *Loading Buffer* (glicerol, TE, Azul de bromofenol) contendo corante SYBR Gold® (Invitrogen - Life Technologies, Paisley, UK) 500X (1/1000) em tampão TBE 0,5X. O padrão de DNA para tamanho e quantificação foi o 1Kb *ladder* (Fermentas - Life Technologies, Paisley, UK). O gel foi submetido a um campo elétrico de 100V por aproximadamente 30 min e então foto documentado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção de *primers* para estudo de Bacteroidetes em solos

Para realização do trabalho proposto testou-se inicialmente dois conjuntos de *primers* trazidos na literatura científica e escolhidos aleatoriamente entre os previamente validados utilizando técnica de DGGE, eficientes e específicos para estudos de microrganismos do filo Bacteroidetes. A busca limitou-se a *primers* testados com uso de DGGE, pois esta técnica impõe restrições ao desenho de *primers* como limite de fragmentos em 500 pb e uso de *primers* com bases degeneradas, que podem gerar padrões de bandas distintos partindo de uma única sequência de rDNA (MUYZER et al., 1993). Ambos os *primers* são específicos para amplificação de regiões variáveis do DNA ribossomal 16S, úteis na taxonomia de microrganismos. Os *primers* propostos por Bacchetti de Gregoris et al. (2011) amplificam a região V5 (YARZA et al., 2014). Os *primers* propostos em Díez-Vives et al. (2012), originalmente desenvolvidos para estudo de ambiente marinho, a região V4 (YARZA et al., 2014).

Análises *in silico* dos pares de *primers* foram realizadas, considerando a abrangência dos *primers* na detecção de microrganismos pertencentes à família Chitinophagaceae. Tal família é de interesse pois potencialmente influencia o processo de degradação dos plásticos em solos, conforme estudos de Mariani¹ (comunicação pessoal), em andamento e por apresentar potencial biotecnológico na degradação de compostos carbônicos de alto peso molecular, devido à sua reconhecida atividade β -glicosídica em agregados no solo, e de destaque na realização desta função em comunidades bacterianas (BAILEY et al., 2013). Tal fato indica um papel deste grupo bacteriano neste ambiente, como degradadores e aponta o sentido do favorecimento de seu desenvolvimento nos solos sob as condições em estudo. As análises de especificidade destes *primers* foram feitas utilizando o banco de dados disponível online “SILVA” <<http://www.arb-silva.de/>> sobre informações de sequências associadas especificamente a rDNA, resultando no apresentado na tabela a seguir (Tabela 2).

1

Tabela 2 – Abrangência dos *primers* para Bacteroidetes utilizados em relação à família Chitinophagaceae e seus gêneros utilizando base de dados ARB-SILVA, consulta em Jan/2015

Gênero	BACCHETTI DE GREGORIS et al. (2011)	DIEZ-VIVES et al. (2012)
Chitinophaga	88.0%	0,00%
Ferruginibacter	72.7%	0,00%
Filimonas	82.1%	0,00%
Flaviumibacter	83.3%	0,00%
Flavisolibacter	82.7%	0,00%
Flavitalea	71.1%	0,00%
Hydrotalea	86.8%	0,00%
Lacibacter	83.3%	0,00%
Niabella	89.2%	0,00%
Niastella	86.8%	0,00%
Parasegetibacter	81.8%	0,00%
Sediminibacterium	77.3%	0,00%
Segetibacter	87.7%	0,00%
Solibius	100.0%	0,00%
Taibaiella	73.0%	0,00%
Terrimonas	89.1%	0,00%
uncultured	77.0%	2,70%

As análises permitiram observar a limitação deste conjunto de *primers* quanto à abrangência para estudos do filo Bacteroidetes, considerando esta e outras famílias. O conjunto de *primers* proposto por Bacchetti de Gregoris et al. (2011) apresentou uma abrangência maior em relação a Diez-Vives et al. (2012), sendo sensível à detecção da família Chitinophagaceae, atingindo todos os gêneros conhecidos na família. Desta forma, este conjunto foi escolhido para os estudos que seguiram nesta pesquisa, sendo testado diante das amostras de solo de interesse, que apontaram eficiência dos novos *primers* na detecção de Bacteroidetes nos solos em momentos variados da biodegradação.

5.2 Avaliação da presença do filo Bacteroidetes em momentos distintos da biodegradação

Para avaliação da dinâmica do filo ao longo de todo o intervalo de tempo estudado, utilizou-se de gel de DGGE, sem réplicas, contendo amostras representando os dois tipos de

solo (arenoso e argiloso), os dois tipos de polímero (blenda e PCL), do solo controle (branco), para comparações, e dos momentos: 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias. Obteve-se assim o perfil na Figura 8.

Figura 8 - Dendrograma de similaridade com perfil de bandas de DGGE, contendo amostras de todos os momentos da biodegradação, por símbolos, sendo: PCL (●), Blenda (■) e Branco (▲), em solos Arenoso (☆) e Argiloso (★), pelo preenchimento ou não do símbolo. Quadro azul indica similaridade entre o efeito da blenda; quadro vermelho similaridade entre amostras de solo argiloso; quadro amarelo similaridade entre os solos controle argilosos; quadro verde similaridade entre os solos controle arenosos; quadros pretos amostras que não seguem os padrões observados para as similares. Valores nos ramos do dendrograma indicam índice cofenético

A presença de microrganismos do filo Bacteroidetes em todos os momentos avaliados é perceptível através da observação de padrões de bandas em todas as amostras. Este filo, tendo colonizado praticamente todos os locais da Terra, e com grande número de espécies

ocupando os mais variados nichos, é comumente encontrado em solos (THOMAS et al., 2011). Sua presença foi detectada em todos os tempos do processo de degradação nos experimentos desenvolvidos tanto da blenda como do PCL, não sendo eliminados diante da presença do plástico e os subprodutos da degradação a ele associados (Figura 8). Tal como observado na dinâmica de bactérias de solos cultiváveis diante de plásticos biodegradáveis por (MASUI et al., 2011), a comunidade de Bacteroidetes persiste durante todo o processo de biodegradação, sofrendo alterações em sua composição ao longo do tempo, com grupos sempre presentes e alguns exclusivos a determinados momentos da degradação ou à presença de determinado plástico (Figura 8).

A fim de identificar quais grupos do filo Bacteroidetes estão presentes na biodegradação, bandas de distintos géis foram aleatoriamente recortadas e processadas para sequenciamento. O resultado de sequenciamento aponta para a presença da família Chitinophagaceae, sendo esta a única família detectada na seleção aleatória de 10 bandas, realizada em três géis diferentes (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequências obtidas da reamplificação de 10 bandas selecionadas aleatoriamente entre os géis de DGGE para estudo de Bacteroidetes e classificadas utilizando banco de dados RDP.

	Sequência (5'-3')	Classificação da Sequência	Nível de confiança da classificação
Banda 1	GAACATTCTACGATGATTACTCGACATTTGCGATAT ACATGTGAGGTTGTCTGTAGCGAAAGCATTAAAGTA ATCCACCTGGGAAGACAGACCGCAAGGATTGAAA CTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCACAAGACGG TGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGA ACCTTACCA	Filo – Bacteroidetes	96.00%
Banda 2	GATGAATACTCGACATACTGCGATACTCCATGTG TCTGAGCGAAAGCATTAAAGTATTCCACCTGGGAAG TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC GGGGGTCCGCACAGAGCGGTGAG	Família – Chitinophagaceae	91.00%
Banda 3	ATACACATACAAGTGTCTGAGCGAAAGCGTTAAG TAATCCACCTGGGAAGGACGACCGCAAGGATGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGGTCCGCAAAAGCGG TGGAGCATGATC	Filo – Bacteroidetes	82.00%
Banda 4	ACTCGACATCCGCGATACACTGTGTGGTGTCTGAG CGAAAGCATTAAAGTATCCACCTGGG ACCATACGCGAGGAACCTTACCATAACGCGAGGAA CCTTACCATAACGCGAGGAACCTTACCATAACGCGAG GAACCTTACCATAACGCGAGGAACCTTACCATAACGCG GAGGAACCTTACCATAACGCGAGGAACCTTACCATA CGCGAGGAACCTTACCATAACGCGAGGAACCTTAC CATACGCGAGGAACCTTCCCATACGC	Família – Chitinophagaceae	87.00%
Banda 5	GATGATTACTCGACATTAGGGATACACTATAAGTGT CCAAACGAAAGCGTTAAGTAATCCACCTGGGAAGT ACGACCGCAAGGATGAAACTCAAAGGAATTGACG GGGGTCCGCACAAGC	Filo – Bacteroidetes	85.00%
Banda 6	CGATGATTACTCGACATTAGCGATACACAGCAAGT GTCTGAGCGAAAGCATTAAAGTAATCCACCTGGGAA GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA CGGGCCGTCCGCACAAGACGGT	Filo – Bacteroidetes	91.00%
Banda 7	TGAGTTTCAATCTTGCGATCTACTTCCAGGTGG TATACTTAATGCTTTCGCTCAGACACACACAGTGT ATCCCGTATGACGAGTATTCATCGTTTAGGGCGTGG ACTACCAGGGTAATTAATCCTGTTCTGA	Família – Chitinophagaceae	99.00%
Banda 8	TTGTGCGGACCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAT TCTTGCGAACGTACTTCCAAGTGAAGAATACTTAA TGCTTTTCGCTCAGACGCTACAGTGTATACAACAC GTCGAGTAATCATCTG	Família – Chitinophagaceae	88.00%
Banda 9	CTTGTGCGGACCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAA CCTTGGCGTCTGACTTCCAGGAGGATTACTTAAT GCTTTTCGCTCAGACGCTACAGTGTATACAACAC GTCGAGTAATCATCTG	Filo – Bacteroidetes	85.00%
Banda 10	CTTGTGCGGACCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAA CCTTGGCGTCTGACTTCCAGGAGGATTACTTAAT GCTTTTCGCTCAGACACACATTGTGTATCAGTATG TCGAGTAATCATCTG	Gênero – <i>Chitinophaga</i>	98.00%

5.3 Tipo de solo como fator determinante na dinâmica de Bacteroidetes

A comunidade de Bacteroidetes inicialmente presente no solo Arenoso se diferencia do solo Argiloso, com pouca sobreposição, como observado no quadro vermelho (Figura 8). Análise de similaridade realizada a partir do perfil gerado por este gel confirma esta observação, onde o valor de R global, considerando efeito da variável solo sobre a comunidade, aponta diferenciação com alguma sobreposição (Tabela 4). Tal observação fica mais clara ao se observar o efeito dos solos considerando somente os solos controle, onde há um claro efeito desta variável diante do valor observado de R. Estudos como o de (CHEN et al., 2014) apontam para uma composição de comunidade bacteriana única a cada tipo de solo, arenoso ou argiloso, à medida que as características físico-químicas de cada solo configuram ambientes distintos. A comunidade do solo arenoso é selecionada pela blenda polimérica em todos os momentos avaliados, gerando uma configuração única e constante (quadro AZUL, Figura 8), sendo esta leitura confirmada pela análise de similaridade, considerando somente solo Arenoso (Tabela 4). Esta blenda, sendo rapidamente degradada neste solo, conforme a curva de biodegradação em solo arenoso (Figura 2), oferece uma alteração do microcosmo favorável ao estabelecimento de uma única comunidade capaz de interagir em sua presença. Tal fator pode estar associado ao aporte de matéria orgânica disponibilizado pela blenda, com seu conteúdo C/N favorável à degradação bacteriana, e às características típicas do solo arenoso.

No solo argiloso, a separação não é tão clara entre os perfis das comunidades de Bacteroidetes sobre blenda e PCL, considerando-se todos os tempos da biodegradação simultaneamente, o que aponta para uma maior influência do tipo de solo (com suas características físico-químicas e constituição microbiana inicial) do que dos plásticos sobre a composição da comunidade. Ainda assim a influência dos plásticos é perceptível, de forma que quando estes estão presentes nos solos as comunidades ali existentes se distinguem da comunidade dos solos controle (branco), sem plásticos, bem estabelecidas nos tempos iniciais e centrais (15, 30, 60 e 90d) (quadro AMARELO, Figura 8).

Tabela 4 – Valores globais de R para comparações entre as variáveis tempo, plásticos e tipo de solo utilizando matriz binária que originou a Figura 8, com destaque para valores que indicam variáveis determinantes

	Tempo	Plástico	Tipo de Solo
Todos os dados	-0,061	0,167	0,425
Blenda	-0,2	--	0,38
Solos Controle	<u>0,542</u>	--	<u>0,88</u>
PCL	0,117	--	0,47
Solo Arenoso	-0,1	<u>0,68</u>	--
Solo Argiloso	0,28	0,26	--

5.4 Influência da presença de plásticos no solo na dinâmica de Bacteroidetes

Uma análise mais detalhada para identificação da influência da biodegradação dos plásticos na composição da comunidade de Bacteroidetes levou à escolha dos tempos de maior atividade degradativa dos plásticos (30, 60 e 90 dias), como ponto de partida (Figura 2). A análise feita sobre estes três momentos e utilizando duplicatas biológicas dos ensaios, levou ao perfil de comunidades observado na Figura 9.

Figura 9 - Dendrograma de similaridade com perfil de bandas de DGGE, contendo amostras dos momentos 0, 30, 60 e 90d da biodegradação, solos arenoso e argiloso, todos os plásticos e duplicatas biológicas. Símbolos: PCL (●), Blenda (■) e Branco (▲), em solos Arenoso (☆) e Argiloso (★), pelo preenchimento ou não do símbolo. Valores nos ramos do dendrograma indicam índice cofenético

Como pode-se ver na Figura 9, as comunidades características aos solos controle em solo Arenoso mostram-se inalteradas ao longo do tempo pelas condições experimentais no microcosmo, o que não é observado quanto ao solo Argiloso. Isto indica que as condições experimentais afetam as comunidades de forma distinta com o passar do tempo, considerando os dois tipos de solo, dado o alto valor de R para a relação Controle x Tipo de solo (Tabela 5).

As condições experimentais influenciam as comunidades de Bacteroidetes, à medida que a composição no momento inicial (0d) já se distingue da composição dos solos Branco a partir do primeiro momento avaliado (30d). Esta influência das condições experimentais no microcosmo não invalida atribuir aos plásticos alterações observadas na dinâmica, indicando somente que a influência do experimento leva a alterações na comunidade nos primeiros dias (entre 0d e 30d), mas que após isto não traz influência perceptível (entre 30, 60 e 90d).

Nas amostras em solo Argiloso, não se observa um padrão claro nos agrupamentos formados pela análise de similaridade dos perfis, ao se observar todas as amostras em conjunto. No entanto, analisando-se separadamente os perfis e considerando os tipos de plástico e solo branco (Figura 10), observa-se novamente uma separação por tipo de solo, onde o solo arenoso gera uma comunidade com perfil bem estabelecido e distinto da comunidade no solo Argiloso, exceto para blenda. Esta observação é clara também ao se observar o coeficiente R quanto a Solos controle e PCLs, em relação ao tipo de solo (Tabela 5).

Fatores distintos melhor explicam os perfis observados para os dois tipos de solo, sendo o solo Arenoso influenciado principalmente pela presença dos plásticos e o solo Argiloso, pela sua própria dinâmica ao longo do tempo (Tabela 5). O conteúdo de matéria orgânica tipicamente maior em solos argilosos (HASSINK et al., 1993), por tornar a comunidade menos dependente de fontes energéticas orgânicas externas, pode explicar a dinâmica neste tipo de solo ser menos dependente da presença dos plásticos.

Tabela 5 - Valores globais de R para comparações entre as variáveis tempo, plásticos e tipo de solo utilizando matriz binária que originou a Figura 9, com destaque para valores que indicam variáveis determinantes

	Tempo	Plástico	Tipo de Solo
Todos os dados	0,321	0,046	0,124
Blenda	0,417	--	0,257
Solos Controle	0,14	--	<u>0,67</u>
PCL	<u>0,546</u>	--	<u>0,504</u>
Solo Arenoso	0,14	<u>0,62</u>	--
Solo Argiloso	<u>0,517</u>	0,148	--

Figura 10 - Dendrograma de similaridade com perfil de bandas de DGGE separadamente por tipo de plástico, contendo amostras dos momentos 30, 60 e 90d da biodegradação, solos arenoso e argiloso, com duplicatas biológicas. Símbolos: PCL (●), Blenda (■) e Branco (▲), em solos Arenoso (☆) e Argiloso (★), pelo preenchimento ou não do símbolo. Valores nos ramos do dendrograma indicam índice cofenético

Este estudo aponta para dois grandes grupos que separam Blenda, com PCLs de 30 e 60d, em um grupo e as demais amostras de Controle e PCL (90 e 180d), à parte. Isto indica uma maior influência da Blenda ou de seus compostos degradados no estabelecimento da comunidade de Bacteroidetes no solo arenoso, em relação ao PCL ou mesmo das condições experimentais, onde a Blenda influencia de forma ativa a comunidade. O PCL influencia a comunidade potencialmente de duas formas: nos momentos iniciais, exerce uma influência similar à da Blenda; porém, quando a degradação do PCL encontra-se mais avançada, a influência sobre a comunidade já é nula, fato este que liga os momentos de 90d e 180d à comunidade formada pelos solos controle, que não recebeu influência dos plásticos.

As comunidades foram avaliadas tempo a tempo, gerando o perfil observado na Figura 12.

Figura 12 - Dendrograma de similaridade com perfil de bandas de DGGE contendo amostras de solo Arenoso separadas pelos momentos 30, 60, 90 e 180d da biodegradação, com triplicatas biológicas. Símbolos: PCL (▲), Blenda (△) e Branco (▲). Valores nos ramos do dendrograma indicam índice cofenético

A comunidade associada à Blenda se distingue definitivamente das comunidade associada ao PCL somente nos momentos centrais da biodegradação, 60 e 90d (Figura 12), justamente os momentos de maior atividade degradativa registrada, de acordo com curva de biodegradação (Figura 2) sendo no início e fim do processo mais similar à comunidade junto ao PCL. Uma causa para esta diferença de padrões pode estar associada à textura do solo em questão, onde as partículas que compõem majoritariamente o solo arenoso apresentam menos poros que o solo argiloso, sendo estas de diâmetros maiores, com menor conteúdo de C e N e contendo uma biomassa bacteriana tipicamente menor que a de solos argilosos. Pelas restrições de matéria orgânica, este solo abriga uma comunidade bacteriana com características de estrategista R, capaz de apresentar um desenvolvimento rápido diante de uma alteração ambiental (WEINBAUER; HÖFLE, 1998). Diante de um ambiente com uma densidade microbiana mais baixa, típico a solos arenosos, os fatores de crescimento dependentes de densidade tem efeito pequeno e a regulação da população é dirigida por mecanismos ambientais que variam, tais quais tempestades, secas, extremos de temperatura ou mesmo disponibilidade de nutrientes (ANDREWS; HARRIS, 1986). Segundo Fierer et al. (2007), um dos atributos ecológicos que permitem relacionar bactérias como estrategistas R ou K (respectivamente, copiotróficos ou oligotróficos) é a resposta do desenvolvimento da comunidade à adição de um substrato, sendo a fase de desenvolvimento inicial, fase *lag*, menor diante de estrategistas R, tal qual observado na curva de biodegradação relativa ao solo arenoso diante da adição de Blenda. Esta curva pode estar associada à abundância de Bacteroidetes ao longo do tempo, porém esta especulação necessita ser avaliada. Fierer et al. (2007) apontam uma série de atributos a ser avaliados, para que se defina uma comunidade como copiotrófica ou heterotrófica, sendo estes indicativos para pesquisas futuras: taxa de crescimento populacional, responsividade à adição de substratos, facilidade de cultivo, química e morfologia celular, tolerância a estresse ambiental, número de cópias de *operon* rDNA, entre outros.

Outra hipótese que explica as diferenças de comunidade e biodegradação dos plásticos nos dois solos é a presença significativa de fungos em solos arenosos, os quais são capazes de se manter em solos com poros de tamanhos distintos, por não se restringirem a filmes de água como bactérias, por exemplo (HASSINK et al., 1993). Fungos podem ter uma atuação ativa na biodegradação dos plásticos, como observado por (VIEYRA et al., 2015), e na modulação das comunidades bacterianas que compartilham o mesmo ambiente, tanto pela degradação dos compostos dos plásticos quanto pelas próprias interações ecológicas entre as espécies.

5.6 Solo Argiloso e sua influência sobre a comunidade de Bacteroidetes

O último estudo realizado da dinâmica do grupo, partindo de 3 réplicas biológicas, se deu sobre amostras exclusivas de solo Argiloso, considerando que o tipo de solo é fator determinante e que os os momentos centrais no processo de biodegradação (30, 60 e, 90d) e final (180d) apresentam maior atividade de biodegradação, conforme Figura 13.

Figura 13 - Dendrograma de similaridade com perfil de bandas de DGGE contendo amostras de solo Argiloso dos momentos 30, 60, 90 e 180d da biodegradação, com triplicatas biológicas. Símbolos: PCL (■), Blenda (▲) e Branco (▲). Valores nos ramos do dendrograma indicam índice cofenético

A análise dos perfis das comunidades aponta para a variável tempo como de impacto significativo, de forma que o momento da biodegradação delimita a comunidade, em acordo com a análise de dissimilaridade desta comunidade ($R = 0,660$, contra $R = 0,132$

considerando a presença dos plásticos). A biodegradação no solo argiloso segue padrão distinto daquela que se observa em solo arenoso, sendo menos efetiva sobre a determinação de comunidades exclusivas sobre cada um dos dois plásticos Figura (13).

Para melhor compreensão do efeito dos plásticos no solo argiloso, foi realizada uma análise individualizando os momentos da biodegradação (30, 60, 90 e 180d), apresentada na Figura 14.

Figura 14 - Dendrograma de similaridade com perfil de bandas de DGGE contendo amostras de solo Argiloso separadas pelos momentos 30, 60, 90 e 180d da biodegradação, com triplicatas biológicas. Símbolos: PCL (●), Blenda (■) e Branco (▲). Valores nos ramos do dendrograma indicam índice cofenético

Neste solo, a comunidade associada à blenda se assemelha mais aos solos sem adição de plásticos, nos momentos inicial e final observados (30 e 180d, Figura 14). Quando a atividade degradativa é maior (90d) (Figura 2), observa-se que as comunidades de blenda e PCL se tornam similares entre si e distintas do solo sem plásticos, o que aponta a atuação de grupos bacterianos similares neste momento, diferenciando-se novamente mais a frente

(180d). Isso pode ser atribuído às características físico-químicas do solo, onde o solo de textura argilosa oferece uma condição de umidade mais homogênea no tempo, superfície de contato maior, poros que desempenham papel de abrigo diante de predação de microrganismos por protozoários e nematóides, microhabitats diferenciados que comportam nichos distintos e armazenam material orgânico (HASSINK et al., 1993), abrigando uma comunidade bacteriana mais diversa.

A comunidade de Bacteroidetes sobre a blenda, que oferece produtos na biodegradação com uma relação C/N favorável ao desenvolvimento bacteriano, segue um comportamento típico a populações k-estrategistas, mais densamente populosas de microrganismos, com maior diversidade e logo maior propensão no uso de novas fontes energéticas. Estrategistas k sobrevivem diante de populações mais densas e são limitados por fatores densidade-dependentes, como alimento disponível, metabólitos tóxicos ou predação. Organismos que competem bem em habitats densamente povoados e eficientemente adquirem energia do alimento podem ser favorecidos em um ambiente como o do solo argiloso (ANDREWS; HARRIS, 1986). Tal hipótese necessita ser verificada com experimentos, avaliando os parâmetros apontados por (FIERER et al., 2007) anteriormente.

A menor presença de fungos típica a solos argilosos também pode explicar estes resultados (HASSINK et al., 1993). À medida que a presença de fungos é menor em solos argilosos, dadas suas características, se estes são de fato atores importantes na biodegradação, e sua presença é reduzida, é esperada a resposta reduzida de biodegradação dos plásticos em solos argilosos, quando comparada a solos arenosos, e uma composição distinta nas comunidades bacterianas nos solos, dadas as variadas interações existentes.

5.7 Construção de *primers* para genes de Lipase e Protease, potenciais atuantes na degradação de blenda polimérica

Para uma melhor compreensão futura de como Bacteroidetes podem atuar na degradação do plástico, buscou-se avaliar a presença de alguns genes associados à degradação dos compostos da Blenda polimérica em estudo. É conhecida a importância de enzimas do tipo lipases e proteases na degradação de polímeros como a ϵ -caprolactona (BHARDWAJ et al., 2013; TOKIWA et al., 2009; TOKIWA; SUZUKI, 1977). Desta forma, buscou-se desenhar

primers específicos para cada uma destas categorias de enzimas que se mostrassem exclusivos a Bacteroidetes.

Diante do exposto, e da dificuldade no desenho de *primers* para enzimas ubíquas como lipases e proteases, que englobem todo um filo bacteriano sendo exclusivas somente a este, escolheu-se uma abordagem mais restritiva, limitando o desenho dos *primers* a genomas da família bacteriana Chitinophagacea. Os três genomas completamente sequenciados utilizados por estarem disponíveis *on line* na plataforma GeneBank (acesso Julho 2014) no momento do estudo, foram: *Chitinophaga pinensis*, *Niastella koreensis* e *Niabella soli*.

Os genes associados às funções delimitadas de proteases e lipases, pertencentes a estes microrganismos, foram então utilizados para alinhamento e desenho de *primers* específicos, onde não se observou alinhamento a outras espécies ou genes. As sequências constam na Tabela 5.

Tabela 5 - Sequências de *primers* utilizados para Lipase e Protease específicos a Chitinophagaceae

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência (5'-3')	Número de bases (pb)	Tamanho esperado de fragmento (pb)
Protease_Forward	GAY TAC CAG CAY ATT ATG AC	20	240
Protease_Reverse	AGG GMA YCA GGT CAT AKC C	19	
Lipase_Forward	ATG CAG GAR AAC CGK TC	17	116
Lipase_Reverse	TTK GTY TGS ARC CAW ACC	18	

5.8 Avaliação da presença de Lipases nas amostras ambientais

O conjunto de *primers* para amplificação de fragmentos gênicos de lipases e proteases foi confeccionado e utilizado para prospecção nas amostras de solo (Figura 15). A amplificação de DNA ambiental com estes *primers* aconteceu, o que aponta a presença de Chitinophagaceae nas amostras ambientais, os quais detêm genes para lipases e proteases em seus genomas.

Figura 15 - Produto de PCR utilizando o par de primers para Lipases (esquerda) e Proteases (direita) específicas a Chitinophagaceae, em amostra de solo. 4UL de Produto de PCR com 2uL de Loading Buffer (LB) contendo Syber diluído 1:1000. 40 minutos de corrida a 100V em gel de agarose 2%. M = Marcador de Peso molecular; Bco. = Branco; T = Amostra Teste (Blenda em solo Argiloso com 30 dias). Destaque para as bandas recortadas e sequenciadas

O produto de PCR sequenciado apontou sequências de *Chitinophaga pinensis* e *Niastella koreensis*, confirmando a presença de microrganismos pertencentes à família Chitinophagaceae nas amostras de solo. *Chitinophaga pinensis* é uma espécie reconhecida pela sua capacidade degradativa de compostos de alto peso molecular (THOMAS et al., 2011) em solos, tendo sido isolado primeiramente em solo australiano, em amostra de folhas de pinus no solo (SANGKHOBOL; SKERMAN, 1981).

6 CONCLUSÕES

Microorganismos do filo Bacteroidetes estão presentes em todos os momentos avaliados do processo de biodegradação da Blenda, dos PCL e mesmo nos solos sem adição de plástico. As comunidades que o compõem se distinguem conforme acontece a biodegradação, sendo o tipo de solo um fator determinante para formação do perfil. O solo Arenoso, onde a biodegradação é mais efetiva, apresenta comunidades com perfis bem delimitados, que se diferenciam na degradação da Blenda e do PCL. A dinâmica no solo Argiloso não exibe um padrão claro de influência dos plásticos sobre a comunidade, apontando, porém para uma convergência de similaridade das comunidades sobre blenda e PCL no momento de maior atividade degradativa. A família Chitinophagaceae está presente ao longo do processo e nos dois solos, sendo a espécie *Chitinophaga pinensis* uma destas, a qual detém genes de interesse para estudo de processos biodegradativos em solos, como lipase e protease, que tem presença confirmada no processo por este trabalho.

O conhecimento adquirido nesta pesquisa oferece subsídios para pesquisas de novos materiais biodegradáveis, uma vez que compreender como a biodegradação ocorre na natureza, permite a confecção de materiais mais eficientes e de menor impacto ambiental.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. P. E. Soil respiration. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. *Methods of soil analysis – Part 2 - Chemical and microbiological properties*, Wisconsin: Madison, 1982.
- ABREU, L.R. Mapa de Piracicaba. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:SaoPaulo_Meso_Piracicaba.svg>. Acesso em: 29 abr. 2015.
- ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. r- and K-selection and microbial ecology. In: K. C. MARSHALL, K.C. (Ed.). **Advances in microbial ecology**, New York: Springer US, 2015. p. 99–147.
- BACCHETTI DE GREGORIS, T.; ALDRED, N.; CLARE, A. S.; BURGESS, J. G. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 351–356, 2011.
- BAILEY, V.L.; FANSLER, S.J.; STEGEN, J.C.; MCCUE, L.A. Linking microbial community structure to β -glucosidic function in soil aggregates. **The ISME Journal**, London, v. 7, n. 10, p. 2044–2053, 2013.
- BARNES, D.K.A.; GALGANI, F.; THOMPSON, R.C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society. B: Biological Sciences**, London, v. 364, n. 1526, p. 1985–1998, 2009.
- BASTIOLI, C. Biodegradable materials: present situation and future perspectives. **Macromolecular Symposia**, Weinheim, v. 135, n. 1, p. 193–204, 1998.
- BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, New Jersey, v. 21, n. 2, p. 575–579, 2013.
- CHEN, J.; HE, F.; ZHANG, X.; XUAN, S.; JUFENG, Z.; ZHENG, J. Heavy metal pollution decreases microbial abundance, diversity and activity within particle-size fractions of a paddy soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 87, n. 1, p. 164–181, 2014.
- DERRAIK, J.G. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 842–852. 2002.
- DÍEZ-VIVES, C.; GASOL, J.M.; ACINAS, S.G. Evaluation of marine Bacteroidetes-specific primers for microbial diversity and dynamics studies. **Microbial Ecology**, Perth, v. 64, n. 4, p. 1047–1055, 2012.
- FIERER, N.; BRADFORD, M.A.; JACKSON, R.B. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, Durham, v. 88, n. 6, p. 1354–1364, 2007.

FROMIN, N.; HAMELIN, J.; TARNAWSKI, S.; ROSSI, P. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. **Environmental Microbiology**, New Jersey, v. 4, n. 11, p. 634–643, 2002.

GUPTA, R.S. The phylogeny and signature sequences characteristics of fibrobacteres, chlorobi, and bacteroidetes. **Critical Reviews in Microbiology**, New Jersey, v. 30, n. 2, p. 123–143, 2008.

HASSINK, J.; BOUWMAN, L.A.; ZWART, K.B.; BLOEM, J.; BRUSSAARD, L. Relationships between soil texture, physical protection of organic matter, soil biota, and c and n mineralization in grassland soils. **Geoderma**, Amsterdam, v. 57, n. 1/2, p. 105–128, 1993.

HEO, N.W.; HONG, S.H.; HAN, G.M.; MI, J.; SHIM, W. J. Distribution of small plastic debris in cross-section and high strandline on Heungnam Beach, South Korea. **Ocean Science Journal**, Seoul, v. 48, n. 2, p. 225–233, 2013.

HURST, C.J.; CRAWFORD, R.L.; GARLAND, J.L.; LIPSON, D.A. **Manual of environmental microbiology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 2007. 1293 p.

JAMBECK, J.R.; GEYER, R.; WILCOX, C. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 2015.

KIRCHMAN, D.L. The ecology of cytophaga–flavobacteria in aquatic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 91–100, 2002.

LUDWIG, W.; EUZÉBY, J.; WHITMAN, W. B. Road map of the phyla Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: GARRITY, G. B.; CASTENHOLZ, D. R.; RICHARD W. **Bergey's manual® of systematic bacteriology**. New York: Springer, 2010. p. 1–19.

MAKHIJANI, K.; KUMAR, R.; SHARMA, S.K. Biodegradability of blended polymers: a comparison of various properties. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v. 45, n. 16, p. 1801–1825, 2015.

MARIANI, P.D.S.C.; ALLGANER, K.; OLIVEIRA, F.B.; CARDOSO, E.J.B.N.; INNOCENTINI-MEI, L.H. Effect of soy protein isolate on the thermal, mechanical and morphological properties of poly (ϵ -caprolactone) and corn starch blends. **Polymer Testing**, Munich, v. 28, n. 8, p. 824–829, 2009.

MARIANI, P.D.S.C.; **Estudo da biodegradação da blenda poli (epsilon-caprolactona) / amido modificado/proteína isolada de soja em diferentes solos : caracterização dos produtos formados e avaliação da toxicidade**, 2010. 122 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Campinas, Campinas, 2010.

MARTENS, E.C.; KOROPATKIN, N.M.; SMITH, T.J.; GORDON, J.I. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the bacteroidetes sus-like paradigm. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 37, p. 24673–24677, 2009.

MASUI, A.; IKAWA, S.; FUJIWARA, N.; HIRAI, H. Influence for soil environment by continuing use of biodegradable plastic. **Journal of Polymers and the Environment**, New Jersey, v. 19, n. 3, p. 622–627, 2011.

MCDERMID, K.J.; MCMULLEN, T.L. Quantitative analysis of small-plastic debris on beaches in the Hawaiian Archipelago. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 48, n. 7/8, p. 790–794, 2004.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 6, p. 497–505, 2010.

MOORE-KUCERA, J.; COX, S.B.; PEYRON, M. Native soil fungi associated with compostable plastics in three contrasting agricultural settings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 14, p. 6467–6485, 2014.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 127–141, 1998.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695–700, 1993.

NAVARRETE, A.A. **Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**, 2009. 115 p. Dissertação (Ecologia Aplicada) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, 2009.

PEREIRA E SILVA, M.C.; DIAS, A. C.F.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Spatial and temporal variation of archaeal, bacterial and fungal communities in agricultural soils. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e51554, 2012.

REIS, G.V. dos. **Diversidade genética de isolados do fungo *Sporisorium scitamineum* analisada através de fingerprinting da região telomérica**. 2012. 86 p. Dissertação (Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2012.

SANGKHOBOL, V.; SKERMAN, V.B.D. Chitinophaga, a new genus of chitinolytic myxobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berkshire, v. 31, n. 3, p. 285–293, 1981.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 3, p. 246–265, 2008.

SILVA, M.L. da; ARAUJO, F.V. de; CASTRO, R.O.; SALES, A.S. Spatial-temporal analysis of marine debris on beaches of Niteroi, RJ, Brazil: Itaipu and Itacoatiara. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 92, n. 1/2, p. 233–236, 2015.

- SINGH, B.; SHARMA, N. Mechanistic implications of plastic degradation. **Polymer Degradation and Stability**, Oxford, v. 93, n. 3, p. 561–584, 2008.
- SLEATOR, R.D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 47, n. 5, p. 361–366, 2008.
- THOMAS, F.; HEHEMANN, J.-H.; REBUFFET, E.; CZJZEK, M.; MICHEL, G. Environmental and gut bacteroidetes: the food connection. **Frontiers in Microbiology**, New York, v. 2, n. 93, p. 1–16, 2011.
- TOKIWA, Y.; SUZUKI, T. Hydrolysis of polyesters by lipases. **Nature**, London, v. 270, n. 5632, p. 76–78, 1977.
- TOKIWA, Y.; CALABIA, B.P.; UGWU, C.U.; AIBA, S. Biodegradability of plastics. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 10, n. 9, p. 3722–3742, 2009.
- VARTOUKIAN, S.R.; PALMER, R.M.; WADE, W.G. Strategies for culture of “unculturable” bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 309, n. 1, p. 1–7, 2010.
- VIEYRA, H.; SAN MARTIN-MARTINEZ, E.; JUAREZ, E.; FIGUEROA-LOPEZ, U.; AGUILAR-MENDEZ, M.A. Biodegradation process of a blend of thermoplastic unripe banana flour-polyethylene under composting: Identification of the biodegrading agent. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 132, n. 29, p. 42258, 2015.
- WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.
- WEINBAUER, M.G.; HÖFLE, M.G. Distribution and life strategies of two bacterial populations in a eutrophic lake. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3776–3783, 1998.
- WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.
- YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; WHITMAN, W.; EUZÉBY, J.; AMAN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 9, p. 635–645, 2014.
- ZBYSZEWSKI, M.; CORCORAN, P.L.; HOCKIN, A. Comparison of the distribution and degradation of plastic debris along shorelines of the Great Lakes, North America. **Journal of Great Lakes Research**, Toronto, v. 40, n. 2, p. 288–299, 2014.
- ZETTLER, E.R.; MINCER, T.J.; AMARAL-ZETTLER, L.A. Life in the “Plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 47, n. 13, p. 7137–7146, 2013.

ZHAO, L.; MA, Z.; LUAN, Y.; LU, A.; WANG, J.; PAN L. Molecular methods of studying microbial diversity in soil environments. In: LI, D.L.; LIU, Y.; CHEN, Y.Y. (Ed.). **Computer and computing technologies in agriculture**. Nanshang: International Federation for Information Processing, 2011.