

Luana Agostini

**COMUNIDADES PROCARIÓTICAS ASSOCIADAS A POLÍMEROS
PLÁSTICOS EM MAR PROFUNDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

Luana Agostini

**COMUNIDADE PROCARIÓTICA ASSOCIADA A POLÍMEROS
PLÁSTICOS EM MAR PROFUNDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Microbiologia
Orientadora: Vivian Helena Pellizari

São Paulo
2018

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Vivian H. Pellizari pela orientação e incríveis oportunidades de crescimento profissional e pessoal que acompanharam este trabalho.

À querida Rosa Gamba por toda a ajuda, carinho, conselhos, sorrisos e inspiração diária.

Aos meus pais Tim e Regina e meus irmãos Cristiano e Daniela por acreditarem em mim e me apoiarem em todas as minhas decisões.

Aos meus “pais paulistanos” Marlene Mourão e Giuseppe Cataldi pelo carinho, cuidado, churrascos, festas, caronas e por cuidarem de nós como se fossemos suas verdadeiras filhas.

À minha “família paulistana” Amanda, Ana, Eliza, Natalia, Geisy, Marlana e Rafaela por toda força e carinho nessa trajetória, pelas festas, risadas e por tornarem meus dias melhores.

Aos meninos do LECOM: Augusto, por toda disponibilidade em ajudar e por toda vontade de aprender; Célio por todas as vezes que me fez rir; Ivan, por toda calma e paciência; Diego pela paciência em me guiar e acompanhar nos caminhos tortuosos da biologia molecular e bioinformática; Renato, pela animação diária sempre dando um gás em todos; Vitor por adoçar minha vida com sua amizade.

Às mulheres do LECOM: Amanda por compartilhar com todos a sua sede de conhecimento; Camila por ser o exemplo de eficiência e pró-atividade; Carol pela força de vontade de nos ajudar onde for preciso; Francielli pela amizade e por me mostrar que tudo dá certo no final; Juliana pela amizade e por me lembrar de nunca abaixar a cabeça para nada e ninguém; Natascha por sempre ter uma palavra positiva, me dando força para continuar.

Ao Prof. Dr. Ulysses Garcia Casado Lins (*in memoriam*) e ao Pedro Leão por me receberem no Rio de Janeiro e na UFRJ e pacientemente me ensinarem sobre microscopia eletrônica de varredura e assim conseguir a minha figura favorita desta dissertação.

Às minhas queridas amigas de UNESP: Amanda Sorriso, Bruna Barnabé, Carla Cumpadi, Gisele Dimenor, Renata Curupira, Luiza Himalaia, Vanessa Prematura e Renata Topanga pelo apoio, incentivo e me ajudarem onde fosse preciso.

Aos meus queridos amigos jauenses: Ana Lya, Marina, Maria Laura e Dadalto, que apesar da distância estão sempre comigo.

À Andie Claire Hall do Museu de História Natural de Londres que, do outro lado do oceano, me fez “jogar fora o livro de regras” e finalmente caminhar com este trabalho.

À Marinha do Brasil pelo apoio nas coletas, sem o qual este trabalho não se realizaria e a todos da equipe do embarque em especial a Prof^a Dr^a Cristina R. Nakayama e ao Prof. Dr. Paulo Sumida.

Aos funcionários do Instituto Oceanográfico – IO USP e do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB USP por toda a paciência em tirar dúvidas, resolver problemas e por todo suporte.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e à FAPESP pelo financiamento do projeto no qual este trabalho está inserido.

E à todas as pessoas incríveis que conheci nesses anos e que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito Obrigada!!

*“O fato de o mar estar calmo na superfície,
não significa que algo não esteja
acontecendo nas profundezas”*

(Jostein Gaarder)

“Fortitudine vincimus”

(Sir Ernest Shackleton)

Resumo

AGOSTINI, L. **Comunidades Procarióticas Associadas a Polímeros Plásticos em Mar Profundo**, 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O lixo marinho, composto em sua maioria por plásticos, é um problema global e crescente devido ao descarte inadequado no ambiente. Desde os primeiros estudos sobre o tema, nota-se a colonização destes resíduos por microrganismos, e pesquisas mais recentes, confirmaram que um dos destinos finais deste material é o fundo oceânico. No entanto, pouco se sabe se essa associação ocorre como simples adesão dos microrganismos ao substrato, ou se eles utilizam o plástico como fonte de carbono. O presente estudo pretende contribuir para o conhecimento das comunidades de microrganismos de mar profundo associadas a plásticos que podem futuramente auxiliar em processos de biodegradação. Para análise da diversidade e estrutura das comunidades de Bacteria e Archaea no Oceano Atlântico Sudoeste, foram selecionados três pontos de coleta nas regiões oceânicas (>3000 m) do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, e quatro tipos de substratos de polímeros plásticos (*pellets* de polietileno e polipropileno e sacolas não-biodegradável e biodegradável) e um substrato controle (cascalho). Os métodos utilizados foram o sequenciamento de nova geração (*Illumina Miseq*) do gene RNAr 16S, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e técnicas tradicionais de cultivo. Os resultados de MEV mostraram que nos *pellets* de polipropileno, foram observadas células dispostas individualmente, enquanto que em sacola plástica não-biodegradável, foram observadas células em *patches*. Os 22 isolados foram identificados por meio de sequenciamento do gene RNAr 16S e classificados em: *Sulfitobacter*, *Rhodococcus*, *Marinobacter*, *Zunongwangia*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Salinicola*, *Kocuria*, *Halobacillus*, *Pseudoalteromonas*. Através do sequenciamento por *Illumina Miseq* foram obtidas 3300 OTUs de Bacteria e Archaea, distribuídas nos 5 substratos e nas amostras de água adjacente, onde pode-se perceber que os grupos classificados estão diretamente relacionados à degradação de hidrocarbonetos sendo influenciados pelo tipo substrato plástico e não sendo influenciados pela localização geográfica. Os grupos mais abundantes pertencem às classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes (Bacteria) e Nitrosopumilaceae (Archaea). Dessa maneira, o presente estudo é pioneiro na investigação da plastisfera de mar profundo e visa contribuir para o conhecimento deste novo microhabitat.

Palavras-Chave: Degradação de plástico; Mar profundo; Microrganismos; Lixo marinho; Plastisfera

Abstract

AGOSTINI, L. **Prokaryotic community associated with plastic polymers in the deep-sea**, 2018. 85 p. Master Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Marine litter, mostly composed of plastics, is a global and growing problem due to inadequate disposal in the environment. From the earliest studies on the subject, we note the colonization of these residues by microorganisms, and more recent research has confirmed that one of the final destinations of this material is the ocean floor. However, little is known if this association occurs as simple adhesion of the microorganisms to the substrate, or if they use the plastic as carbon source. The present study aims to contribute to the knowledge of the communities of deep-sea microorganisms associated with plastics that may in the future assist in biodegradation processes in the future. In order to analyze the diversity and structure of the bacterial and archaeal communities in the Southwestern Atlantic Ocean, three sampling points were selected in the oceanic regions (> 3000 m) off Espírito Santo, Rio de Janeiro and São Paulo, as well as four types of plastic polymer substrates (polyethylene and polypropylene pellets and non-biodegradable and biodegradable bags) and a control (gravel) substrate. The methods used were the next generation sequencing (Illumina Miseq) of the 16S rRNA gene, Scanning Electron Microscopy (SEM) and traditional culture techniques. SEM results showed that individually disposed cells were observed in polypropylene pellets, whereas cells were observed in patches in non-biodegradable plastic bags. The 22 isolates were identified by sequencing the 16S rRNA gene and classified in: *Sulfitobacter*, *Rhodococcus*, *Marinobacter*, *Zunongwangia*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Salinicola*, *Kocuria*, *Halobacillus*, *Pseudoalteromonas*. In total 3300 OTUs of Bacteria and Archaea were obtained by Illumina sequencing, distributed into five substrates and adjacent water samples. Some groups are directly related to the hydrocarbon degradation, and the microbial community was influenced by the plastic substrate type, and not by geographical location. The most abundant groups belong to the classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes (Bacteria) and Nitrosopumilaceae (Archaea). Thus, the present study is pioneer in investigating the deep-sea marine plastisphere, and aims to contribute to the increasing knowledge of this new microhabitat.

Keywords: plastic degradation; deep sea; microorganisms; marine litter; plastisphere

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da formação de biofilme microbiano (à esquerda): A: células planctônicas; B: Células aderidas ao substrato; C: Biofilme. Microscopia Eletrônica de Transmissão (D) e de Varredura (E, F) de formação de biofilme microbiano (à direita). Fonte: Modificado de Watnick (2000).	17
Figura 2: Região do Giro Subtropical do Pacífico Norte. Mesmo sendo a área com a maior concentração de resíduos plásticos no oceano, este parece intacto, a menos que se observe cuidadosamente para a amostra, dominada tipicamente por fragmentos menores de 5mm (Imagem inferior). Fonte: Modificado de Amaral-Zettler (2015).....	20
Figura 3: Mapa da região de estudo (Atlântico Sudoeste) indicando os três pontos de fundeio dos landers, na linha batimétrica de 3300 metros (três réplicas). Fonte: GeoMapApp®.	28
Figura 4: Sacos de fibras de vidro contendo as amostras de pellets (à esquerda) e sacolas (à direita) suspensos na estrutura do lander.....	29
Figura 5: Produtos de PCR do DNA total extraído. M: marcador; C+: controle positivo; C-: controle negativo.....	37
Figura 6: Abundância relativa dos filios do Domínio Bacteria que apresentaram valores maiores que 0,1% considerando todas as amostras.....	39
Figura 7: Classificação taxônômica das 20 OTUs mais abundantes do Domínio Bacteria.	42
Figura 8: Abundância relativa dos filios do Domínio Bacteria que exibiram valores maiores que 0,1% separados por substrato. PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente.	43
Figura 9: Abundância relativa das classes do Domínio Bacteria que exibiram valores maiores que 0,1% separados por substrato. PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente.	44
Figura 10: Abundância relativa dos filios do Domínio Archaea que apresentaram valores maiores que 0,1% considerando todas as amostras.....	45
Figura 11: Abundância relativa dos filios do Domínio Archaea que exibiram valores maiores que 0,1% separados por substrato. PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente.	46
Figura 12: Classificação taxônômica das 20 OTUs mais abundantes do Domínio Archaea.....	46
Figura 13: Índice de riqueza (Chao1 e Ace) e de diversidade (Shannon e Simpson) estimados para as amostras de Cascalho (C), pellets de Polietileno (PE), pellets de Polipropileno (PP), Sacolas Biodegradáveis (SB), Sacolas Comuns (SC) e de Água Adjacente (AA).....	48
Figura 14: Dendrograma gerado pelo índice weighted UNIFRAC e clusterização pelo método UPGMA.....	50
Figura 15: Análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) para beta-diversidade (weighted Unifrac) da comunidade microbiana das amostras de plástico e água adjacente (stress= 0,02). PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente. As formas referem-se aos sítios de fundeio.	51

Figura 16: Número de OTUs que compõem o microbioma central da plastisfera de mar profundo (A). A abundância relativa das 194 OTUs compartilhadas e sua classificação taxonômica a nível de classe estão representadas em B.....	54
Figura 17: Imagem de MEV com amostras de pellets de polietileno (A) e polipropileno (B) fundeadas a 3300 m de profundidade sem a formação de biofilme.....	55
Figura 18: Imagem de MEV com exemplos de pellets de polipropileno (A, B, C) e sacola não-biodegradável (D) fundeados a 3300m de profundidade. As setas indicam filamentos responsáveis pela adesão das células no substrato.....	56
Figura 19: Amostras de polímeros plásticos inoculados em meio de cultura mineral elaborado por Sekiguchi et al. 2010, com crescimento de colônias após 15 dias de incubação a 13°C. A) <i>Pellet</i> de polietileno; B) <i>Pellet</i> de polipropileno; C) Sacola Comum; D) Sacola biodegradável.....	62
Figura 20: Árvore filogenética baseada no gene RNAr 16S de isolados obtidos de plásticos fundeados a 3300m de profundidade. A árvore foi construída empregando-se o método de “ <i>Maximum-Likelihood</i> ” e fator de correção Kimura 2, com valor de “ <i>bootstrap</i> ” de 1000 repetições.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das 18 amostras coletadas.	30
Tabela 2: Quantificação por Qubit® dsDNA HS Assay Kit do DNA Total das 18 amostras e dos amplicons gerados na PCR.	35
Tabela 3: Resultados obtidos após a análise dos dados de sequenciamento do gene RNAr 16S quanto ao número de reads total, número de reads após filtro de qualidade e número de OTUs em cada amostra analisada.	37
Tabela 4: Índice de riqueza (Chao1 e Ace), de diversidade (Shannon e Simpson) estimada para as amostras Controle (C), Pellets (PE e PP), Sacolas (SB e SC) e Água Adjacente (AA) coletados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo.	49
Tabela 5: Análise de significância Adônis a partir dos índices weighted UNIFRAC.	52
Tabela 6: Características e classificação taxônomica dos isolados associados a polímeros plásticos em mar profundo.	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AT	Água Tropical
ACAS	Água Central do Atlântico Sul
AIA	Água Intermediária Antártica
ACS	Água Circumpolar Superior
APAN	Água Profunda do Atlântico Norte
ACI	Água Circumpolar Inferior
N/Oc	Navio Oceanográfico
NPo	Navio Polar Oceanográfico
OTUs	Unidades Taxonômicas Operacionais
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
CSS	Cumulative-Sum Scaling
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
RNAr	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico) ribossomal
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PP	Polipropileno
PE	Polietileno
PVC	Polivinil clorídrico
PS	Poliestireno
PUR	Poliuretano
PET	Polietileno tereftalato
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL	14
	2.1 Objetivos Específicos.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
	4.1 Área de Estudo.....	26
	4.2 Amostragem	27
	4.3 Análise da Estrutura da Comunidade Procariótica.....	31
	4.3.1 <i>Extração do DNA total</i>	31
	4.3.2 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	31
	4.3.3 <i>Sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq</i>	32
	4.3.4 <i>Análise das sequências de gene RNAr 16S</i>	32
	4.4 Análise do biofilme através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	33
	4.5 Isolamento e identificação dos biofilmes bacterianos associados a polímeros plásticos em mar profundo	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
	5.1 Resultados gerais do sequenciamento do gene RNAr 16S	34
	5.1.1 <i>Concentrações do DNA Total</i>	34
	5.1.2 <i>Resultados gerais do sequenciamento do gene rRNA 16S</i>	37
	5.2 Análise da Estrutura da Comunidade Procariótica.....	38
	5.2.1 <i>Composição taxonômica das comunidades nos plásticos e água adjacente para o Domínio Bacteria</i>	38
	5.2.2 <i>Composição taxonômica das comunidades nos plásticos e água adjacente para o domínio Archaea</i>	44
	5.2.3 <i>Riqueza e alfa-diversidade</i>	47
	5.2.4 <i>Beta-diversidade</i>	50
	5.3 Análise do biofilme através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
	5.4 Identificação de bactérias isoladas associadas a polímeros plásticos.....	58
6	CONCLUSÕES	65
	REFERENCIAS*	67
	APENDICE	80

1 INTRODUÇÃO

O mar profundo é o maior ecossistema do planeta, pois cobre uma área de 360 milhões de km², equivalente a 70% da superfície terrestre (JØRGENSEN; BOETIUS, 2007; RAMIREZ-LLODRA et al., 2011). Neste ambiente, os micro-organismos procariontes têm um papel fundamental no fluxo de matéria orgânica e energia e nos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (PACE, 1997; LAURO; BARTLETT, 2008; GIOVANNONI; VERGIN, 2012; FUHRMAN; CRAM; NEEDHAM, 2015).

Contudo, esses micro-organismos dependem de fontes esporádicas de nutrientes, como exsudações de óleo ou de metano, fontes hidrotermais, carcaças de baleias e fragmentos de madeira para sustentar o metabolismo quimiossintético e, conseqüentemente, a base da cadeia trófica neste ambiente (SMITH, CRAIG R. & BACO, 2003; JØRGENSEN; BOETIUS, 2007; BIENHOLD, CHRISTINA; RISTOVA, PETRA POP; WENZHÖFER FRANK; DITTMAR; BOETIUS, 2013).

Nas últimas décadas, um volume mais expressivo de estudos e publicações sobre o mar profundo vem ganhando destaque na comunidade científica, incluindo estudos que mostram a deposição de macrolásticos e microlásticos neste habitat (VAN CAUWENBERGHE et al., 2013; WOODALL et al., 2014).

A colonização microbiana (bactérias e arqueias) pode ocorrer em qualquer substrato que esteja disponível no ambiente, seja em mar profundo ou em superfície, como vem sendo relatado em estudos sobre o lixo marinho (CARSON et al., 2013; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013; DE TENDER et al., 2015).

Com o desenvolvimento industrial e introdução de polímeros sintéticos plásticos como item de uso comum pela população, estes tipos de resíduos vêm crescendo significativamente no ambiente marinho (PETERS; FLAHERTY, 2011). Anualmente são produzidos diferentes tipos de plásticos para diferentes usos industriais. Dentre as seis classes mais produzidas de plásticos estão: polietileno (PE de alta e baixa densidade), polipropileno (PP), polivinil clorídrico (PVC), poliestireno (PS), poliuretano (PUR) e polietileno tereftalato (PET) (KERSHAW, P. J. & LESLIE, 2012). Os mais comuns (PE e PP) são usados para embalagens, com vida útil curta, e acabam sendo descartados rapidamente e de forma inadequada. Embora sejam adequados para fabricação de vários produtos, por serem muito resistentes e versáteis, essas mesmas características os tornam potenciais poluentes para o meio ambiente (DERRAIK, 2002).

O uso de materiais biodegradáveis foi proposto como solução para diminuição do acúmulo de plásticos no ambiente, entretanto o termo biodegradável requer cautela ao se referir a materiais plásticos (RAMIREZ-LLODRA et al., 2011; KUBOWICZ; BOOTH, 2017). Polímeros biodegradáveis são materiais que se degradam pela ação de micro-organismos, como fungos e bactérias (KARLSSON; ALBERTSSON, 1998). Alguns destes polímeros plásticos são produzidos por uma combinação de processos biotecnológicos e químicos, como os poli-hidroxicanoatos (PHA e PHB), os ácidos polilácticos (PLA), entre outros.

Já outros polímeros, vendidos como biodegradáveis, possuem a mesma estrutura química dos plásticos derivados de petróleo, porém possuem uma parcela de componente de origem biológica (PRIETO, 2016; KUBOWICZ; BOOTH, 2017). Contudo, este tipo de material é rapidamente fragmentado em pequenos pedaços quando expostos às condições ambientais, resultando em microplásticos (*pellets*, fragmentos menores que 5 mm), abundantes em toda superfície do mar, continuando a representar uma ameaça para o ambiente (RAMIREZ-LLODRA et al., 2011; REISSER et al., 2014).

Além disso, *pellets* de plástico podem acumular poluentes que podem ser transferidos para diferentes organismos marinhos (ANDRADY, 2011). Por exemplo, poluentes orgânicos persistentes como os bifenilos policlorados (PCBs), podem ser incorporados por algas marinhas, afetando uma gama ainda maior de organismos marinhos da teia alimentar, no processo chamado de bioacumulação (CARPENTER; SMITH, 1972).

Após a introdução do plástico no ambiente, os fatores físicos e químicos (umidade, ar, temperatura, luz, alta energia radioativa) agem na degradação deste material. Estes agentes fragmentam os pedaços, aumentando a superfície de contato da partícula de plástico, facilitando a colonização por micro-organismos e o transporte destes para outras localidades, podendo impactar a estrutura da comunidade local (ARUTCHELVI et al., 2008; REISSER et al., 2014).

A capacidade de colonizar superfícies é um mecanismo que promove vantagens aos micro-organismos em situações de limitação nutricional e condições ambientais altamente dinâmicas (DANG; LOVELL, 2016). O plástico disperso no oceano fornece substrato para a vida marinha que dura muito mais do que a maioria dos substratos flutuantes naturais, permitindo ainda sua dispersão para outras regiões onde podem ser considerados organismos invasores (MINCER; ERICK R. ZETTLER;

AMARAL-ZETTLER, 2016). Mesmo em pequenas quantidades (< 1%), Masó et al. (2007), identificaram espécies de dinoflagelados tóxicos associados a resíduos plásticos na superfície do Mar Mediterrâneo.

Zettler e colaboradores (2013) realizaram a primeira caracterização de comunidades microbianas presentes em plásticos na superfície do Oceano Atlântico Norte utilizando microscopia eletrônica de varredura e métodos moleculares. A descrição da existência de um biofilme associado a estes plásticos sugeriu que esta comunidade fosse denominada de “plastisfera”. Este estudo pioneiro revelou uma comunidade microbiana única, diversificada e complexa, composta por diatomáceas, ciliados e bactérias.

Estudo como esse, utilizando a microscopia eletrônica de varredura e métodos moleculares para detecção de genes responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos em plásticos marinhos, sugeriram que bactérias marinhas podem degradar polímeros e que este processo de degradação ocorre na superfície marinha (REISSER et al., 2014). Outros trabalhos destacaram o acúmulo e a colonização por microrganismos provenientes da superfície do oceano, principalmente nas regiões dos grandes giros subtropicais no Hemisfério Norte (CARSON et al., 2013; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013; DE TENDER et al., 2015).

Sabe-se ainda que a composição, densidade e forma destes resíduos plásticos irão determinar se flutuam ou afundam com mais facilidade, podendo ser encontrados na coluna d’água até o sedimento (COLE et al., 2011), tendo como um dos destinos o fundo oceânico (VAN CAUWENBERGHE et al., 2013).

Apesar da capacidade de degradação de plásticos ter sido recentemente descrita em bactérias (YOSHIDA et al., 2016) ainda não há informações na literatura sobre o que ocorre com os plásticos quando chegam às regiões profundas marinhas. Mais especificamente, no Oceano Atlântico Sul, ainda há pouca informação sobre a colonização do lixo marinho por microrganismos em águas superficiais, bem como sobre a colonização de resíduos plásticos (plastisfera) que chegam ao mar profundo, em profundidades superiores a 1500m.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação foi descrever e analisar a composição e a estrutura da comunidade de bactérias e arqueias associadas a polímeros sintéticos

em mar profundo (Atlântico Sudoeste) e relacioná-las com a biodegradação destes polímeros.

2.1 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, o presente trabalho visa responder às seguintes questões:

- I. A característica do plástico depositado no fundo do oceano seleciona as comunidades procarióticas que colonizam a sua superfície?
- II. A comunidade procariótica da plastisfera é influenciada pela comunidade da água adjacente?
- III. A atividade de biodegradação dos plásticos pode ser verificada observando-se a colonização através das técnicas de microscopia eletrônica?
- IV. Os isolados obtidos no mar profundo são capazes de degradar plásticos através de técnicas de cultivo?

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.2 Formação de biofilme no ambiente marinho

Biofilme é definido como um conjunto de células microbianas que se multiplicam associadas a uma variedade de superfícies sólidas sejam bióticas ou abióticas (DONLAN, 2002). Os microrganismos que constituem este tipo de estrutura ficam protegidos por uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, nutrientes, metabólitos absorvidos, produtos de lise celular, material particulado do meio circundante, estabelecendo um microambiente favorável (WATNICK, 2000; SUTHERLAND, 2001; DONLAN, 2002).

Durante o processo de adesão, as células bacterianas sésseis alteram seus fenótipos em resposta à proximidade de uma superfície, unindo-se de maneira estável com outras células de mesma espécie ou de espécies diferentes, formando microcolônias, tornando-o uma comunidade mais eficiente do que as comunidades planctônicas (COSTERTON et al., 1995).

A capacidade de formação de biofilmes é uma característica antiga dos procariontes, com representantes fósseis datando 3 bilhões de anos e apresentando estruturas semelhantes a biofilmes atuais encontrados em fontes hidrotermais. Isto lhes trouxe vantagens evolutivas, uma vez que a matriz polimérica atua como barreira física e química, protegendo-os das condições adversas da terra primitiva (DONLAN, 2002).

Além disso, o biofilme é capaz de concentrar nutrientes, facilitar a difusão de gases e impedir a desidratação, proporcionando uma maior interação entre as células (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; TREVORS, 2011). Estas características são extremamente importantes em ambientes aquáticos onde os nutrientes são limitantes e as condições ambientais altamente dinâmicas, facilitando a ciclagem de nutrientes (p.ex. nitrogênio, enxofre e carbono), assim como troca de genes e *quorum sensing* (DONLAN, 2002; DANG; LOVELL, 2016).

Em regiões oligotróficas as bactérias formam biofilmes de acordo com a disponibilidade de nutrientes na superfície a ser colonizada. Dessa maneira, no ambiente marinho, a colonização de superfícies é um importante mecanismo para a sobrevivência dos microrganismos em regiões oligotróficas proporcionando-lhes um ambiente mais favorável (COSTERTON et al., 1995; JEFFERSON, 2004; LEE et al., 2008).

A formação do biofilme requer uma série de etapas (Figura 1). Inicialmente, bactérias de vida livre na água interagem com partículas orgânicas e inorgânicas na superfície formando a primeira camada do biofilme. Em seguida, as bactérias colonizadoras primárias aumentam de número no biofilme através de sua reprodução, modificando as características da superfície do substrato, tornando-o adequado para a posterior colonização dos microrganismos secundários, os quais constituirão uma monocamada em que outras bactérias de vida livre irão interagir entre si e estruturar a comunidade do biofilme primária. Finalmente, a comunidade do biofilme primária desenvolvida entra em estágio denominado "maduro" através da competição e sinergia existente entre as bactérias no biofilme e o recrutamento de novas bactérias colonizadoras (DEMPSEY, 1981; DANG; LOVELL, 2000a; NAUENDORF et al., 2016).

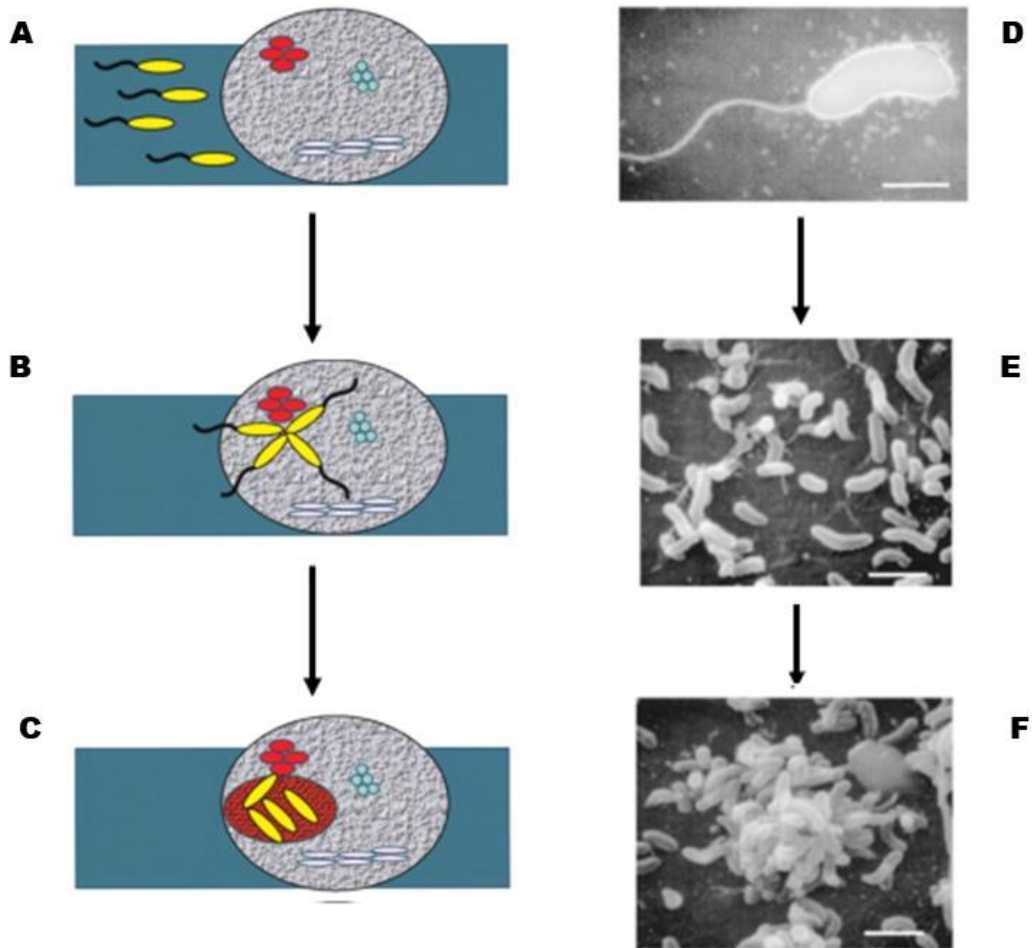


Figura 1: Representação da formação de biofilme microbiano (à esquerda): A: Células planctônicas; B: Células aderidas ao substrato; C: Biofilme. Microscopia Eletrônica de Transmissão (D) e de Varredura (E, F) de formação de biofilme microbiano (à direita). Fonte: Modificado de Watnick (2000).

Os microrganismos formadores de biofilme no ambiente marinho são importantes para processos que ocorrem nas partículas naturais como a neve marinha e superfícies artificiais nos ecossistemas marinhos. Embora possam trazer prejuízos econômicos para a indústria, têm um importante papel na remineralização da matéria orgânica e no ciclo de nutrientes, além de aumentar a formação de agregados de diatomáceas, a taxa de afundamento de partículas e, portanto, a eficiência da bomba biológica marinha (JONES et al., 2007; DANG; LOVELL, 2016).

Superfícies sólidas artificiais podem ter várias características que são importantes nos processos de fixação. A rugosidade da superfície facilita a adesão microbiana, além disso, as propriedades físico-químicas também podem ser determinantes na adesão de microrganismos, ocorrendo mais rapidamente em superfícies hidrofóbicas (como os plásticos) do que em materiais hidrofílicos (como

vidros e metais) (DONLAN, 2002). Apesar da dificuldade de adesão em superfícies como vidros e metais, os microrganismos ainda causam muitos prejuízos para a indústria marítima devido ao custo de manutenção e reparo de tubulações, equipamentos e navios (DEMPSEY, 1981).

Nas últimas décadas, toneladas de novas superfícies artificiais constituídas de polímeros plásticos de diversos tipos entram no ambiente marinho continuamente, proporcionando um substrato resistente e facilmente disperso pelas correntes oceânicas no qual os microrganismos podem se aderir (OBERBECKMANN et al., 2014).

Vários processos podem contribuir para a dispersão deste resíduo nos oceanos, entre eles a incrustação por organismos é um dos processos que diminui a sua flutuabilidade e contribui para que cheguem a grandes profundidades. A neve marinha (agregados orgânicos de 200 μm) tem sido considerada um mecanismo potencial para o transporte de microplásticos de águas superficiais para regiões mais profundas do oceano (ZHAO et al., 2017).

A formação de biofilmes pode ocorrer em diferentes ambientes marinhos e estão sujeitos a uma ampla gama de condições hidrodinâmicas (SUTHERLAND, 2001). Embora níveis mais altos de nutrientes levem a biofilmes muito mais densos do que aqueles observados em condições oligotróficas, a composição de biofilmes em águas profundas pode ser tão complexa quanto as comunidades de biofilme na superfície (SUTHERLAND, 2001). Por exemplo, em condições extremas de ausência de luz, baixa temperatura e alta pressão das regiões abissais, os biofilmes são encontrados associados a fontes hidrotermais, constituindo a base da cadeia trófica deste ecossistema através da quimiossíntese, permitindo a colonização de microrganismos secundários, além de uma rica fauna que poderá se alimentar de ou estabelecer uma relação simbiótica com estes microrganismos (ALAIN; ZBINDEN; BRIS, 2004).

3.3 Lixo marinho

Lixo marinho é definido como qualquer material manufaturado ou processado que é descartado e entra no ambiente marinho através de qualquer fonte (COE & ROGERS, 1997). Com o decorrer dos anos e o aumento do uso de itens plásticos devido a sua durabilidade e praticidade, este tipo de resíduo passou a se acumular

cada vez mais no ambiente e chamar a atenção da comunidade científica para o aumento exponencial deste problema.

Os primeiros registros de resíduos plásticos no ambiente marinho datam da década de 70 quando Carpenter & Smith (1972) notaram a presença de pequenas esferas de poliestireno (principal componente de materiais de isopor) no litoral dos Estados Unidos. A partir de então, iniciaram-se as pesquisas sobre a presença e os impactos causados por resíduos plásticos no ambiente marinho.

Suas características, praticidade e baixo custo, tornaram o plástico um item comum na vida da sociedade moderna, que substituiu materiais convencionais como vidro, metal e papel (ANDRADY, 2011). Os mais comuns (PE e PP) são usados para embalagens, com vida útil curta, e acabam sendo descartados rapidamente e de forma inadequada (KERSHAW & LESLIE, 2012).

O aumento da produção de itens plásticos, seu descarte inapropriado e sua facilidade de dispersão no ambiente (JAMBECK et al., 2015), o tornaram um problema que atinge diversos ambientes terrestres e marinhos.

Uma vez no ambiente marinho, estes resíduos serão dispersados por meio das correntes oceânicas, até se concentrarem nas regiões dos grandes giros subtropicais, onde formam zonas denominadas de “grandes manchas de lixo” e podem permanecer por centenas de anos (CARSON et al., 2013; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013).

Os giros subtropicais são regiões oligotróficas extensas que ocupam 40% da superfície dos oceanos, formados por correntes superficiais, submetidas a força de Coriolis e do vento. São importantes regiões para a compreensão da magnitude e da variabilidade do carbono exportado da superfície para o oceano profundo (MCCLAIN; SIGNORINI; CHRISTIAN, 2004). Modelos matemáticos confirmam que o acúmulo de resíduos plásticos tem ocorrido em todos os cinco giros subtropicais do mundo (BARNES et al., 2009; MAXIMENKO; HAFNER; NIILER, 2012; CÓZAR et al., 2014).

Os impactos do lixo marinho sobre a vida selvagem são reconhecidos em todo o mundo e bem documentados na literatura. Acúmulos de lixo no fundo do mar e na superfície podem danificar o assoalho marinho, além de impedir que a luz e os nutrientes atinjam a fauna, afetando a produtividade da comunidade bentônica (SMITH et al., 2008). Problemas com emalhe e ingestão de lixo por animais pelágicos e aves marinhas são bastante documentados. Segundo Mascarenhas e colaboradores (2008), cerca de 267 espécies de animais marinhos são afetadas

diretamente pelo lixo do ambiente, onde 86% são tartarugas, 44% são aves, 43% são mamíferos e muitas espécies de peixes e crustáceos que são prejudicados na respiração, obtenção de alimento e na fuga de predadores.

A situação fica ainda mais crítica quando, pela ação das ondas, a química da água, radiação UV e ação de microrganismos fazem com que os fragmentos de plásticos se desintegram em partes menores, as quais são facilmente dispersas por toda a coluna d'água e por todos os ambientes marinhos, com a ajuda dos ventos e hidrodinâmica local (BARNES et al., 2009).

Embora a superfície do oceano aparente estar livre das partículas plásticas (Figura 2), estudos recentes estimaram que a concentração de fragmentos plásticos seja de mais de 10^5 fragmentos por quilômetro quadrado no giro subtropical do Atlântico Norte e mais de 10^6 fragmentos por quilômetro quadrado no giro subtropical do Pacífico Norte (AMARAL-ZETTLER et al., 2015).

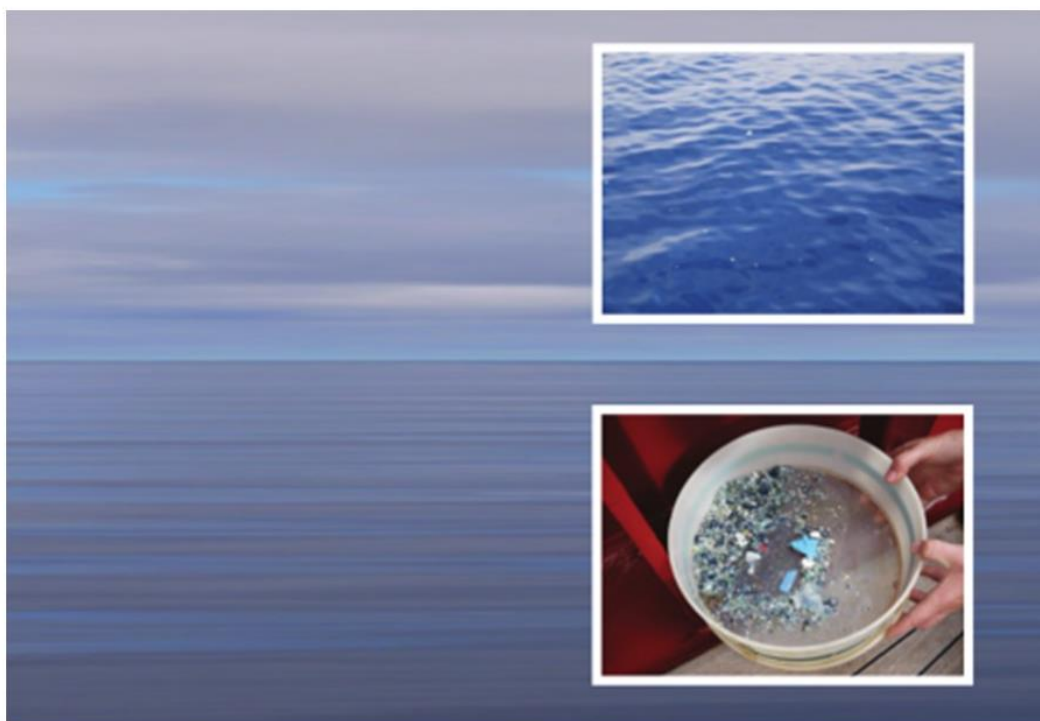


Figura 2: Região do Giro Subtropical do Pacífico Norte. Mesmo sendo a área com a maior concentração de resíduos plásticos no oceano, este parece intacto, a menos que se observe cuidadosamente para a amostra, dominada tipicamente por fragmentos menores de 5mm (Imagem inferior). Fonte: Modificado de Amaral-Zettler (2015).

Com taxas de incrustação muito rápidas, o material plástico pode afundar rapidamente na água do mar até uma profundidade onde a luz do sol não está mais

disponível para sua fotodegradação e há menos turbulência, permanecendo ali por centenas a milhares de anos (YE; ANDRADY, 1991).

Embora a maioria dos estudos sobre a contaminação de lixo marinho prevaleça nas regiões costeiras e de plataforma, vem aumentando o número de trabalhos que descrevem a contaminação do lixo marinho em oceano profundo, incluindo em regiões abissais (4000 m - 6000 m de profundidade) e hadais (> 6000 m de profundidade) (CHIBA et al., 2018).

Nestes trabalhos, os resíduos sólidos foram identificados através da observação de imagens em vídeo durante as pesquisas via submersíveis e veículos operados remotamente (ROVs) e registrados no Banco de Dados de Resíduos de Mar profundo (<http://www.godac.jamstec.go.jp/dsdebris/e/>).

Neste mesmo estudo, foram observadas espécies de anêmonas aderidas a sacos plásticos. Desse modo, estes resíduos podem desempenhar um papel de “trampolim” para os animais sésseis expandirem sua distribuição original, podendo alterar a cadeia alimentar e a função biogeoquímica dos ecossistemas de mar profundo (CHIBA et al., 2018). Somando-se a isso, a lenta taxa de crescimento e distribuição das comunidades endêmicas de mar profundo tornam a recuperação destes ecossistemas ainda mais dificultada.

3.4 Plastisfera marinha

Desde os primeiros registros de resíduos plásticos no ambiente marinho, foi observada a presença de microrganismos utilizando esses substratos para fixação e transporte (CARPENTER; SUSAN; PECK, 1972; GUEZENNEC; RAGUENES; GEESEY, 1998; LOBELLE; CUNLIFFE, 2011).

Contudo, após estes primeiros relatos houve um grande intervalo de 25 anos até o primeiro estudo descrevendo os estágios iniciais da formação de biofilme em filmes plásticos no ambiente marinho, os quais eram dominados por representantes de Alphaproteobacteria, em particular *Roseobacter* sp (DANG; LOVELL, 2000a).

Como o descarte de resíduos plásticos é decorrente de fontes terrestres e marinhas, está sujeito a mudanças dinâmicas e complexas na estrutura da comunidade do biofilme aderido durante a migração do ambiente terrestre para o marinho. Ao longo desta trajetória, cada fragmento plástico pode se transformar em

um microhabitat único (OBERBECKMANN et al., 2014; MINCER; ERICK R. ZETTLER; AMARAL-ZETTLER, 2016).

Facilmente dispersos no ambiente marinho, estes resíduos irão se concentrar nas regiões oligotróficas dos giros subtropicais dos oceanos de todo planeta, abrigando microrganismos de metabolismos diversos como os fototróficos, heterotróficos, predadores e simbiontes, modificando a dinâmica do ecossistema local (CARSON et al., 2013; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013).

Nos diferentes estudos sobre a plastisfera marinha, foram inicialmente realizadas a caracterização dos microrganismos aderidos a estas superfícies. A análise molecular do gene RNAr 16S por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração mostraram que havia diferenças entre a comunidade aderida aos plásticos e a comunidade da água adjacente, sugerindo que os diferentes tipos de plásticos estariam selecionando e estruturando a comunidade de microrganismos no ambiente marinho (CARSON et al., 2013; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013; OSBORN; STOJKOVIC, 2014).

Estes trabalhos mostraram uma comunidade inicialmente formada por típicos colonizadores primários do ambiente marinho, como representantes de Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria e posteriormente Bacteroidetes (DANG; LOVELL, 2000b; LEE et al., 2008)

A partir disso, pesquisas relacionadas à comunidade da plastisfera aumentaram nos últimos anos, assim como o entendimento da complexidade dessas comunidades e como elas afetam o meio adjacente. Oberbechmann et al. (2016), por exemplo, observaram mudanças na comunidade associada a garrafas PET submersas em diferentes localidades e estações do ano, devido às diferentes correntes superficiais do local e distância geográfica, sendo caracterizada principalmente por Bacteroidetes (Flavobacteriaceae, Cryomorphaceae, Saprospiraceae).

Estudos recentes também sugerem que partículas plásticas podem ser *hotspots* para a transferência horizontal de genes, trazendo vantagens evolutivas para a comunidade da plastisfera em relação a comunidade da água adjacente. Também foram encontrados membros de família de microrganismos conhecidos por terem a capacidade de degradar hidrocarbonetos (DIDIER; ANNE; ALEXANDRA, 2017; OBERBECKMANN; KREIKEMEYER; LABRENZ, 2017).

Além da influência biogeográfica, foi observado que a composição da comunidade da plastisfera mudou em relação ao tamanho do fragmento plástico. Em fragmentos de tamanho entre 5 mm e 20 cm, a comunidade foi bastante semelhante, independente da composição química do substrato plástico, predominando os representantes de Planctomycetes, Alphaproteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria e Chloroflexi. No entanto, a comunidade diferiu entre os fragmentos de tamanho entre 300 µm e 5mm e a água circundante, onde predominaram representantes de Betaproteobacteria, Alteromonadales e Oceanospirillales, respectivamente (DIDIER; ANNE; ALEXANDRA, 2017)

As bactérias são capazes de usar polímeros plásticos como fonte de carbono, como já foi demonstrado em experimentos controlados para polietilenos de baixa e alta densidade e em amostras ambientais coletadas no giro subtropical do Atlântico Norte (SUDHAKAR et al., 2008; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013).

Por meio de análises de microscopia eletrônica de varredura, foi possível observar, nas amostras coletadas, a presença de pequenas erosões do tamanho das células nela aderidas, levantando a hipótese de que elas estariam consumindo este substrato (Figura 3 - A). Além disso, através de microscopia de força atômica pôde-se observar a modificação da estrutura do polímero plástico causada pelos microrganismos em meio de cultura (Figura 3 - B).

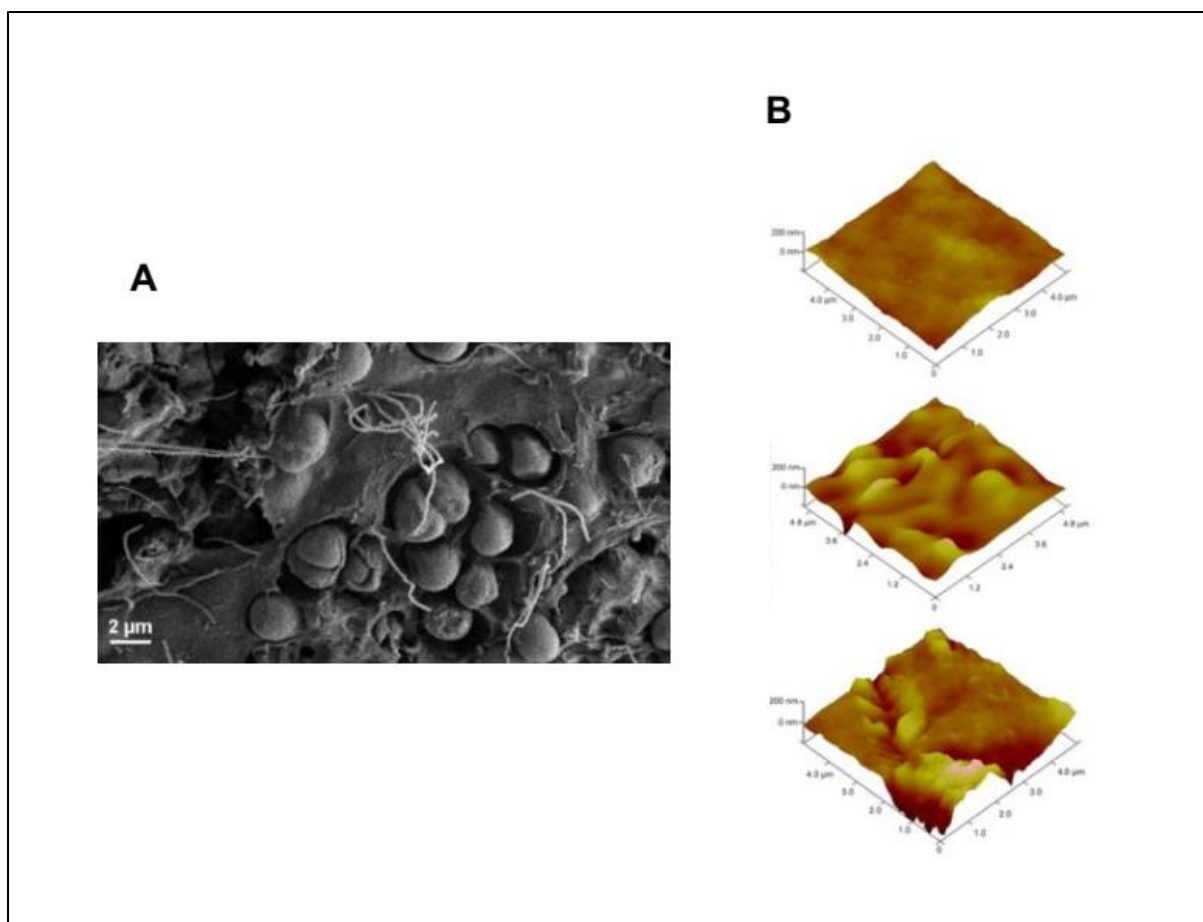


Figura 3: Microscopia eletrônica de varredura destacando células microbianas inseridas em pequenas erosões em superfície plástica (A); Microscopia de força atômica mostrando as deformações na estrutura de polietileno causada por cepas bacterianas em meio de cultura após 28 dias de incubação (B). Fonte: Modificado de Amaral-Zettler et al., (2013) (A); Yang et al., (2014) (B).

Também foram encontradas diferenças funcionais entre os microrganismos da superfície de plásticos e aqueles na água circundante, que destacam as vias metabólicas encontradas nas comunidades da plastisfera e corroboram com um estilo de vida sésil e capacidade de degradação de compostos xenobióticos. Essas vias metabólicas estão de acordo com a análise química realizada nos plásticos, mostrando a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, naftaleno e PCB (BRYANT et al., 2016).

Embora estudos recentes estejam contribuindo para o conhecimento da complexidade da plastisfera marinha, ainda há a necessidade de caracterizar melhor as interações microbianas com as substâncias persistentes e bioacumulativas contidas nas partículas plásticas, além de determinar se há uma comunidade chave da plastisfera que seja responsável pela degradação destes resíduos no ambiente marinho.

3.5 Biodegradação de plásticos

Em vista do grande problema ambiental que se tornaram os resíduos plásticos em todos os ambientes do planeta, tornou-se necessário a busca por soluções para atenuar este impacto, aumentando a biodegradabilidade dos polímeros, adicionando em sua composição polímeros naturais (como amido e celulose) e pró-oxidantes, além do isolamento de microrganismos do ambiente marinho capazes de degradar este tipo de material (ARUTCHELVI et al., 2008; NAUENDORF et al., 2016).

Plásticos são moléculas poliméricas de cadeia longa de carbonos, compostos por resinas à base de petróleo (SHAH et al., 2008; MUKHERJEE; CHATTERJEE, 2014). São altamente resistentes à degradação física e biológica, permanecendo no ambiente por centenas a milhares de anos (SUDHAKAR et al., 2007).

A superfície dos plásticos é hidrofóbica, mas quando expostos às condições ambientais de radiação solar, temperatura e química da água do mar, as degradações físicas e químicas iniciais levam à inserção de grupos hidrofílicos na superfície do polímero, tornando-a mais hidrofílica, facilitando a adesão dos microrganismos (ARUTCHELVI et al., 2008; O'BRINE; THOMPSON, 2010).

Polímeros, especialmente plásticos, são potenciais substratos para microrganismos heterotróficos, contudo seu tamanho impossibilita a passagem através da membrana celular, sendo necessário fragmentá-los em monômeros (GROSS; KALRA, 2002; SHAH et al., 2008). Dessa maneira, a degradação se inicia com a clivagem da cadeia complexa de carbonos em fragmentos de baixo peso molecular (monômeros) por meio das enzimas extracelulares secretadas pelo organismo (BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2013). Esta biodegradação pode ocorrer aerobicamente ou anaerobicamente gerando como produto água e CO₂, CO₂ e metano, respectivamente (GROSS; KALRA, 2002; SANGALE; SHAHNAWAZ; ADE, 2012).

Porém, este processo pode levar centenas de anos. Estudos realizados com sacolas plásticas de polietileno com porcentagem biodegradável mostraram uma degradação menor do que 2%. Com sacolas plásticas de polietileno padrão, a degradação foi insignificante (O'BRINE; THOMPSON, 2010; SANGALE; SHAHNAWAZ; ADE, 2012).

Atualmente, com o advento de técnicas moleculares e de cultivo mais modernas, foi descoberto um fungo marinho denominado de *Zalerion maritimum*,

comum em águas costeiras de Portugal, com alto potencial para biodegradação de microplásticos. Após 14 dias de incubação a 25°C, a biomassa de *Z. maritimum* variou de 82% ± 2,1%, acompanhada de 56,7% ± 2,9% de variação de massa dos polímeros (PAÇO et al., 2017).

Algumas bactérias também mostraram alta eficiência na degradação de polietileno, como *Microbacterium paraoxydans*, com perda de 61% de massa do polímero e *Pseudomonas aeruginosa* com 50% em dois meses (SANGALE; SHAHNAWAZ; ADE, 2012).

Recentemente, Yoshida e colaboradores (2016) isolaram uma bactéria denominada de *Ideonella sakaiensis* de uma usina de reciclagem. Esta bactéria mostrou-se capaz de degradar com grande eficiência polietileno tereftalato (PET) e assimilá-lo em seu metabolismo utilizando-o como fonte de carbono e energia (YOSHIDA et al., 2016).

A partir disto, despertou-se o interesse no mecanismo enzimático desta bactéria, isolando uma enzima semelhante a cutinase, a qual foi denominada de PETase, responsável pela degradação do PET, possibilitando assim a produção de enzimas sintéticas tão eficientes quanto a natural (AUSTIN et al., 2018).

Já em condições extremas, Sekiguchi e colaboradores (2010), isolaram em condições semelhantes a mar profundo bactérias do gênero *Shewanella*, *Moritella*, *Psychrobacter* e *Pseudomonas* e obtiveram resultados positivos para a degradação de PCL (poli(ε-caprolactona)), um tipo de plástico biodegradável, derivado de petróleo.

Apesar do aumento de estudos focados em microrganismos degradadores de polímeros plásticos na superfície do oceano e nos ambientes terrestres, ainda faltam informações sobre a presença destes organismos em mar profundo e sua capacidade de degradação sob baixas temperaturas e altas pressões (SEKIGUCHI et al., 2010b; SOLÉ et al., 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

A área de estudo está localizada no Oceano Atlântico Sudoeste, em região profunda, na isóbata de 3.300m de profundidade. Esta é uma região bem estudada devido a seus padrões oceanográficos, comunidades biológicas e potencial de

exploração para a indústria petrolífera (BERNARDINO; BERENGUER; RIBEIRO-FERREIRA, 2016; ALMADA; BERNARDINO, 2017). Entretanto, ainda há poucos estudos na literatura sobre a comunidade microbiana nesta região, sendo que a maior parte deles está restrito à zona fótica (ALVES JUNIOR et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016; BERGO et al., 2017).

O presente estudo concentrou-se em três sítios de fundeio localizados na Bacia de Campos (Espírito Santo e Rio de Janeiro) e Bacia de Santos (São Paulo). Em ambas as bacias oceanográficas encontra-se a mesma estratificação vertical de massas d'água: Água Tropical (AT), a Água Central do Atlântico Sul (ACAS), a Água Intermediária Antártica (AIA), a Água Circumpolar Superior (ACS), a Água Profunda do Atlântico Norte (APAN) e a Água Circumpolar Inferior (ACI) (SILVEIRA et al., 2000).

Os diferentes substratos plásticos e o substrato cascalho empregados neste estudo ficaram submersos na transição entre a APAN e a ACI, as quais são caracterizadas por temperaturas entre 3°C e 4°C, salinidades entre 34,6 e 35 psu, oxigênio superior a 5mL/L. A região está localizada sob um regime de produtividade oligotrófica (GONZALEZ-SILVERA et al., 2004; KRUEGER; HARMS; SCHLOSSER, 2015).

4.2 Amostragem

A bordo do N/Oc Alpha Crucis do Instituto Oceanográfico da USP (IO-USP), foram fundeados em junho de 2013, estruturas autônomas experimentais denominadas *landers* na isóbata de 3300 m em três pontos correspondentes a regiões oceânicas do Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo (Figura 4 e Tabela 1).

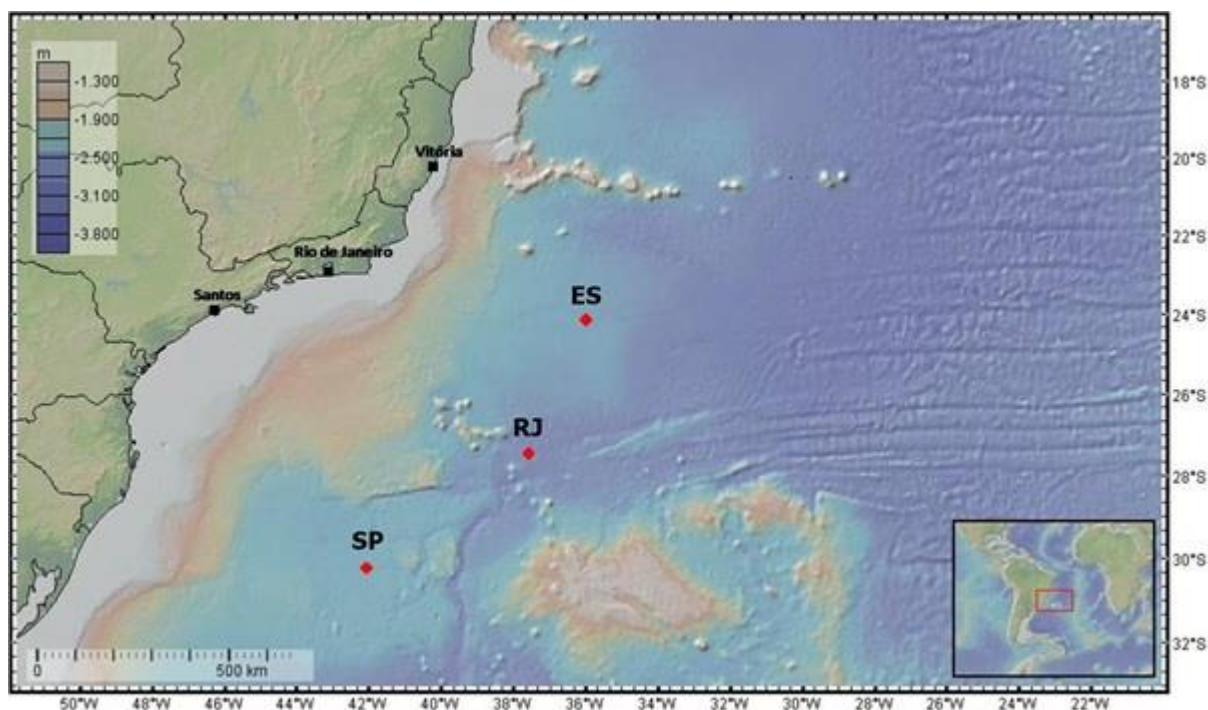


Figura 4: Mapa da região de estudo (Atlântico Sudoeste) indicando os três pontos de fundeio dos landers, na linha batimétrica de 3300 metros (três réplicas). Fonte: GeoMapApp®.

Suspensos na estrutura dos *landers* foram acondicionadas três sacolas plásticas comuns (não biodegradáveis), três sacolas biodegradáveis e 60 g de *pellets* de polipropileno (PP) e polietileno (PE) no interior de sacos de fibra de vidro, como parte das atividades do projeto “Biodiversidade e conectividade de comunidades bênticas em substratos orgânicos (ossos de baleia e parcelas de madeira) no Atlântico sudoeste profundo (BIOSUOR - FAPESP)”, coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Sumida (Figura 5).

Após 22 meses de fundeio, em maio de 2015, com o apoio do NPo Almirante Maximiano (H-41) da Marinha do Brasil, os *landers* foram resgatados e as amostras coletadas (Tabela 1). Para a análise da estrutura das comunidades microbianas, amostras provenientes de cada tipo de plástico e cascalho foram divididas em triplicatas e armazenadas em ultrafreezer -80°C. As amostras para análise por microscopia eletrônica de varredura e cultivo foram armazenadas em geladeira a 4°C até seu processamento no Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM) no Instituto Oceanográfico da USP (IO-USP).



Figura 5: Sacos de fibras de vidro contendo as amostras de pellets (à esquerda) e sacolas (à direita) suspensos na estrutura do *lander*..

Tabela 1: Descrição das 18 amostras coletadas.

Código	Tipo de amostra	Data	Local	Coordenadas
PE_SP	<i>Pellets</i> de Polietileno	25/mai/15	São Paulo	28°1'42.24"S 43°31'43.32"W
PP_SP	<i>Pellets</i> de Polipropileno	25/mai/15	São Paulo	28°1'42.24"S 43°31'43.32"W
SC_SP	Sacola comum	25/mai/15	São Paulo	28°1'42.24"S 43°31'43.32"W
SB_SP	Sacola biodegradável	25/mai/15	São Paulo	28°1'42.24"S 43°31'43.32"W
C_SP	Cascalho	25/mai/15	São Paulo	28°1'42.24"S 43°31'43.32"W
AA_SP	Água adjacente	25/mai/15	São Paulo	28°1'42.24"S 43°31'43.32"W
PE_RJ	<i>Pellets</i> de Polietileno	23/mai/15	Rio de Janeiro	25°20'17.88"S 39°38'28.32"W
PP_RJ	<i>Pellets</i> de Polipropileno	23/mai/15	Rio de Janeiro	25°20'17.88"S 39°38'28.32"W
SC_RJ	Sacola comum	23/mai/15	Rio de Janeiro	25°20'17.88"S 39°38'28.32"W
SB_RJ	Sacola biodegradável	23/mai/15	Rio de Janeiro	25°20'17.88"S 39°38'28.32"W
C_RJ	Cascalho	23/mai/15	Rio de Janeiro	25°20'17.88"S 39°38'28.32"W
AA_RJ	Água adjacente	23/mai/15	Rio de Janeiro	25°20'17.88"S 39°38'28.32"W
PE_ES	<i>Pellets</i> de Polietileno	22/mai/15	Espírito Santo	22°50'27.24"S 38°24'58.68"W
PP_ES	<i>Pellets</i> de Polipropileno	22/mai/15	Espírito Santo	22°50'27.24"S 38°24'58.68"W
SC_ES	Sacola comum	22/mai/15	Espírito Santo	22°50'27.24"S 38°24'58.68"W
SB_ES	Sacola biodegradável	22/mai/15	Espírito Santo	22°50'27.24"S 38°24'58.68"W
C_ES	Cascalho	22/mai/15	Espírito Santo	22°50'27.24"S 38°24'58.68"W
AA_ES	Água adjacente	22/mai/15	Espírito Santo	22°50'27.24"S 38°24'58.68"W

4.3 Análise da Estrutura da Comunidade Procariótica

4.3.1 Extração do DNA total

A extração do DNA total dos polímeros foi realizada em duplicata utilizando-se o *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado com o fluorômetro *Qubit 1.0* (Life Technologies, USA) e o kit *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA), porém não atingiu a concentração mínima de DNA requerida para o sequenciamento na plataforma *Illumina Miseq* (1ng/uL). Desta forma foi realizada a amplificação prévia do DNA total, para os *amplicons* serem submetidos ao sequenciamento de nova geração conforme apresentado no item seguinte.

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada para obtenção dos *amplicons* e posterior sequenciamento consistiu em seis reações de 50ul para cada amostra contendo: 25 ul de Gotaq Green Master Mix (colocar fabricante), 0,25 µl de cada primer (515F – 806R), 2,5 µl de DMSO, 0,5 µl de BSA, 8µl de DNA molde e 13,5 µl de água ultrapura para completar o volume necessário. A reação de PCR consistiu em 40 ciclos para a fase de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida pelo anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

As seis reações de PCR de cada amostra foram unidas e purificadas com o kit *DNA Clean & Concentrator™* (Zymo Research, USA), quantificadas novamente com fluorômetro *Qubit 1.0* (Life Technologies, USA) e o kit *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies, USA). Em seguida, os *amplicons* obtidos foram observados em gel de agarose a 2% quanto a sua amplificação e intensidade das bandas.

Os *amplicons* gerados (Tabela 2) dos polímeros plásticos foram enviados para a empresa *Molecular Research - MR. DNA* (Texas, EUA) para sequenciamento na plataforma *Illumina Miseq* em um sistema *pair-end 2x300 pb*.

4.3.3 Sequenciamento do gene RNAr 16S por Illumina Miseq

A região hipervariável V4 do gene RNAr 16S de *Bacteria* e *Archaea* foi amplificada com os *primers* universais 515F (3' – GTGYCAGCMGCCGCGGTAA – 5') e 806R (3' – GGACTACNVGGGTWTCTAAT – 5'), (CAPORASO et al., 2010b) com adaptadores específicos (3'-CTGTCTCTTATACACATCT-5') para a plataforma *Illumina Miseq*. A reação de PCR foi realizada utilizando o kit *HotStarTaq Plus Master Mix* (Qiagen, USA) sob as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, seguidos de 28 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por uma elongação final de 72°C por 5 minutos.

As bibliotecas foram purificadas por *beads* magnéticas através do kit *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter), normalizadas e a etapa final de *pooling* foi realizada agrupando as bibliotecas e realizando o sequenciamento na plataforma *Illumina Miseq*.

4.3.4 Análise das sequências de gene RNAr 16S

Por meio do software USEARCH 10 (EDGAR, 2010) os *pair-ends* montados foram submetidos a filtros de qualidade e todas as sequências com valores abaixo de 30 (Phred>30) foram descartadas. Das sequências já filtradas por qualidade foram retirados os *singletons* e selecionadas sequências com comprimento mínimo de 300 pares de base através do comando *sortbylength*. As sequências representativas foram selecionadas através do comando *fastx_uniques* e em seguida clusterizadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) a partir do comando *cluster_otus*. As OTUs foram definidas utilizando-se o nível de distância de 3% sendo estabelecido 97% de similaridade pelo método *Uclust* (EDGAR, 2010).

Cada OTU foi classificada taxonomicamente pelo método BLAST, com base no banco de dados SILVA v.132, para isso foi utilizado o software QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*). As sequências foram alinhadas, filtradas e a árvore filogenética montada (CAPORASO et al., 2010).

Após a normalização da tabela OTU com o algoritmo *Cumulative-Sum Scaling* (CSS) (PAULSON et al., 2013), foram obtidos os índices de alfa-diversidade para riqueza (Chao1 e Ace) e diversidade (Shannon e Simpson).

Já para a análise de beta-diversidade foi utilizado o índice UniFrac, que utiliza duas abordagens para avaliar a diversidade de uma comunidade: a versão *weighted* UniFrac, que responde diretamente a diferença na abundância relativa dos organismos entre as amostras (quantitativo) e *unweighted* UniFrac que avalia apenas a presença e ausência dos organismos entre as amostras (qualitativo) (LOZUPONE et al., 2010). Dessa maneira, no presente estudo, a beta-diversidade foi representada pelo índice *weighted* UniFrac. A partir disso, foi realizada a Análise de Escalonamento Multidimensional não métrico (nMDS).

Todos os gráficos foram gerados através do software R v.3.3.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008) utilizando os pacotes *ggplot2* e *vegan*.

4.4 Análise do biofilme através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura

Para observar a colonização microbiana nos plásticos, as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% por 2h a temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio (0,2M; pH 7,0) com intervalos de 15 minutos. Em seguida, foram pré-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 1h (no escuro), lavadas três vezes com tampão por 10 minutos e desidratadas em séries crescentes de concentração de etanol 30, 50, 70, 90, 100%, por 15 minutos cada. Finalmente, foram secas pela técnica de ponto crítico de CO₂ (aparelho *Balzer Inc. CPD030*), cobertas com ouro (aparelho *Balzer Inc. MED030*) e observadas em microscópio *FEI Quanta 250* em 15 kV.

4.5 Isolamento e identificação dos biofilmes bacterianos associados a polímeros plásticos em mar profundo

Em placas de Petri, as amostras de *pellets* e sacolas foram inoculadas diretamente em meio de cultura mineral descrito por Sekiguchi et al. (2010). O meio mencionado foi preparado contendo por litro de água destilada: 1,87% de Caldo Marinho (Difco), 1,5% NaCl, 0,35% KCl, 5,4% MgCl₂ . 6H₂O, 2,7% MgSO₄ . 7H₂O, 0,5% CaCl₂ . 2H₂O, 1,2% Ágar e adicionados de 0,25% de grânulos de poli-β-hidroxi-butarato (PHB). As amostras foram incubadas por 15 dias a 13°C, ou até ser observado o crescimento de colônias em torno das amostras de plástico. Todas as colônias macroscópicas diferentes morfologicamente foram

repicadas por meio da técnica de esgotamento, de duas a três vezes até a obtenção de colônias puras para sequenciamento. Estas foram preservadas em glicerol 20% em ultra-freezer a -80°C.

O DNA genômico de 22 isolados foi extraído empregando-se o kit *Purelink Genomic DNA* (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. A amplificação do gene RNAr 16S foi conduzida utilizando-se os primers 515F (5' – GTGYCAGCMGCCGCGGTAA – 3') e 1401R (5' – CGGTGTGTACAAGGCCCGGGA – 3'). A reação em cadeia da polimerase (reação de 25 µL) foi realizada utilizando *Gotaq Mix Hot Start*, 0,25 µL de cada *primer* e 2 µL de DNA *template*. As condições da PCR foram: temperatura de desnaturação inicial de 95°C, 3 min; seguida por 30 ciclos de 94°C, 1 min; 53°C, 30 segundos; 72°C, 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. O produto de PCR foi purificado através do kit *DNA Clean and Concentrator (EMPRESA E PAIS)*, segundo as especificações do fabricante e enviado para sequenciamento na empresa *Genomic Engenharia Molecular*, onde foram sequenciados por meio do *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) com o *primer* 515F.

As sequências de DNA foram editadas manualmente utilizando o software *Bio-Edit Sequence Alignment Editor* (HALL; BIOSCIENCES; CARLSBAD, 2011). O alinhamento das sequências foi feito através do *software* MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) e a construção da árvore filogenética, foi feita utilizando parâmetros do *software* Muscle (EDGAR, 2004), com o algoritmo de “Maximum-Likelihood”, fator de correção Kimura 2 (KIMURA, 1980) com valor de *bootstrap* de 1000 repetições. Para compor a árvore foram selecionadas sequencias disponíveis nos bancos de dados do NCBI, escolhidas por sua similaridade às sequencias do presente trabalho através da ferramenta BLAST.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados gerais do sequenciamento do gene RNAr 16S

5.1.1 Concentrações do DNA Total

O DNA total foi extraído através de 0,4g de plásticos e cascalho como descrito anteriormente. Este foi purificado e quantificado por *Qubit 1.0* (Life

Technologies, USA) (Tabela 2). Contudo, na maioria das amostras, devido à baixa quantidade de DNA, não foi possível sua quantificação, sendo necessária a amplificação para dar seguimento ao sequenciamento de nova geração (Tabela 2).

Esta baixa concentração de DNA e sua difícil amplificação são esperados para este tipo de amostra e varia com a quantidade, tamanho da amostra de plástico e método de extração empregado.

Tabela 2: Quantificação por *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* do DNA Total das 18 amostras e dos *amplicons* gerados na PCR.

Amostra	Antes da Amplificação (ng/uL)	Depois da Amplificação e Purificação (ng/uL)
PE_SP	<0,5	6,28
PP_SP	0,074	0,708
SC_SP	<0,5	10,2
SB_SP	<0,5	6,24
C_SP	<0,5	7,14
AA_SP	1,2	7,29
PE_RJ	<0,5	<0,5
PP_RJ	<0,5	5,48
SC_RJ	0,21	6,29
SB_RJ	0,092	5,06
C_RJ	<0,5	6,4
AA_RJ	0,9	14,4
PE_ES	<0,5	8,68
PP_ES	<0,5	<0,5

SC_ES	0,101	6,16
SB_ES	0,274	0,312
C_ES	0,175	2,38
AA_ES	1,8	0,362

Em estudos recentes com a extração de DNA de micro e macroplásticos na superfície do oceano, as concentrações variaram entre 0,06 a 25,86 ng/uL e apresentaram dificuldade com a obtenção de DNA suficiente para sequenciamento, que só foi possível através da técnica de *nested-PCR* (DEBELJAK et al., 2017; OBERBECKMANN; KREIKEMEYER; LABRENZ, 2017). Neste trabalho, a quantidade adequada de produto de PCR para a maioria das amostras foi obtida através do aumento do número de ciclos da reação de PCR.

Entretanto, mesmo após a amplificação, os valores da quantificação de *amplicons* de algumas amostras continuaram muito abaixo do esperado, porém o gel de agarose a 2% confirmou que a amplificação da região determinada estava correta (Figura 6).

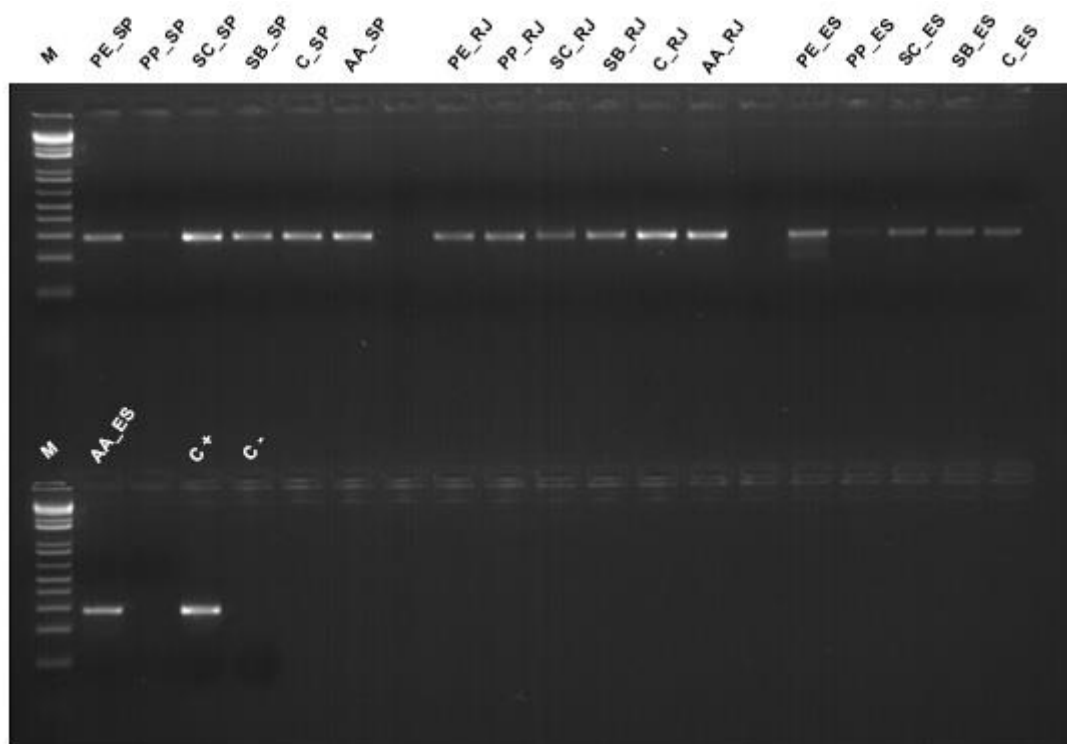


Figura 6: Produtos de PCR do DNA total extraído. M: marcador; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

5.1.2 Resultados gerais do sequenciamento do gene *rRNA 16S*

A tabela 3 mostra o resultado geral do sequenciamento do gene RNAr 16S quanto ao número total de *reads*, *reads* filtradas e número de OTUs por amostra.

Tabela 3: Resultados obtidos após a análise dos dados de sequenciamento do gene RNAr 16S quanto ao número de *reads* total, número de *reads* após filtro de qualidade e número de OTUs em cada amostra analisada.

Amostra	Nº Reads	Sequencias Filtradas	Nº de OTUs
PE_SP	146.745	127.994	808
PP_SP	109.604	97.149	700
SC_SP	124.468	102.715	1087
SB_SP	103.105	88.640	931
C_SP	109.021	92.121	1041

AA_SP	132.789	116.364	874
PE_RJ	126.613	103.974	979
PP_RJ	99.252	81.920	885
SC_RJ	110.142	96.634	1102
SB_RJ	113.421	97.192	1203
C_RJ	101.793	85.573	1253
AA_RJ	131.539	117.384	838
PE_ES	133.699	125.457	506
PP_ES	65.581	57.172	749
SC_ES	112.906	102.862	848
SB_ES	96.805	87.697	930
C_ES	128.368	117.501	956
AA_ES	128.221	114.288	866
Total	2.074.072	1.812.637	3300

Foram obtidas 1.812.673 sequencias filtradas, distribuídas nas 18 amostras, as quais foram classificadas com base na matriz de OTUs gerada pelo software *Qiime*, totalizando 3.300 OTUs, das quais 3.113 pertencem ao Domínio *Bacteria* e 145 ao Domínio *Archaea*.

5.2 Análise da Estrutura da Comunidade Procariótica

5.2.1 Composição taxonômica das comunidades nos plásticos e água adjacente para o Domínio *Bacteria*

Após a filtragem e análise das sequencias do gene RNAr 16S obtidas a partir dos plásticos, cascalho e água adjacente, foram encontrados nove filos

predominantes para o Domínio Bacteria com ocorrência superior à 0,1%, os quais foram identificados como Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Marinimicrobia, Planctomycetes, Patescibacteria e Deinococcus (Figura 7).

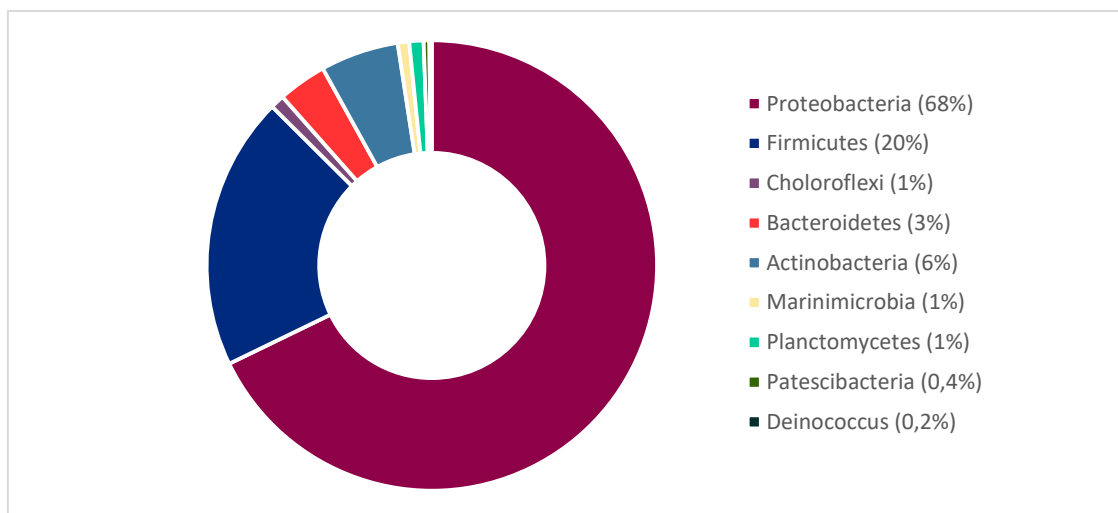


Figura 7: Abundância relativa dos filios do Domínio Bacteria que apresentaram valores maiores que 0,1% considerando todas as amostras.

O filo Proteobacteria, um grupo morfologicamente e metabolicamente diverso, compreendeu 68% das sequências analisadas, que foram classificadas em Gammaproteobacteria (64%), Alphaproteobacteria (30%) e Deltaproteobacteria (6%).

Alphaproteobacteria é o maior grupo de micro-organismos distribuídos no ambiente marinho devido a sua grande capacidade de adaptação nestes ambientes (DASH et al., 2013) e, juntamente com a classe Gammaproteobacteria, são considerados colonizadores pioneiros de superfícies artificiais nos oceanos (DANG; LOVELL, 2000; OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016; DIDIER; ANNE; ALEXANDRA, 2017). Diversos trabalhos sobre formação de biofilme marinho relatam a predominância da classe Gammaproteobacteria nas amostras analisadas (LEE et al., 2008; LEARY et al., 2014; SANLI et al., 2015).

A grande diversidade do Filo Proteobacteria favorece que os organismos deste grupo estejam presentes em diferentes ambientes com condições dinâmicas. Na figura 8 pode-se observar os diferentes organismos da classe

Gammaproteobacteria que foram classificados entre os 20 organismos mais abundantes em todas as amostras, cujos resultados serão discutidos a seguir.

Dentre elas está a ordem Oceanospirillales que é composta por bactérias heterotróficas psicrófilas, abundantes em ambientes de mar profundo, envolvidas na degradação de compostos orgânicos complexos, sendo encontrada em abundância em áreas contaminadas com hidrocarbonetos e em interações simbióticas com vermes tubícolas, auxiliando-os na degradação de carcaças de grandes vertebrados que afundam no assoalho oceânico (GOFFREDI et al., 2005; HAZEN et al., 2010; CAO et al., 2014). O gênero *Oleiphilus*, observado principalmente nas amostras de sacolas, também foi abundante na pluma de óleo do acidente da *Deepwater Horizon*, sendo um gênero conhecido de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (HAZEN et al., 2010; KING et al., 2015). Essa capacidade em fragmentar e assimilar compostos de cadeias de carbono complexa poderia auxiliar na degradação dos plásticos, devido a sua semelhante composição química.

Diversos estudos sobre a plastisfera marinha observaram a presença de enterobactérias dentre os grupos mais abundantes, assim como foi observado no presente estudo. Por ser um grupo de bactérias conhecidas pelo seu potencial patogênico e presença comum na microbiota gastrointestinal de diversos animais, despertou a preocupação da comunidade científica pelo fato destes microplásticos dispersos no oceano estarem transportando além de espécies exógenas, patógenos para outras regiões do planeta (ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013a; MINCER; ERICK R. ZETTLER; AMARAL-ZETTLER, 2016; DE TENDER et al., 2017). Entretanto, Yang e colaboradores (2014) isolaram pela primeira vez do trato digestório de uma larva terrestre, uma cepa de *Enterobacter* sp., a qual foi capaz de degradar um filme de polietileno (YANG et al., 2014).

A ordem Cellvibrionales é um grupo recentemente descrito e conhecido por OMG (Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria), observado nas amostras de sacolas e controle como clado BD1-7 e *Halioglobus* sp., (Figura 8). São microrganismos que podem ocupar diversos ambientes marinhos e incluem importantes membros do bacterioplâncton adaptados a condições oligotróficas (YANG et al., 2014; SPRING et al., 2015), sendo um resultado significativo para as condições oligotróficas relacionadas ao mar profundo.

A comunidade bacteriana da água adjacente apresentou grupos diferentes das amostras de plástico e cascalho, como os gêneros *Pseudoalteromonas* sp, *Idiomarina* sp, *Alteromonas* sp., clado SAR324 (Deltaproteobacteria) e SAR11 (Alphaproteobacteria) (Figura 8). *Idiomarina* sp, *Alteromonas* sp., SAR324 e SAR11 representam grupos de bactérias heterotróficas, típicas da coluna d'água oceânica, responsáveis pelo ciclo de matéria orgânica na zona epipelágica, mesopelágica e batipelágica (IVANOVA et al., 2000; CHITSAZ et al., 2011; CAMERON et al., 2014; GULMANN et al., 2015; SALAZAR et al., 2016).

O gênero *Pseudoalteromonas* sp foi identificado neste trabalho de uma amostra de sacola comum do sítio de São Paulo (Tabela 6), porém nas análises moleculares foi encontrado com maior abundância nas amostras de água adjacente (Figura 8). Outros estudos mostraram que estes microrganismos geralmente são encontrados aderidos a partículas, formando biofilmes em superfícies artificiais, como é o caso dos plásticos nos oceanos (RIOS; MOORE; JONES, 2007; LARA et al., 2015; DUHAIME; WICHELS; SULLIVAN, 2016). Contudo, também foram classificadas na comunidade da água adjacente a plásticos de superfície (ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013a; OBERBECKMANN et al., 2014).

Rhodobacterales é uma ordem que compreende microrganismos marinhos conhecidos por serem colonizadores primários de superfícies artificiais, podendo preceder a sucessão ecológica nestes substratos (DANG; LOVELL, 2000; JONES et al., 2007; DANG et al., 2008; AMARAL-ZETTLER et al., 2015; DE TENDER et al., 2017). Esta ordem representada pelo gênero *Oceanicella* neste estudo, esteve presente em maior quantidade nos substratos plásticos e cascalho do que na água adjacente.

O filo Firmicutes foi o segundo mais abundante, compreendendo 20% das sequências analisadas (Figura 9) e estas foram classificadas na classe Bacilli (Figura 10). Estes organismos estiveram presentes em maior abundância nos substratos plásticos e cascalho do que na água adjacente, destacando-se nos *pellets* de polietileno (Figura 8).

Em estudos recentes sobre a plastisfera marinha, também foram encontrados organismos da classe Bacilli em abundância nos substratos plásticos (CARSON et al., 2013; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER,

2013a), sendo considerados como possíveis degradadores, tanto grupos de ambientes terrestres quanto grupos de ambientes marinhos (ARUTCHELVI et al., 2008; SUDHAKAR et al., 2008; YANG et al., 2014). Contudo, no caso do polipropileno, as mudanças na estrutura do polímero não foram significativas (ARKATKAR et al., 2010).



Figura 8: Classificação taxonômica das 20 OTUs mais abundantes do domínio Bacteria. O tamanho das bolhas indica a porcentagem de sequências classificadas em cada OTU para cada substrato.

Actinobacteria representou 3% das sequências analisadas, com duas classes principais classificadas entre os 20 grupos bacterianos mais abundantes: Actinobacteria (Propionibacteriales) e Acidimicrobia (Microtrichales).

Dois filos foram encontrados com maior abundância relativa nos plásticos e cascalho do que nas amostras de água: Patescibacteria (0,4%) e Planctomycetes (1%). O filo Planctomycetes é conhecido por ocupar diversos ambientes e possui papel importante no ciclo de compostos orgânicos e inorgânicos em solos, sedimentos e sistemas aquáticos (STROUS et al., 1999; JENKINS; KEDAR; FUERST, 2002; BENGTSSON; ØVREÅS, 2010). Já Patescibacteria foi recentemente proposto como um superfilo para incluir os grupos Microgenomates (OP11), Parcubacteria (OD1) e Gracilibacteria, caracterizados por suas capacidades metabólicas reduzidas, sugerindo um estilo de vida simbiótico com outros organismos (CASTELLE; BANFIELD, 2018).

No ambiente marinho, Planctomycetes e Bacteroidetes são altamente adaptados a viver aderidos a superfícies e agregam a matéria orgânica

particulada, fazendo parte da neve marinha e favorecendo a formação de biofilme (BENGTSSON; ØVREÅS, 2010; DANG; LOVELL, 2016).

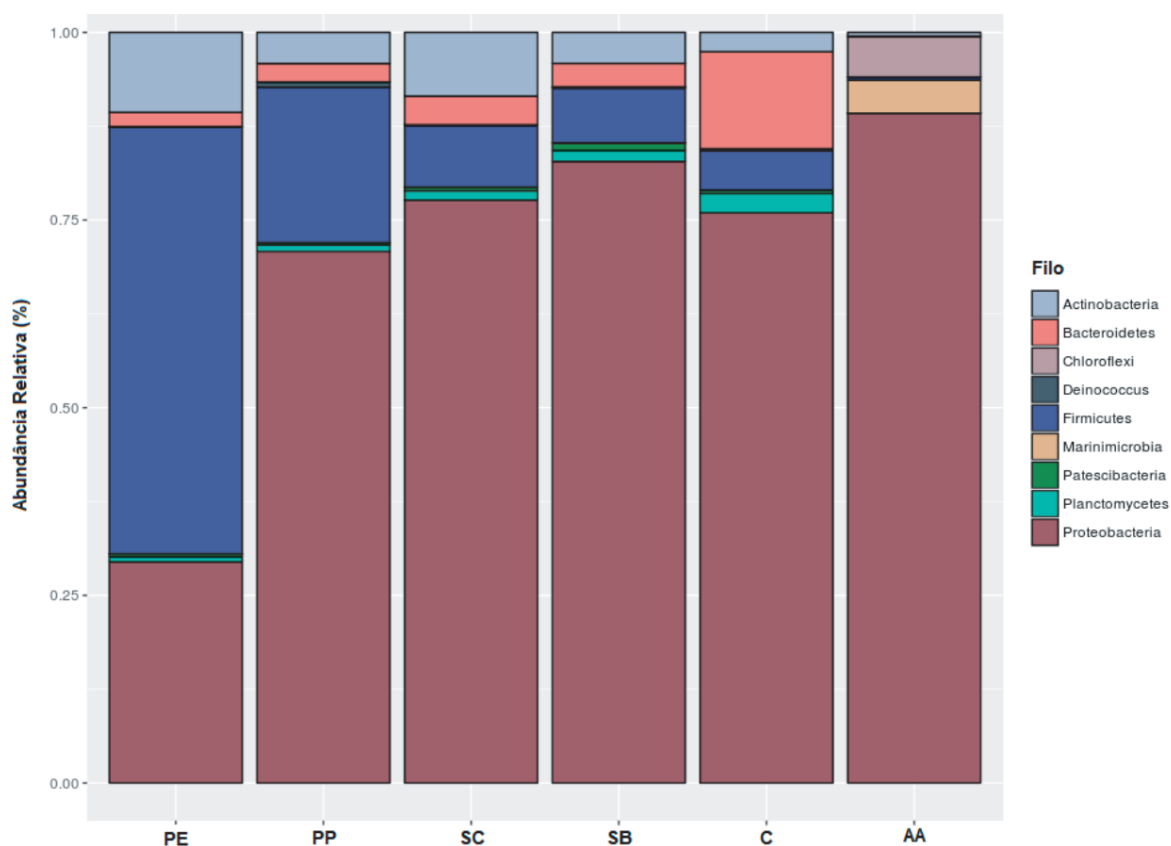


Figura 9: Abundância relativa dos filos do Domínio Bacteria que exibiram valores maiores que 0,1% separados por substrato. PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente.

Estes dados corroboram com os resultados do presente estudo, onde essas bactérias foram observadas somente nos substratos estudados e não na comunidade de vida livre presente na amostra de água adjacente (Figura 8). Este fato é evidenciado por Ogonowski et al. (2018) onde relacionam a mudança da estrutura da comunidade microbiana com a variação na hidrofobicidade do substrato, enfatizando a relevância das propriedades físico-químicas da superfície do substrato na estruturação do biofilme.

Já nas amostras de água houve a prevalência de três filos principais: Proteobacteria, Marinimicrobia e Chloroflexi, sendo os dois últimos exclusivos das amostras de água estudadas (Figura 8).

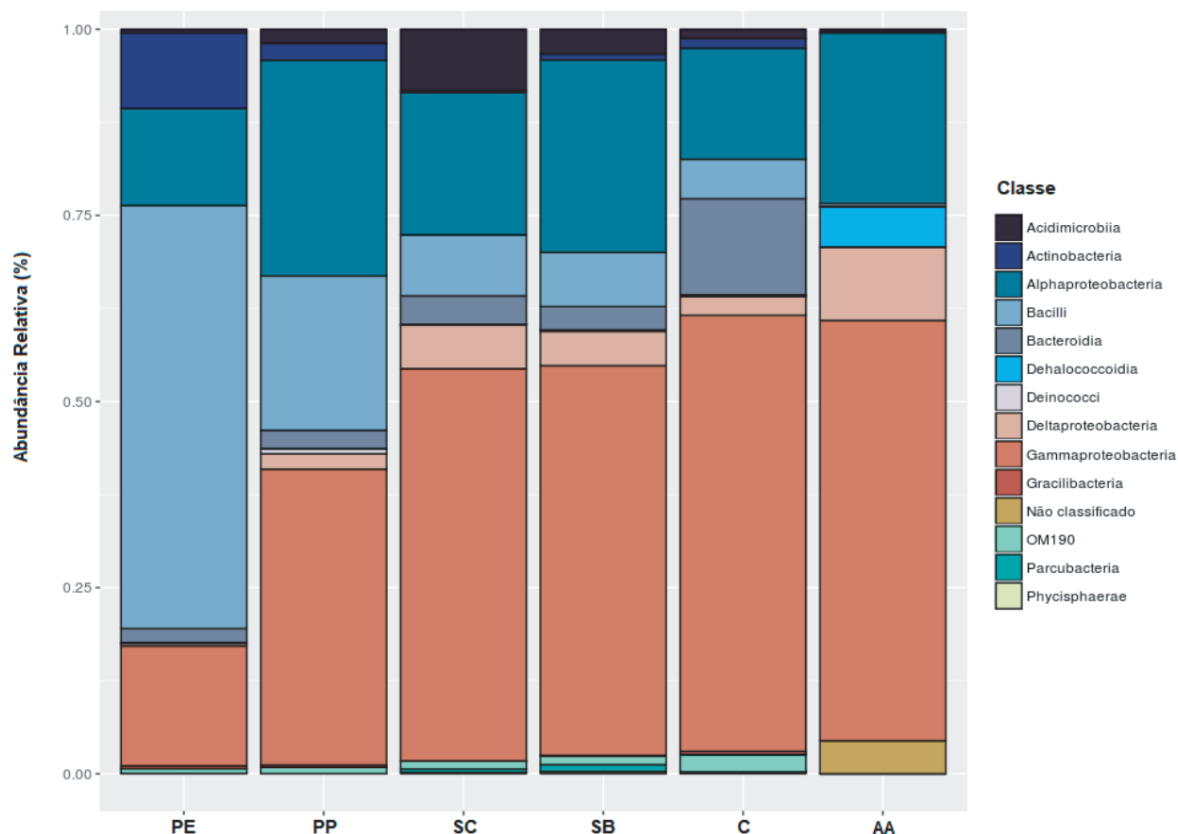


Figura 10: Abundância relativa das classes do Domínio Bacteria que exibiram valores maiores que 0,1% separados por substrato. PE: *pellets* de polietileno; PP: *pellets* de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente.

5.2.2 Composição taxonômica das comunidades nos plásticos e água adjacente para o domínio Archaea

Para o domínio Archaea as sequências com ocorrência superior a 0,1%, foram identificadas como pertencentes aos filos Thaumarchaeota, Nanoarchaeota e Euryarchaeota (Figura 11).

O filo Thaumarchaeota compreendeu 83% das sequências de arqueias analisadas para todas as amostras, sendo representada em sua totalidade pela classe Nitrososphaeria (Figura 13) e pela ordem Nitrosopumilales, apresentando maior abundância relativa nas amostras de água do que nos substratos (Figura 12).

Este é um filo diverso e abundante em vários ambientes marinhos e terrestres, constituindo 20% do picoplâncton dos oceanos globais (BAYER et al., 2016; DANG; LOVELL, 2016). Seus representantes são conhecidos por oxidarem amônia e são adaptados a condições oligotróficas (BAYER et al., 2016).

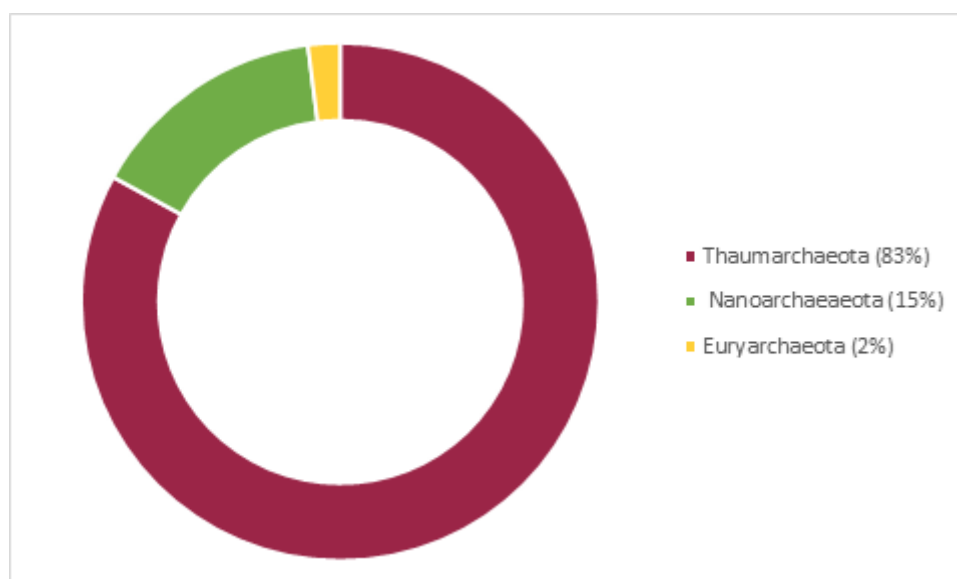


Figura 11: Abundância relativa dos filios do Domínio Archaea que apresentaram valores maiores que 0,1% considerando todas as amostras.

O segundo filo mais abundante do domínio Archaea foi Nanoarchaeota, compreendendo 15% das sequencias de arqueias analisadas para todas as amostras (figura 11). Este grupo foi encontrado em maior abundância nos substratos plásticos e em menor proporção nas amostras de água (Figura 12).

Inicialmente, este filo foi descrito para um único organismo encontrado em fontes hidrotermais em mar profundo e posteriormente em ambientes terrestres, sugerindo uma ampla distribuição deste grupo (HUBER et al., 2003).

O filo Euryarchaeota compreendeu apenas 2% das sequencias de arqueia analisadas e esteve presente em maior abundância nas amostras de água e em menor quantidade nas amostras de *pellets* e sacola biodegradável. As amostras de cascalho e sacola comum apresentaram poucas sequencias pertencentes a este filo (Figura 12).

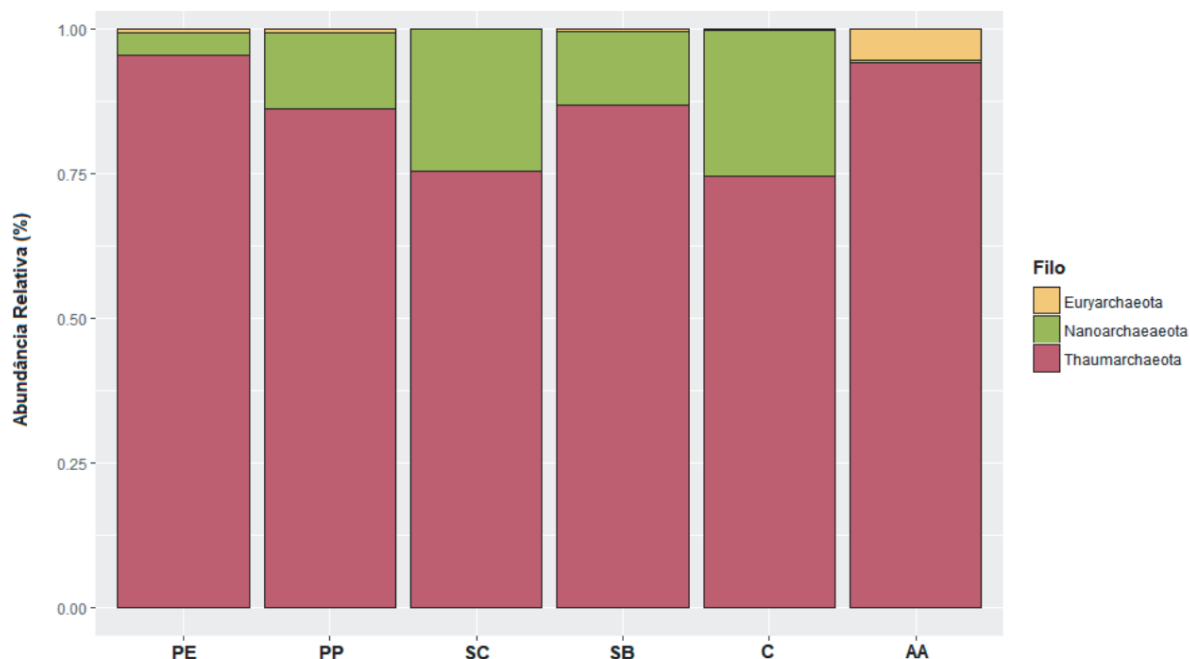


Figura 12: Abundância relativa dos filos do Domínio Archaea que exibiram valores maiores que 0,1% separados por substrato. PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente.

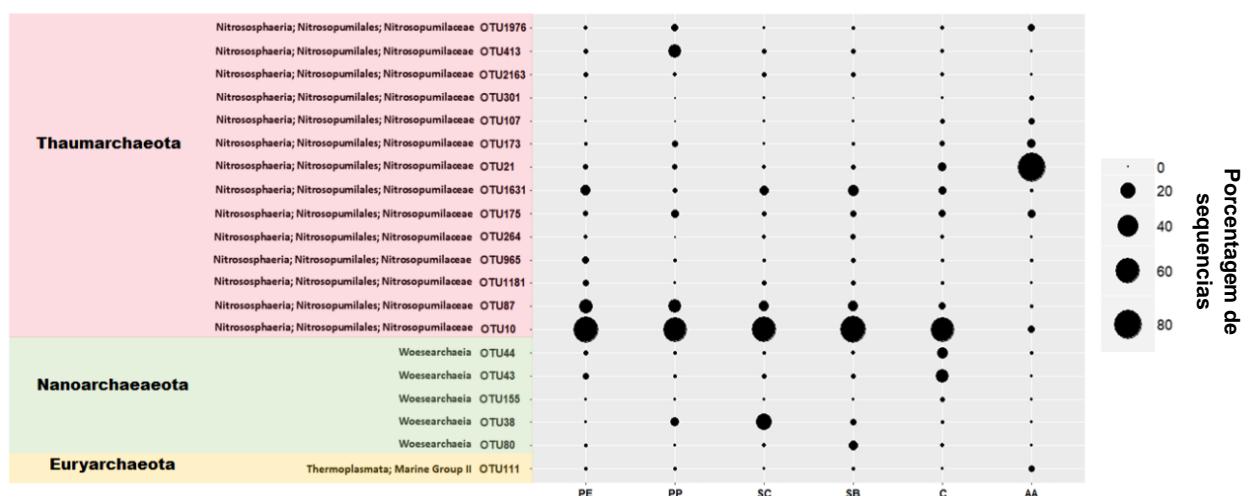


Figura 13: Classificação taxonômica das 20 OTUs mais abundantes do domínio Archaea. O tamanho das bolhas indica a porcentagem de sequências classificadas em cada OTU para cada substrato.

O uso de técnicas moleculares para a descrição taxonômica da plastisfera marinha vem se tornando comum entre os trabalhos mais recentes. Didier e colaboradores (2017) utilizaram somente as OTUs do domínio Bacteria para a descrição taxonômica das amostras de plástico. Já Oberbeckmann et al., (2016) identificaram arqueias do filo Euryarchaeota somente nas comunidades de vida livre na água adjacente aos plásticos coletados, assim como no presente estudo.

Dessa maneira, este trabalho contribui para o conhecimento da comunidade de arqueias em mar profundo que estão associadas a substratos plásticos,

5.2.3 Riqueza e alfa-diversidade

A Tabela 4 mostra os índices de riqueza (Chao1 e Ace) e alfa-diversidade (Shannon e Simpson) e a Figura 14 ilustra estes índices para as amostras de plásticos, controle e água adjacente estudadas no presente trabalho.

Para ambos os índices, as amostras foram agrupadas de acordo com os cinco substratos: *pellets* de polietileno (PE) e polipropileno (PP), sacola biodegradável (SB) e comum (SC), cascalho (C) e água adjacente (AA).

Em relação aos índices de riqueza (Chao1 e Ace), as amostras de *pellets* e sacolas comparadas entre si mostraram diferença significativa tanto para Chao1 ($p\text{-value} = 0,05$) quanto para Ace ($p\text{-value} = 0,01$), com as amostras de sacolas apresentando maior riqueza microbiana do que as amostras de *pellets*. Já a comparação entre todas as amostras de plástico (*pellets* e sacolas) e as amostras de água adjacente não mostrou diferença significativa entre esses dois grupos de amostras tanto para o índice de Chao1 quanto para o índice de Ace ($p\text{-value} = 0,2$, $p\text{-value}=0,3$, respectivamente), assim como a comparação de ambos os índices entre as amostras de plástico e as amostras controles ($p\text{-value} = 0,1$).

Comparando os índices de riqueza dos substratos individualmente, somente as amostras de *pellets* de polipropileno apresentaram diferenças significativas para o índice de Ace quando comparadas ao substrato controle e sacolas comum e biodegradável ($p\text{-value} = 0,05$, $p\text{-value}=0,04$, $p\text{-value}=0,05$, respectivamente). Já as amostras de sacola comum foram as únicas a apresentar diferença significativa em relação as amostras de água pelo índice de Chao1 ($p\text{-value} = 0,05$).

Todas as amostras apresentaram altos valores de diversidade para ambos os índices apresentados (Shannon e Simpson). Entretanto, observou-se diferença significativa quando comparados os *pellets* e as sacolas, tanto para o índice de Shannon ($p\text{-value} = 0,01$) quanto para o índice de Simpson ($p\text{-value} = 0,03$). Isso não é observado comparando-se as amostras de plástico com as

amostras de água adjacente e com as amostras controle ($p\text{-value} = 0,4$, $p\text{-value}=0,7$, respectivamente).

Individualmente, em relação à diversidade, as amostras do substrato controle foram significativamente diferentes das amostras de *pellets* de polipropileno ($p\text{-value} = 0,02$) e da água adjacente ($p\text{-value} = 0,01$). Os *pellets* de polipropileno também apresentaram diferença significativa entre as amostras de sacola biodegradável ($p\text{-value} = 0,04$) e amostras de sacola comum pelo índice de Shannon ($p\text{-value} = 0,05$). As sacolas biodegradáveis mostraram diferença significativa em comparação com as amostras de água adjacente.

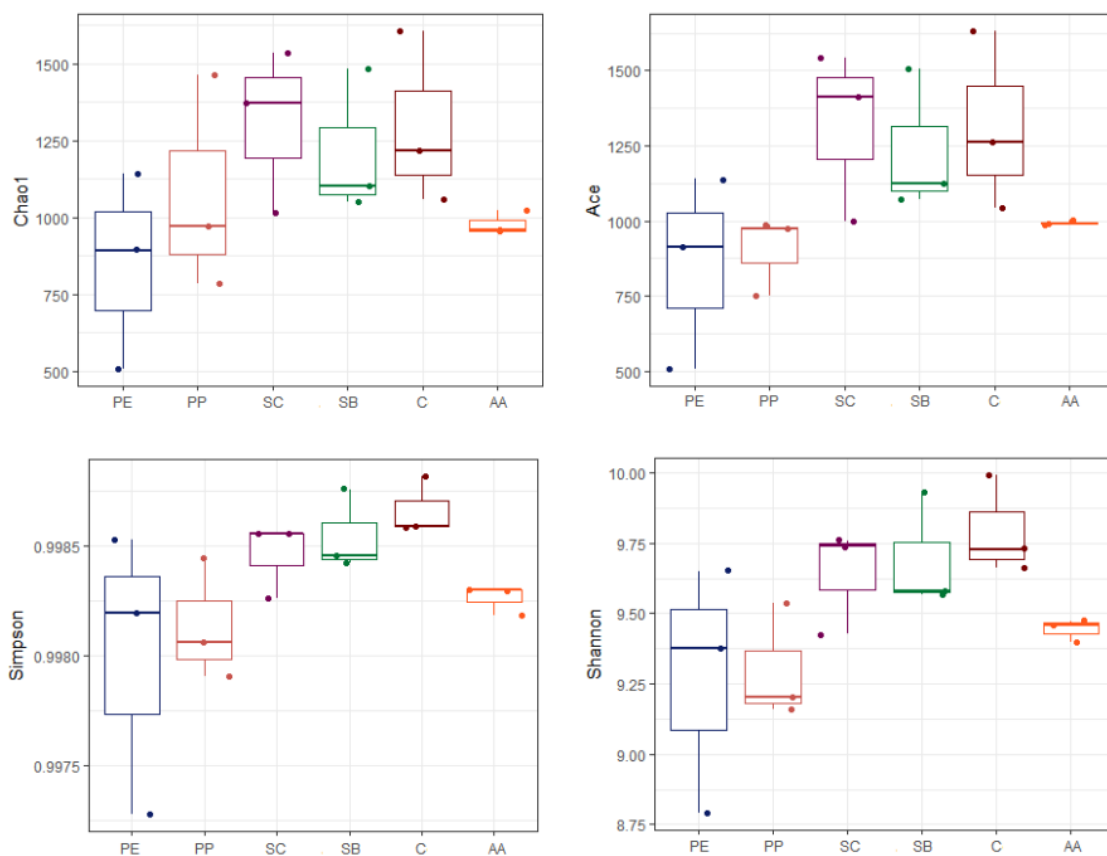


Figura 14: Índices de riqueza (Chao1 e Ace) e de diversidade (Shannon e Simpson) estimados para as amostras de Cascalho (C), pellets de Polietileno (PE), pellets de Polipropileno (PP), Sacolas Biodegradáveis (SB), Sacolas Comuns (SC) e de Água Adjacente (AA).

Tabela 4: Índices de riqueza (Chao1 e Ace), de diversidade (Shannon e Simpson) estimados para as amostras Controle (C), Pellets (PE e PP), Sacolas (SB e SC) e Água Adjacente (AA) coletados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo.

Amostra	Chao1	Ace	Shannon	Simpson
C_ES	1057,500	1044,811	9,661	0,999
C_RJ	1607,498	1632,244	9,993	0,999
C_SP	1216,686	1261,958	9,727	0,999
PE_ES	506,000	506,000	8,791	0,997
PE_RJ	1143,321	1138,432	9,651	0,999
PE_SP	893,539	914,753	9,376	0,998
PP_ES	1461,967	985,089	9,159	0,998
PP_RJ	972,781	972,525	9,535	0,998
PP_SP	784,307	752,451	9,201	0,998
SB_ES	1049,641	1072,842	9,582	0,998
SB_RJ	1483,260	1506,930	9,926	0,999
SB_SP	1102,004	1123,422	9,567	0,998
SC_ES	1015,417	996,587	9,428	0,998
SC_RJ	1535,129	1542,372	9,759	0,999
SC_SP	1372,289	1410,787	9,740	0,999
AA_ES	1023,557	1003,069	9,458	0,998
AA_RJ	958,526	988,156	9,396	0,998
AA_SP	955,690	988,849	9,472	0,998

5.2.4 Beta-diversidade

As análises de beta diversidade foram realizadas através da distância métrica de UNIFRAC. Esta distância incorpora distâncias filogenéticas entre os membros da comunidade para realização do cálculo da matriz de distância. O UNIFRAC quantitativo (*weighted*) considera a abundância dos organismos e o UNIFRAC qualitativo (*unweighted*) que considera presença e ausência dos organismos entre as amostras (LUZOPONE et al., 2005). Sendo assim, no presente trabalho foi utilizado o índice *weighted* UNIFRAC.

A partir deste índice, foi realizada a análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) (Figura 16) e um dendrograma (Figura 15) para determinar se as comunidades procarióticas estavam sendo selecionadas pelo tipo de substrato ou se diferiam pelo sítio de fundeio.

No dendrograma apresentado na figura 15, observa-se a formação de três clusters: o primeiro contendo as amostras de água, o segundo contendo as amostras de sacolas e cascalhos e o terceiro contendo as amostras de *pellets*.

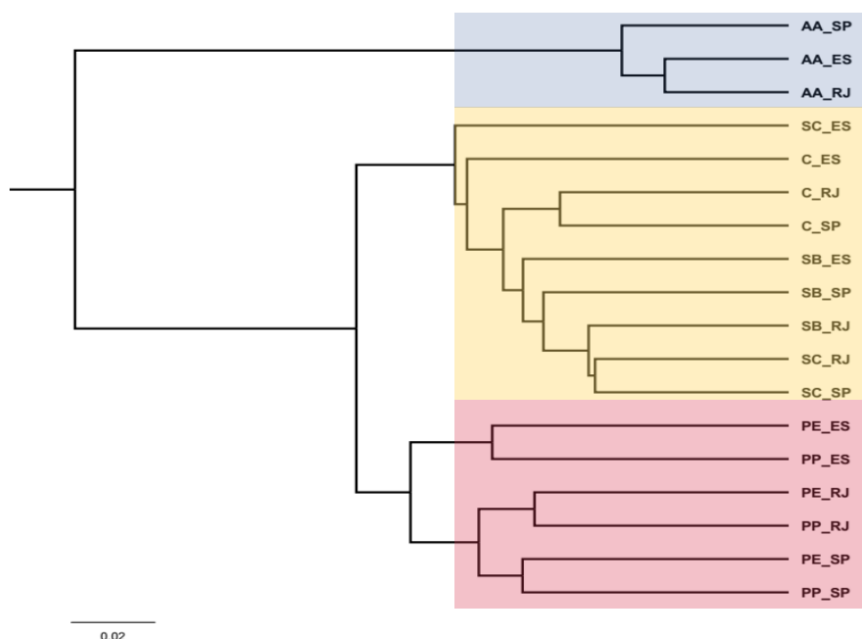


Figura 15: Dendrograma gerado pelo índice *weighted* UNIFRAC e clusterização pelo método UPGMA.

Essa diferenciação entre os substratos também é observada no nMDS da figura 16, onde ocorre uma distância maior entre as amostras de água e os outros substratos, enquanto que a distância entre os substratos plásticos e

cascalho diminui, porém, com uma distância menor ainda entre as amostras de sacola e cascalho.

Essa diferença entre as amostras de água adjacente e os substratos artificiais é esperada e relatada em estudos pretéritos da plastisfera marinha, nos quais nota-se a presença de comunidades específicas em agregados de partículas, como a neve marinha, e o ambiente aquático do entorno (DIDIER; ANNE; ALEXANDRA, 2017).

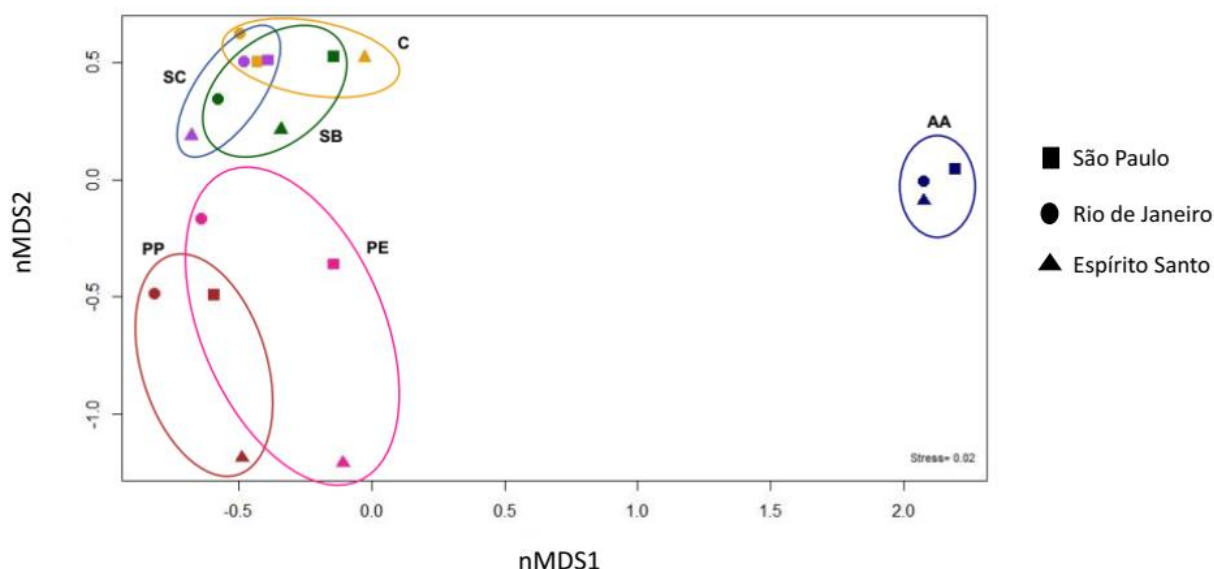


Figura 16: Análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) para beta-diversidade (*weighted Unifrac*) da comunidade microbiana das amostras de plástico e água adjacente (stress= 0,02). PE: pellets de polietileno; PP: pellets de polipropileno; SC: sacola comum; SB: sacola biodegradável; C: cascalho; AA: água adjacente. As formas referem-se aos sítios de fundeio.

O teste de significância Adonis baseia-se na análise de permutação multivariada da variância e foi utilizado neste trabalho para verificar se houve diferença significativa dos valores dos índices *weighted UNIFRAC* comparando-se os substratos entre si e os sítios de fundeio entre si.

Na Tabela 5 pode-se observar que houve diferença significativa entre as amostras de plásticos e água e entre as amostras de *pellets* e sacolas. Porém, não houve diferença significativa entre os sítios de fundeio, uma vez que as três localidades são banhadas pela mesma massa d'água (ACI e APAN), as quais podem ter agido dispersando as comunidades microbianas, contribuindo para as semelhanças entre elas os sítios de fundeio.

Tabela 5: Análise de significância Adonis a partir dos índices *weighted* UNIFRAC.

	<i>p-value</i>	R ²
Plástico vs. Água	0,003*	0,55
Pellets vs. Sacolas	0,001*	0,43
Plástico vs. Cascalho	0,04	0,15
Pellets vs. Cascalho	0,01	0,43
Sacolas vs. Cascalho	0,01	0,291
SP vs.RJ	0,6	0,05
SP vs.ES	0,5	0,08
RJ vs.ES	0,6	0,07

**resultado significativo*

A fim de obter maiores informações sobre a contribuição das comunidades microbianas neste novo microambiente dos oceanos, foi feita a análise do microbioma central da plastisfera de mar profundo representada na figura 17.

Foram detectadas 194 OTUs presentes em 100% das amostras de plásticos analisadas (Figura 17 – A), as quais foram classificadas nos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Atribacteria, Fibrobacteres, Deinococcus, Marinimicrobia, Peregrinibacteria, Planctomycetes e Chloroflexi, bem como suas respectivas classes (Figura 17 – B).

Os grupos identificados são típicos de oceano profundo, sendo relatados em diversos ambientes marinhos, desde a coluna d'água até sedimentos de regiões profundas (ORCUTT et al., 2011).

No Apendice A é mostrada a classificação completa destes microorganismos, onde pode-se notar a presença de grupos interessantes para o presente trabalho por estarem diretamente relacionados à degradação de hidrocarbonetos, como por exemplo a família Alcanivoracaceae (*Alcanivorax* sp) e Oceanospirillaceae (*Oleispira* sp) da classe Gammaproteobacteria e as ordens Rhodobacterales e Sphingomonadales e a família Hyphomonadaceae da classe Alphaproteobacteria (YAKIMOV; TIMMIS; GOLYSHIN, 2007; KERTESZ; KAWASAKI; STOLZ, 2018).

A presença destes grupos no microbioma central da plastisfera de mar profundo é relevante, uma vez que, por serem capazes de degradar hidrocarbonetos, poderiam apresentar possíveis vias para metabolizar as cadeias de carbono complexas dos polímeros plásticos, contribuindo para acelerar a degradação destes resíduos no ambiente marinho.

Alguns destes microrganismos identificados no microbioma central foram relatados como degradadores de polímeros plásticos, inclusive em condições semelhantes ao oceano profundo. Sekiguchi e colaboradores 2010 isolaram bactérias da ordem Pseudomonadales (*Psychrobacter* sp) capazes de degradar um tipo de polímero biodegradável nestas condições extremas.

Estudos realizados na superfície dos oceanos sugerem que além de uma superfície de adesão, poderiam consumir o carbono disponível neste resíduo, uma vez que estão em um ambiente oligotrófico (ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013; OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016).

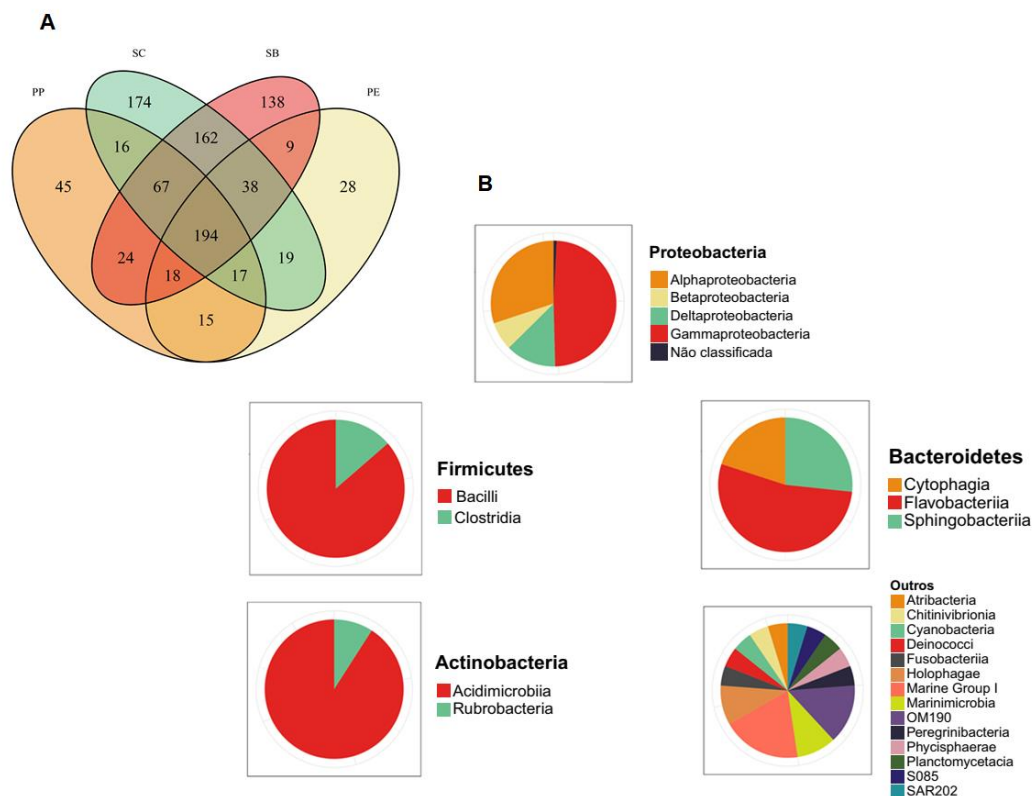


Figura 17: Número de OTUs que compõem o microbioma central da plastisfera de mar profundo (A). A abundância relativa das 194 OTUs compartilhadas e sua classificação taxonômica a nível de classe estão representadas em B.

5.3 Análise do biofilme através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura

A técnica da microscopia eletrônica de varredura trouxe maiores possibilidades para o entendimento da colonização de comunidades microbianas através da visualização de biofilmes em ambientes aquáticos.

Com o aumento de resíduos sólidos no ambiente, principalmente de plásticos, esta ferramenta vem para auxiliar no entendimento do novo micro-habitat que vem se estabelecendo nas ilhas de lixo nos oceanos globais.

Neste trabalho, um dos objetivos foi verificar como a formação de biofilme tem potencial para a biodegradação de polímeros plásticos, em diferentes tipos de substratos com diferentes tamanhos a uma profundidade de 3300m, por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. As imagens geradas mostraram a ausência de biofilmes nas superfícies dos materiais fundeados, tanto nos *pellets* de polipropileno e polietileno (Figura 18), quanto nas sacolas plásticas biodegradáveis e comuns (não biodegradáveis).

A maior parte das amostras coletadas não mostrou alterações perceptíveis que pudessem indicar degradação biótica. Contudo, apesar da ausência de uma formação de biofilme mais complexa, nota-se a presença de uma pequena quantidade de células aderidas às superfícies (Figura 19). Os micro-organismos observados no presente estudo possuem em média 2 μm de tamanho e estão distribuídos de forma esparsa e individual (Figura 19 - A, B, C) no caso dos *pellets* e em aglomerados (*patches*) (Figura 19-D) no caso da sacola plástica comum. Nas sacolas biodegradáveis não foi observado células microbianas aderidas nas superfícies.

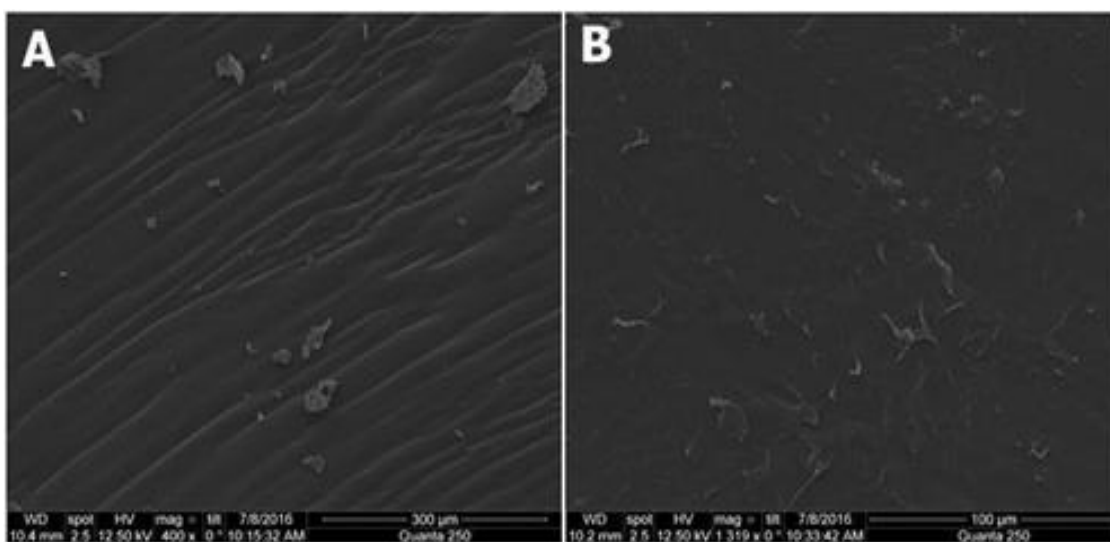


Figura 18: Imagem de MEV com amostras de pellets de polietileno (A) e polipropileno (B) fundeadas a 3300 m de profundidade sem a formação de biofilme.

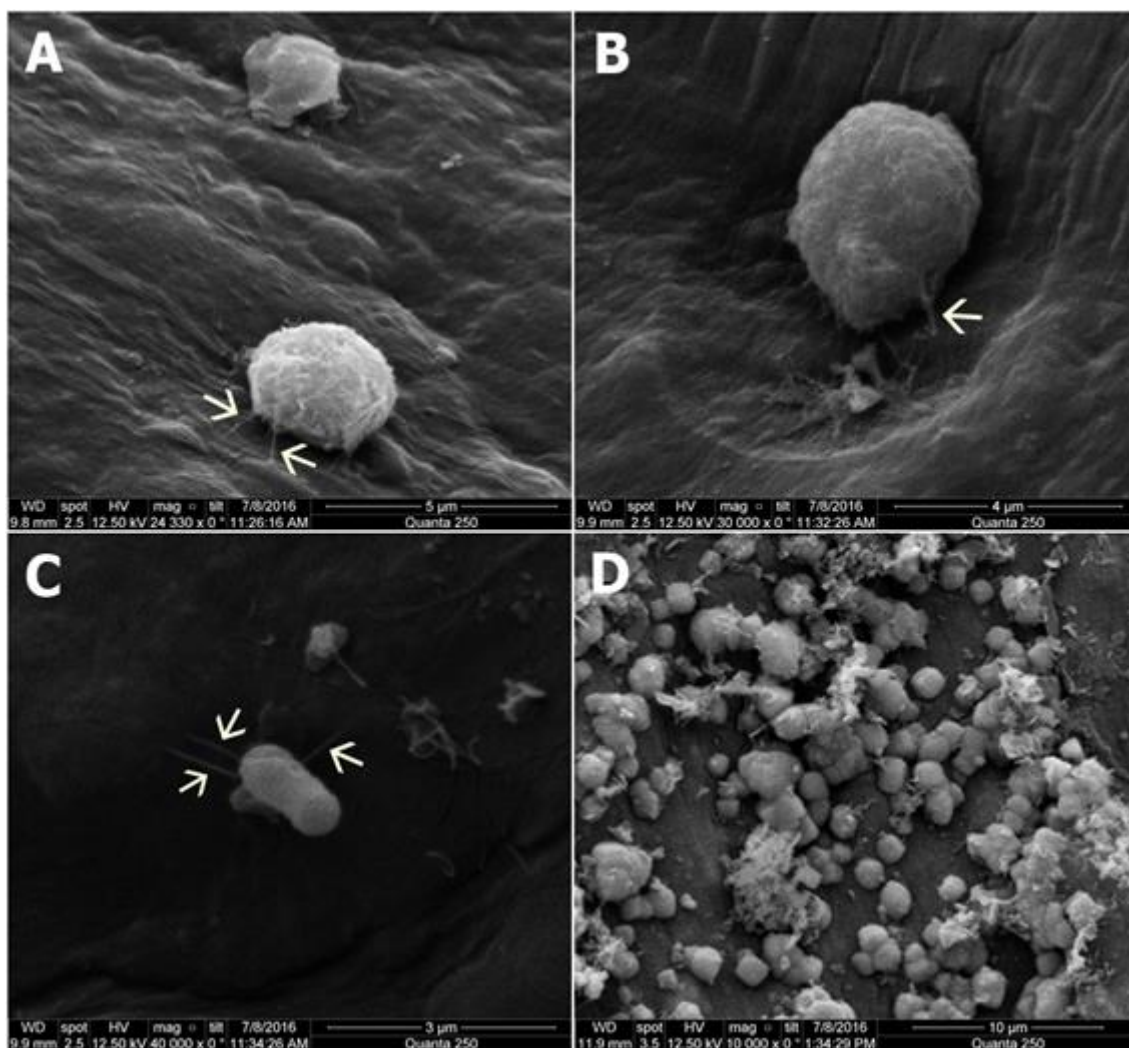


Figura 19: Imagem de MEV com exemplos de *pellets* de polipropileno (A, B, C) e sacola não-biodegradável (D) fundeados a 3300m de profundidade. As setas indicam filamentos responsáveis pela adesão das células no substrato.

Embora a colonização por micro-organismos ocorra rapidamente e seja um processo altamente dinâmico (REISSER et al., 2014; DANG; LOVELL, 2016), no presente estudo não foram observadas estruturas de biofilmes complexas.

Os primeiros trabalhos sobre a ocorrência de resíduos plásticos no ambiente datam da década de 70, sendo os pioneiros a observar a presença de organismos aderidos a superfície, tanto de procariotos quanto de eucariotos (CARPENTER; SUSAN; PECK, 1972).

O tamanho dos resíduos plásticos pode ser um fator determinante para a colonização microbiana. Carpenter e colaboradores (1972) identificaram a adesão de organismos em pequenas esferas de poliestireno, as quais possuíam um tamanho em torno de 0.5 mm de diâmetro. Em estudos recentes realizados na superfície do oceano Pacífico Norte, a diversidade e riqueza de organismos aderidos a superfície dos plásticos aumentou de acordo com o tamanho dos

fragmentos (CARSON et al., 2013; GOLDSTEIN; CARSON; ERIKSEN, 2014). No presente estudo também pode-se notar diferença na abundância de micro-organismos aderidos as superfícies dos polímeros, sendo que as sacolas plásticas apresentaram maior quantidade de células do que os *pellets*, os quais possuíam aproximadamente 5mm de diâmetro.

A característica e o tipo de resina plástica também podem interferir na abundância e composição da comunidade microbiana. Fragmentos de poliestireno (principal constituinte de objetos de isopor) encontrados na superfície do Oceano Pacífico Norte abrigam maior quantidade de micro-organismos do que fragmentos de polietileno e polipropileno encontrados no mesmo local, sugerindo um favorecimento do crescimento microbiano neste tipo de substrato em relação aos outros (CARSON et al., 2013). Além disso, fragmentos que possuem uma superfície mais complexa, com rugosidades e erosões, por exemplo, oferecem melhores condições para a adesão do que uma superfície lisa (GOLDSTEIN; CARSON; ERIKSEN, 2014). Isso também foi notado no presente estudo em que as superfícies das sacolas, as quais eram mais rugosas, apresentaram uma maior concentração de células do que a superfície lisa e uniforme dos *pellets*.

Quando disperso no ambiente marinho, os resíduos plásticos ficam sujeitos a degradação física, química e biológica, que irá fragmentá-los em peças menores. As taxas de degradação física e química são maiores quando comparadas a degradação biológica (Arutchelvi et al., 2008), mas quando expostos a vários fatores abióticos, estes causam oxidação e formam grupos carbonil nos plásticos, facilitando a colonização por micro-organismos e a possível degradação biótica destes resíduos no ambiente marinho (ORR; HADAR; SIVAN, 2004; SUDHAKAR et al., 2007; NAUENDORF et al., 2016). Logo, a falta de fatores abióticos como radiação UV e a ação de ondas, podem inibir a biodegradação dos plásticos em mar profundo, à medida que as cadeias de carbono permanecem longas demais para serem degradadas diretamente pela atividade microbiana (NAUENDORF et al., 2016).

No presente trabalho, os plásticos foram depositados diretamente no fundo oceânico, um ambiente extremo, fisicamente uniforme, caracterizado por baixas temperaturas, alta pressão hidrostática, ausência de radiação solar, oligotrófico, com alta diversidade, porém com baixa abundância de organismos

(LAURO; BARTLETT, 2008), sem permanecer anteriormente na superfície e, portanto, sem passar por uma prévia degradação. Como sugerido nos estudos anteriores, esse conjunto de fatores pode explicar a baixa ocorrência de micro-organismos aderidos às superfícies plásticas.

A capacidade de adesão dos micro-organismos aos plásticos no ambiente marinho chamou a atenção para a possibilidade de estar ocorrendo a biodegradação deste substrato e sua utilização como fonte de carbono.

Experimentos *in vitro* com a utilização de técnicas tradicionais de cultivo confirmam que determinadas bactérias marinhas são capazes de utilizar polímeros de polietileno como fonte de carbono mostrando também a erosão causada por estes micro-organismos por meio de imagens de MEV (HARSHVARDHAN; JHA, 2013).

No presente estudo, nota-se apenas a presença de uma cavidade circular colonizada por uma célula microbiana (Figura 19), entretanto, não se pode afirmar se este micro-organismo realmente utilizou o substrato como fonte de carbono. Nas outras imagens não foi possível observar qualquer modificação do substrato que indicasse biodegradação.

Este fato também foi observado no estudo de Oberbeckmann et al., 2014 e também de Nauendorf et al., 2016 no qual uma análise mais detalhada da composição dos plásticos não indicou degradação ou deformação do substrato. Em contra partida, outros estudos publicados com imagens de MEV, sugerem a alteração da superfície dos plásticos devido a degradação por micro-organismos (SEKIGUCHI et al., 2010a; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013).

Sendo assim, embora a Microscopia Eletrônica de Varredura auxilie o entendimento da plastisfera marinha, se faz necessário o uso de técnicas adicionais para um melhor entendimento da composição e função dos micro-organismos deste novo microhabitat.

5.4 Identificação de bactérias isoladas associadas a polímeros plásticos

Após a incubação por 15 dias a 13°C, observou-se o crescimento de colônias bacterianas apenas ao redor das amostras de plásticos inoculadas diretamente no meio mineral acrescido de PHB. Todas as colônias diferentes morfológicamente foram repicadas por meio da técnica de esgotamento, de duas a três vezes até a obtenção de colônias puras. Dessa maneira, foram

isoladas 22 colônias e estas submetidas à técnica de sequenciamento e preservadas em glicerol 20%. Os *pellets* do ponto de Rio de Janeiro e substrato controle do ponto de São Paulo não apresentaram crescimento no tempo estimado de incubação.

Estes isolados foram identificados com base em sua homologia à sequência do gene RNAr 16S e a análise filogenética mostrou similaridade a quatro principais filos (Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes), cinco classes (Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Gammaproteobacteria, Flavobacteriia e Bacilli), sete ordens (Rhodobacterales, Corynebacteriales, Alteromonadales, Flavobacteriales, Oceanospirillales, Bacillales e Micrococcales) e oito famílias (*Rhodobacteraceae*, *Nocardiaceae*, *Alteromonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Halomonadaceae*, *Bacillaceae*, *Micrococcaceae* e *Pseudoalteromonadaceae*), como mostrado na Figura 21.

Foram encontrados 10 gêneros diferentes distribuídos entre as oito famílias. A maior parte dos isolados apresentou similaridade com a família *Halomonadaceae*, a qual inclui os gêneros *Salinicola* (17_RJC, 14_RJC, 12_RJS2, 18_SPP1, 22_SPS2, 19_SPP2 e 11_RJS1) e *Halomonas* (9_ESC).

A família *Halomonadaceae* é caracterizada por bacilos Gram-negativos, aeróbicos, heterotróficos e com metabolismo oxidativo (FRANZMANN; WEHMEYER; STACKEBRANDT, 1988).

O gênero *Halomonas* é o maior dentro deste grupo, sendo encontrado em diversos ambientes altamente salinos, inclusive em mar profundo (ALEKSIC; BOCKEMUHL, 2013; XU et al., 2013). Inclui bactérias halofílicas e halotolerantes, encontradas em uma variedade de habitats devido a seu fenótipo heterogêneo (ALEKSIC; BOCKEMUHL, 2013). São quimioheterotróficas e já foram isoladas de enriquecimentos de sedimentos de mar profundo contaminados com hidrocarbonetos, relacionando-as com o processo de degradação e possibilidade de biorremediação ambiental, uma vez que produzem exopolissacarídeos que emulsificam diferentes tipos de hidrocarbonetos (CALVO et al., 2003). Entretanto, no presente estudo, o gênero *Halomonas* foi isolado do substrato controle (cascalho), podendo-se inferir que estes micro-organismos utilizaram este substrato apenas como adesão e suporte.

Já o gênero *Salinicola*, o mais abundante entre as amostras, foi inicialmente descrito em 2007 por Anan'ina et al. e é caracterizado por bacilos gram-negativos, aeróbicos, quimiorganotróficos, moderadamente halofílicos e mesofílicos que foram isolados em uma mina de sal de uma comunidade microbiana consumidora de naftleno (ANAN'INA et al., 2007). São encontrados em diversos ambientes altamente salinos, incluindo o mar profundo (HUO et al., 2013). Assim como os isolados similares a *Halomonas*, alguns isolados similares a *Salinicola* também foram encontrados associados ao substrato controle. Contudo, no presente estudo, a maior parte foi isolada de diferentes tipos de plásticos, como os pellets de polietileno e polipropileno e sacolas comum e biodegradável.

O segundo gênero mais abundante encontrado nas amostras foi *Marinobacter*. Os isolados (2_ESP1, 5_ESP1, 4_ESP1 e 7_ESS2) foram obtidos de *pellets* de polietileno e sacola biodegradável. Este grupo é metabolicamente versátil, encontrado em diferentes regiões como sedimentos de mar profundo, coluna d'água, poços de petróleo e regiões hipersalinas (KAYE; BAROSS, 2000). Como é capaz de utilizar uma ampla gama de substratos de carbono, contribui para a degradação de hidrocarbonetos em áreas contaminadas (KOSTKA et al., 2011; FATHEPURE, 2014).

Bacteroidetes é um grupo bastante diversificado que pode ser encontrado em todo ambiente marinho, desde a superfície até sedimentos de mar profundo (Qin et al., 2010). Compreende a família Flavobacteriaceae e foram obtidos dois isolados em sacola comum e biodegradável (20_SPS1 e 8_ESS2) que apresentaram maior similaridade com o gênero *Zunongwangia*. Este gênero foi isolado em águas profundas de diferentes regiões (QIN et al., 2010; SHAO et al., 2014) com o intuito de se analisar suas propriedades biotecnológicas, uma vez que pode produzir exopolissacarídeos em grande quantidade que podem ser utilizados para biorremediação de ambientes contaminados com óleo e metais pesados (LI et al., 2012; ZHOU et al., 2009).

Bactérias da ordem Rhodobacterales são conhecidas por serem colonizadoras primárias dominantes em superfícies no ambiente marinho, dando início à sucessão ecológica no substrato (JONES et al., 2007; DANG et al., 2008).

Dentro desta ordem a família Rhodobacteraceae caracteriza-se por ser metabolicamente versátil, participando desde processos de fixação de nitrogênio até degradação de hidrocarbonetos (GANESH KUMAR et al., 2014; GAO et al., 2015; TORRALBA et al., 2017). No presente estudo, dois isolados pertencentes a este grupo foram obtidos (1_ESP1 e 6_ESP2) e apresentaram maior similaridade com o gênero *Sulfitobacter*. Igualmente aos anteriores, este gênero é amplamente distribuído no ambiente marinho, tanto em ambientes costeiros quanto em oceano aberto, com papel importante no ciclo do enxofre (IVANOVA et al., 2004).

O gênero *Rhodococcus*, pertencente à família Nocardiaceae do filo Actinobactéria é encontrado em diversos ambientes, apresentando ampla diversidade catabólica e enzimática de importância ambiental e biotecnológica (Li et al., 2012). Devido a isto, podem ser considerados agentes de biodegradação de contaminantes por utilizar diversos tipos de hidrocarbonetos como substrato de carbono (LARKIN; KULAKOV; ALLEN, 2005). Além disso, estudos demonstram que micro-organismos deste gênero possuem a capacidade de degradar polímeros plásticos, como o polietileno, em poucas semanas e utilizá-los como fonte de carbono e energia (ORR; HADAR; SIVAN, 2004; SIVAN; SZANTO; PAVLOV, 2006). Apesar disso, no presente estudo, somente um isolado foi obtido com maior similaridade ao gênero *Rhodococcus* (3_ESP1).

O gênero *Pseudoalteromonas*, da família Pseudoalteromonadaceae, foi isolado de amostras de sacolas comuns (21_SPS1). Este grupo é representado predominantemente por micro-organismos marinhos, aeróbicos e quimiorganotróficos, que, assim como os outros grupos descritos, também tem relação com processos de biodegradação de hidrocarbonetos, sendo isolados de ambientes de mar profundo (GAUTHIER; GAUTHIER; CHRISTEN, 1995; GANESH KUMAR et al., 2014). Este grupo também foi observado em estudo da plastisfera marinha, onde esteve presente apenas nas amostras de plástico estudadas, sem relação com a água adjacente (ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013).

Os isolados 10_ESC, 15_RJC e 16_RJC apresentaram maior similaridade com os gêneros *Bacillus*, *Kocuria* e *Halobacillus*, respectivamente e só foram observados associados às amostras de substrato controle. Embora os três

gêneros estejam associados a processos de biodegradação de hidrocarbonetos e inclusive degradação de plásticos, como é o caso dos gêneros *Bacillus* e *Kocuria* (HARSHVARDHAN; JHA, 2013), não foram encontradas nas amostras de plásticos. A partir disso, pode-se inferir que estes micro-organismos estariam utilizando o substrato apenas como suporte de adesão.

Neste estudo, foi observado que os isolados identificados pertencem a grupos capazes de degradar hidrocarbonetos e possivelmente até polímeros plásticos. No entanto, não se sabe a eficiência de degradação desses micro-organismos em condições semelhantes ao ambiente de mar profundo, como por exemplo, a baixas temperaturas. Além disso, também foram obtidos isolados da associação ao substrato controle (cascalho), sugerindo-se que também estivessem utilizando-o apenas como suporte de adesão.

Com esses dados obtidos, espera-se que os isolados obtidos no presente estudo contribuam para estudos futuros de biodegradação de polímeros plásticos.

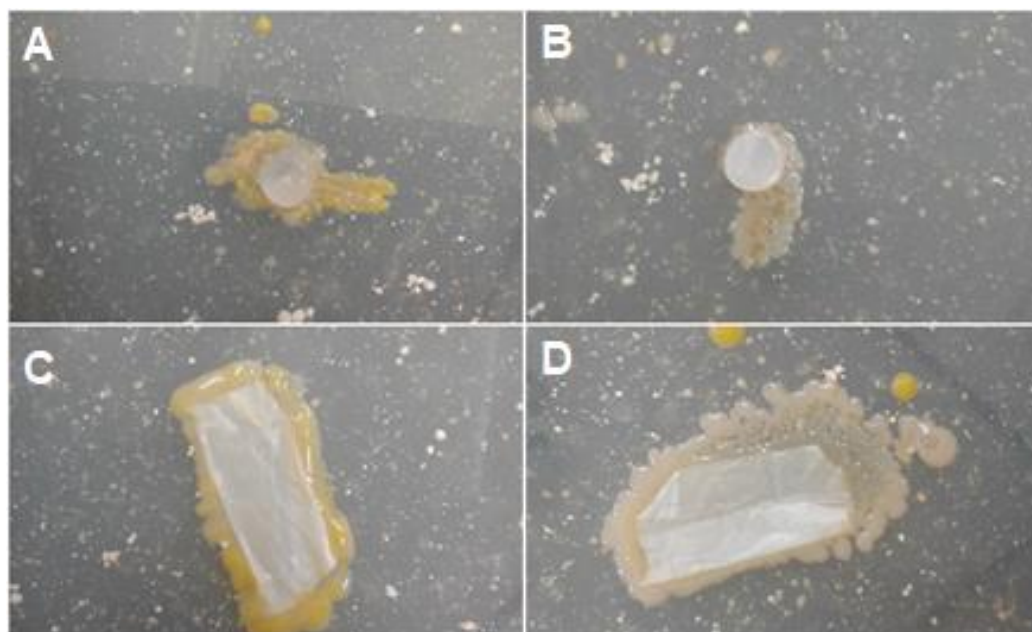


Figura 20: Amostras de polímeros plásticos inoculados em meio de cultura mineral elaborado por Sekiguchi et al. 2010, com crescimento de colônias após 15 dias de incubação a 13°C. A) *Pellet* de polietileno; B) *Pellet* de polipropileno; C) Sacola Comum; D) Sacola biodegradável.

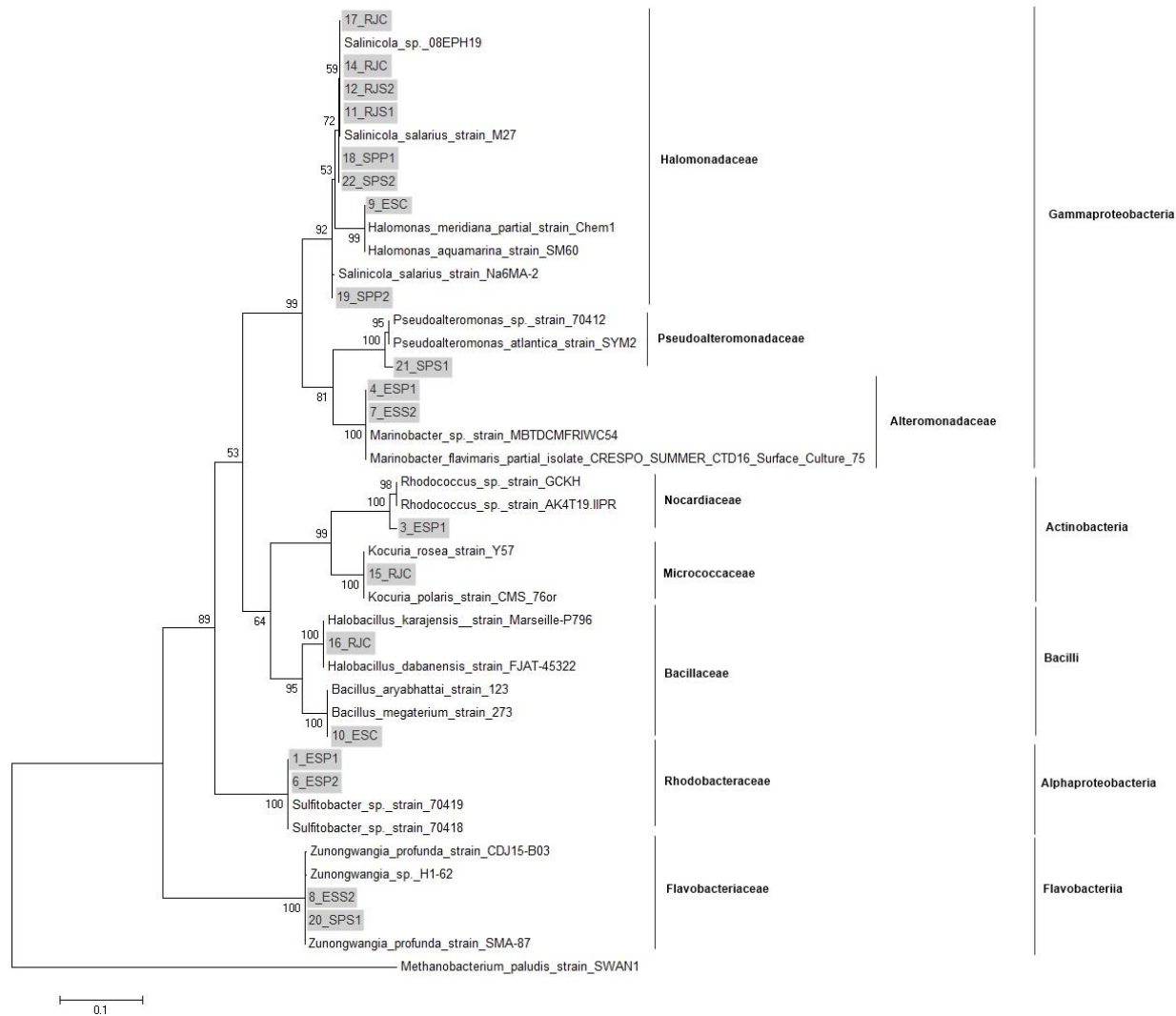


Figura 21: Árvore filogenética baseada no gene RNAr 16S de isolados obtidos de plásticos fundeados a 3300m de profundidade. A árvore foi construída empregando-se o método de “*Maximum-Likelihood*” e fator de correção Kimura 2, com valor de “*bootstrap*” de 1000 repetições.

Tabela 6: Características e classificação taxônômica dos isolados associados a polímeros plásticos em mar profundo.

Amostra	Substrato	Localidade	Cor da Colônia	Formato Celular	GRAM	Filo	Classe	Taxonomia Ordem	Família	Gênero
1			Amarela	Bacilo	-	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Sulfitobacter
2			Branca	Bacilo	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	<i>Pellets</i> de Polietileno		Laranja	Cocos	+	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardiaceae	Rhodococcus
4			Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter
5			amarela	Bacilo	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	<i>Pellets</i> de Polipropileno	Espírito Santo	Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Sulfitobacter
7	Sacola		Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter
8	Biodegradável		Amarela	Bacilo	-	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Zunongwangia
9			Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas
10	Cascalho		Amarela	Cocos	-	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus
11	Sacola Comum		Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
12	Sacola		Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
13	Biodegradável	Rio de Janeiro	Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
14			Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
15			Laranja	Cocos	+	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Kocuria
16	Cascalho		Laranja	Bacilo	+	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Halobacillus
17			Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
18	<i>Pellets</i> de Polietileno		Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
19	<i>Pellets</i> de Polipropileno		Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola
20	Sacola	São Paulo	Amarela	Bacilo	-	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Zunongwangia
21	Comum		amarela	Cocos	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas
22	Sacola Biodegradável		Branca	Bacilo	-	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola

6 CONCLUSÕES

- O tipo de substrato determinou a composição microbiana e abundância taxônomica de Bacteria e Archaea, nos polímeros plásticos fundeados em mar profundo, apresentando diferenças entre as sacolas e cascalhos com os *pellets* e entre os substratos com as amostras de água adjacente, não apresentando diferenças entre si, o que pode ser observado claramente com as análises de beta-diversidade.
- As análises de alfa-diversidade mostraram que a maioria das amostras apresentou elevada diversidade e riqueza, contudo com diferenças entre os substratos plásticos (principalmente sacolas) e a coluna d'água.
- As comunidades do domínio Bacteria foram dominadas por organismos colonizadores primários, como representantes das classes Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Bacteroidetes, diferenciando as amostras segundo a abundância de cada grupo, sugerindo uma inclinação para determinado tipo de substrato, possivelmente devido a sua composição química, superfície e/ou nutrientes disponíveis.
- Este trabalho é um dos únicos que leva em consideração as sequências do domínio Archaea, presentes nas amostras de plásticos. O filo Thaumarchaeota foi predominante nas amostras estudadas, principalmente a classe Nitrosopumilaceae. A OTU21 esteve presente em somente nas amostras de água adjacente, enquanto que se observou a presença da OTU10 nos substratos sólidos e não na coluna d'água. Já a OTU38, classificada como Nanoarchaeota foi predominante nas amostras de sacola comum.
- Através das imagens de microscopia eletrônica de varredura pode-se confirmar os baixos valores da quantificação de DNA total das amostras. As imagens mostram poucas células aderidas, sem a formação de um

biofilme mais complexo, dificultando o trabalho de extração de DNA e consequentemente de sequenciamento do gene RNAr 16S.

- Foi possível observar apenas um indicio de uma provável degradação de um *pellet* de polipropileno. Na imagem há uma célula microbiana aderida a uma cavidade circular. Contudo, não se pode afirmar com certeza de que aquela célula teria degradado e assimilado em seu metabolismo a fonte de carbono proveniente deste substrato plástico.
- Os isolados associados aos plásticos apresentaram grupos de bactérias anteriormente relacionados a degradação de hidrocarbonetos. Foram realizados testes para confirmar algum indicio de degradação, contudo, não houve resultado significativo para o experimento realizado neste trabalho.
- Não foi observada a influência de fatores ambientais, provavelmente pelo fato de que a região de mar profundo possui condições ambientais constantes. Além disso, todos os *landers* utilizados neste estudo estavam sob a influência das mesmas massas d'água (ACI e APAN), consequentemente sob as mesmas condições físico químicas, as quais podem ter dispersados os microrganismos, contribuindo para o estabelecimento de comunidades semelhantes entre os substratos nos diferentes sítios de fundeio.
- Dessa maneira, o presente trabalho contribui para o conhecimento da plastisfera marinha no Oceano Atlântico Sudoeste, sendo pioneiro em fornecer informações sobre a comunidade procariótica associada a plásticos, reforçando o argumento de que embora possa ocorrer biodegradação dos plásticos nos oceanos, esses resíduos podem chegar a grandes profundidades, onde as condições ambientais constantes e extremas contribuem para a dificuldade da degradação física e biológica.

REFERENCIAS*

- ALAIN, K.; ZBINDEN, M.; BRIS, N. Le. Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 227–241, 2004.
- ALEKSIC, S.; BOCKEMUHL, J. Microbiology and epidemiology of *Halomonas* species. **Future Microbiol.**, v. 18, n. 6, p. 178–185, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2076900>.
- ALMADA, G. V. de M. B.; BERNARDINO, A. F. Conservation of deep-sea ecosystems within offshore oil fields on the Brazilian margin, SW Atlantic. **Biological Conservation**, v. 206, p. 92–101, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2016.12.026>>.
- ALVES JUNIOR, N.; MEIRELLES, P. M.; DE OLIVEIRA SANTOS, E.; DUTILH, B.; SILVA, G. G. Z.; PARANHOS, R.; CABRAL, A. S.; REZENDE, C.; IIDA, T.; DE MOURA, R. L.; KRUGER, R. H.; PEREIRA, R. C.; VALLE, R.; SAWABE, T.; THOMPSON, C.; THOMPSON, F. Microbial community diversity and physical–chemical features of the Southwestern Atlantic Ocean. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 2, p. 165–179, 2014.
- AMARAL-ZETTLER, L. A.; ZETTLER, E. R.; SLIKAS, B.; BOYD, G. D.; MELVIN, D. W.; MORRALL, C. E.; PROSKUROWSKI, G.; MINCER, T. J. The biogeography of the Plastisphere: Implications for policy. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 13, n. 10, p. 541–546, 2015.
- ANAN'INA, L. N.; PLOTNIKOVA, E. G.; GAVRISH, E. Y.; DEMA KOV, V. a; EVTUSHENKO, L. I. *Salinicola socius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a naphthalene-utilizing microbial association. **Mikrobiologiy**, v. 76, n. 3, p. 324–330, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1134/S0026261707030095>>.
- ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 8, p. 1596–1605, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>>.
- ARKATKAR, A.; JUWARKAR, A. A.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V.; DOBLE, M. Growth of *Pseudomonas* and *Bacillus* biofilms on pretreated polypropylene surface. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, n. 6, p. 530–536, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.002>>.
- ARUTCHELVI, J.; SUDHAKAR, M.; ARKATKAR, A.; DOBLE, M.; BHADURI, S.; UPPARA, P. V. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 9–22, 2008.
- AUSTIN, H. P.; ALLEN, M. D.; DONOHOE, B. S.; RORRER, N. A.; KEARNS, F. L.; SILVEIRA, R. L.; POLLARD, B. C.; DOMINICK, G.; DUMAN, R.; EL OMARI, K.; MYKHAYLYK, V.; WAGNER, A.; MICHENER, W. E.; AMORE, A.; SKAF, M. S.; CROWLEY, M. F.; THORNE, A. W.; JOHNSON, C. W.; WOODCOCK, H. L.; MCGEEHAN, J. E.; BECKHAM, G. T. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyestherase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201718804, 2018. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1718804115>>.

BARNES, D. K. A.; GALGANI, F.; THOMPSON, R. C.; BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. p. 1985–1998, 2009.

BAYER, B.; VOJVODA, J.; OFFRE, P.; ALVES, R. J. E.; ELISABETH, N. H.; GARCIA, J. A. L.; VOLLAND, J. M.; SRIVASTAVA, A.; SCHLEPER, C.; HERNDL, G. J. Physiological and genomic characterization of two novel marine thaumarchaeal strains indicates niche differentiation. **ISME Journal**, v. 10, n. 5, p. 1051–1063, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.200>>.

BENGTSSON, M. M.; ØVREÅS, L. Planctomycetes dominate biofilms on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.

BERGO, N. M.; SIGNORI, C. N.; AMADO, A. M.; BRANDINI, F. P.; PELLIZARI, V. H. The Partitioning of Carbon Biomass among the Pico- and Nano-plankton Community in the South Brazilian Bight during a Strong Summer Intrusion of South Atlantic Central Water. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, n. July, p. 1–12, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmars.2017.00238/full>>.

BERNARDINO, A. F.; BERENQUER, V.; RIBEIRO-FERREIRA, V. P. Deep-Sea Research I Bathymetric and regional changes in benthic macrofaunal assemblages on the deep Eastern Brazilian margin, SW Atlantic. **Deep-Sea Research Part I**, v. 111, p. 110–120, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr.2016.02.016>>.

BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 575–579, 2013.

BIENHOLD, CHRISTINA; RISTOVA, PETRA POP; WENZHÖFER FRANK; DITTMAR, T.; BOETIUS, A. How Deep-Sea Wood Falls Sustain Chemosynthetic Life. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 10–15, 2013.

BRYANT, J. A.; CLEMENTE, T. M.; VIVIANI, D. A.; FONG, A. A.; THOMAS, K. A.; KEMP, P.; KARL, D. M.; WHITE, A. E.; DELONG, E. F. Diversity and Activity of Communities Inhabiting Plastic Debris in the North Pacific Gyre. **mSystems**, v. 1, n. 3, p. e00024-16, 28 jun. 2016. Disponível em: <<http://msystems.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSystems.00024-16>>.

CALVO, C.; MARTÍNEZ-CHECA, F.; TOLEDO, F.; PORCEL, J.; QUESADA, E. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 347–351, 2003.

CAMERON, T. J.; TEMPERTON, B.; SWAN, B. K.; LANDRY, Z. C.; WOYKE, T.; DELONG, E. F.; STEPANAUSKAS, R.; GIOVANNONI, S. J. Single-cell enabled comparative genomics of a deep ocean SAR11 bathytype. **ISME Journal**, v. 8, n. 7, p. 1440–1451, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.243>>.

CAO, Y.; CHASTAIN, R. A.; ELOE, E. A.; NOGI, Y.; KATO, C.; BARTLETTA, D.

H. Novel psychropiezophilic oceanospirillales species profundimonas piezophila gen. nov., sp. nov., isolated from the deep-sea environment of the puerto rico trench. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 54–60, 2014.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PEÑA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I.; HUTTLEY, G. A.; KELLEY, S. T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J. E.; LEY, R. E.; LOZUPONE, C. A.; MCDONALD, D.; MUEGGE, B. D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J. R.; TURNBAUGH, P. J.; WALTERS, W. A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. correspondEnce QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth0510-335>>.

CARPENTER, E. J.; SMITH, K. L. Plastics on the Sargasso Sea Surface. **Sciences**, v. 175, n. 4027, p. 1240–1241, 1972.

CARPENTER, E. J.; SUSAN, P. M.; PECK, B. B. Polystyrene Spherules in Coastal Waters. **Science**, v. 178, n. NOVEMBER, p. 0–1, 1972.

CARSON, H. S.; NERHEIM, M. S.; CARROLL, K. a; ERIKSEN, M. The plastic-associated microorganisms of the North Pacific Gyre. **Marine pollution bulletin**, v. 75, n. 1–2, p. 126–32, 15 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993070>>. Acesso em: 13 out. 2014.

CASTELLE, C. J.; BANFIELD, J. F. Major New Microbial Groups Expand Diversity and Alter our Understanding of the Tree of Life. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1181–1197, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.016>>.

CHIBA, S.; SAITO, H.; FLETCHER, R.; YOGI, T.; KAYO, M.; MIYAGI, S.; OGIDO, M.; FUJIKURA, K. Human footprint in the abyss: 30 year records of deep-sea plastic debris. **Marine Policy**, n. March, p. 0–1, 2018. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308597X17305195>>.

CHITSAZ, H.; YEE-GREENBAUM, J. L.; TESLER, G.; LOMBARDO, M. J.; DUPONT, C. L.; BADGER, J. H.; NOVOTNY, M.; RUSCH, D. B.; FRASER, L. J.; GORMLEY, N. A.; SCHULZ-TRIEGLAFF, O.; SMITH, G. P.; EVERS, D. J.; PEVZNER, P. A.; LASKEN, R. S. Efficient de novo assembly of single-cell bacterial genomes from short-read data sets. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 915–922, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1966>>.

COLE, M.; LINDEQUE, P.; HALSBAND, C.; GALLOWAY, T. S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2588–2597, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>>.

COSTERTON, J. W.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

CÓZAR, A.; ECHEVARRÍA, F.; GONZÁLEZ-GORDILLO, J. I.; IRIGOIEN, X.; UBEDA, B.; HERNÁNDEZ-LEÓN, S.; PALMA, A. T.; NAVARRO, S.; GARCÍA-DE-LOMAS, J.; RUIZ, A.; FERNÁNDEZ-DE-PUELLES, M. L.; DUARTE, C. M. Plastic debris in the open ocean. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 111, p. 10239–10244, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24982135>>.

DANG, H.; LI, T.; CHEN, M.; HUANG, G. Cross-Ocean Distribution of Rhodobacterales Bacteria as Primary Surface Colonizers in Temperate Coastal Marine Waters □ †. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 1, p. 52–60, 2008.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified RNAr Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S RNAr Genes. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 66, n. 2, p. 467–475, 2000a.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified RNAr Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S RNAr Genes Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Wa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 467–475, 2000b.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 91–138, 2016.

DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S.; DAS, S. Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 561–571, 2013.

DE TENDER, C. A.; DEVRIESE, L. I.; HAEGEMAN, A.; MAES, S.; RUTTINK, T.; DAWYNDT, P. Bacterial Community Profiling of Plastic Litter in the Belgian Part of the North Sea. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 16, p. 9629–9638, 18 ago. 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b01093>>.

DEBELJAK, P.; PINTO, M.; PROIETTI, M.; REISSER, J.; FERRARI, F. F.; ABBAS, B.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; SLAT, B.; HERNDL, G. J. Extracting DNA from ocean microplastics: a method comparison study. **Anal. Methods**, v. 9, n. 9, p. 1521–1526, 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY03119F>>.

DEMPSEY, M. J. Marine Bacterial Fouling: A Scanning Electron Microscope Study. v. 315, 1981.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p. 842–852, 2002.

DIDIER, D.; ANNE, M.; ALEXANDRA, T. H. Plastics in the North Atlantic garbage patch: A boat-microbe for hitchhikers and plastic degraders. **Science of The Total Environment**, v. 599–600, p. 1222–1232, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717311579>>.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DUHAIME, M. B.; WICHELS, A.; SULLIVAN, B. Six Pseudoalteromonas Strains Isolated from Surface Waters of Kanbeltonne, Offshore Helgoland, North Sea. v.

4, n. 1, p. 4–5, 2016.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–16, 2014.

FRANZMANN, P. D.; WEHMEYER, U.; STACKEBRANDT, E. Halomonadaceae fam. nov., a New Family of the Class Proteobacteria to Accommodate the Genera Halomonas and Deleya. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 16–19, 1988. Disponible em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202088800432>>.

FUHRMAN, J. a.; CRAM, J. a.; NEEDHAM, D. M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 133–146, 2015. Disponible em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3417>>.

GANESH KUMAR, A.; VIJAYAKUMAR, L.; JOSHI, G.; MAGESH PETER, D.; DHARANI, G.; KIRUBAGARAN, R. Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 556–564, 2014. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.008>>.

GAO, X.; GAO, W.; CUI, Z.; HAN, B.; YANG, P.; SUN, C.; ZHENG, L. Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. **Marine Pollution Bulletin**, v. 97, n. 1–2, p. 373–380, 2015. Disponible em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.065>>.

GAUTHIER, G.; GAUTHIER, M.; CHRISTEN, R. Phylogenetic analysis of the genera Alteromonas, Shewanella, and Moritella using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus Alteromonas into two genera, Alteromonas (emended) and Pseudoalteromonas gen. nov., and proposal of tw. **International journal of systematic bacteriology**, v. 45, n. 32, p. 755–761, 1995.

GIOVANNONI, S. J.; VERGIN, K. L. Seasonality in Ocean Microbial Communities. v. 335, n. February, p. 671–677, 2012.

GOFFREDI, S. K.; ORPHAN, V. J.; ROUSE, G. W.; JAHNKE, L.; EMBAYE, T.; TURK, K.; LEE, R.; VRIJENHOEK, R. C. Evolutionary innovation: A bone-eating marine symbiosis. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1369–1378, 2005.

GOLDSTEIN, M. C.; CARSON, H. S.; ERIKSEN, M. Relationship of diversity and habitat area in North Pacific plastic-associated rafting communities. **Marine Biology**, 2014.

GONZALEZ-SILVERA, A.; SANTAMARIA-DEL-ANGEL, E.; GARCIA, V. M. T.; GARCIA, C. A. E.; MILLÁN-NUÑEZ, R.; MULLER-KARGER, F. Biogeographical

regions of the tropical and subtropical Atlantic Ocean off South America: Classification based on pigment (CZCS) and chlorophyll-a (SeaWiFS) variability. **Continental Shelf Research**, v. 24, n. 9, p. 983–1000, 2004.

GROSS, R. A.; KALRA, B. Biodegradable Polymers for the Environment. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 803–807, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/297/5582/803.full>>.

GUEZENNEC, J. Y.; RAGUENES, G.; GEESEY, G. Bacterial colonization of artificial substrate in the vicinity of deep-sea hydrothermal vents. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 89–99, 1998.

GULMANN, L. K.; BEAULIEU, S. E.; SHANK, T. M.; DING, K.; SEYFRIED, W. E.; SIEVERT, S. M. Bacterial diversity and successional patterns during biofilm formation on freshly exposed basalt surfaces at diffuse-flow deep-sea vents. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. SEP, p. 1–16, 2015.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews Microbiology**, v. 2, n. February, p. 95–108, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040259>>.

HALL, T.; BIOSCIENCES, I.; CARLSBAD, C. BioEdit: An important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. June, p. 60–61, 2011.

HARSHVARDHAN, K.; JHA, B. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. **Marine pollution bulletin**, v. 77, n. 1–2, p. 100–6, 15 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24210946>>. Acesso em: 18 set. 2014.

HAZEN, T. C.; DUBINSKY, E. A.; DESANTIS, T. Z.; ANDERSEN, G. L.; PICENO, Y. M.; SINGH, N.; JANSSON, J. K.; PROBST, A.; BORGLIN, S. E.; FORTNEY, J. L.; STRINGFELLOW, W. T.; BILL, M.; CONRAD, M. E.; TOM, L. M.; CHAVARRIA, K. L.; ALUSI, T. R.; LAMENDELLA, R.; JOYNER, D. C.; SPIER, C.; BAEUM, J.; AUER, M.; ZEMLA, M. L.; CHAKRABORTY, R.; SONNENTHAL, E. L.; D'HAESELEER, P.; HOLMAN, H.-Y. N.; OSMAN, S.; LU, Z.; VAN NOSTRAND, J. D.; DENG, Y.; ZHOU, J.; MASON, O. U. Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. **Science**, v. 330, n. 2010, p. 204–208, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1195979>>.

HUBER, H.; HOHN, M. J.; STETTER, K. O.; RACHEL, R. The phylum Nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 165–171, 2003.

HUO, Y. Y.; MENG, F. X.; XU, L.; WANG, C. S.; XU, X. W. *Salinicola peritrichatus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 104, n. 1, p. 55–62, 2013.

IVANOVA, E. P.; GORSHKOVA, N. M.; SAWABE, T.; ZHUKOVA, N. V.; HAYASHI, K.; KURINLENKO, V.; ALEXEEVA, Y.; BULJAN, V.; NICOLAU, D. V.; MIKHAILOV, V. V.; CHRISTEN, R. *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster equestris*)

and sea grass (*Zostera marina*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 475–480, 2004.

IVANOVA, E. P.; ROMANENKO, L. A.; CHUN, J.; MATTE, M. H.; MATTE, G. R.; MIKHAILOV, V. V.; SVETASHEV, V. I.; HUQ, A.; MAUGEL, T.; COLWELL, R. R. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 901–907, 2000.

JAMBECK, J. R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–771, 13 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1260352>>.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. April, p. 163–173, 2004.

JENKINS, C.; KEDAR, V.; FUERST, J. A. Gene discovery within the planctomycete division of the domain Bacteria using sequence tags from genomic DNA libraries. **Genome Biol**, v. 3, n. 6, p. RESEARCH0031, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12093378>.

JONES, P. R.; COTTRELL, M. T.; KIRCHMAN, D. L.; DEXTER, S. C. Bacterial Community Structure of Biofilms on Artificial Surfaces in an Estuary. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 153–162, 2007.

JØRGENSEN, B. B.; BOETIUS, A. Feast and famine — microbial life in the deep-sea bed. v. 5, 2007.

KARLSSON, S.; ALBERTSSON, A. C. Biodegradable polymers and environmental interaction. **Polymer Engineering and Science**, v. 38, n. 8, p. 1251–1253, 1998.

KAYE, J. Z.; BAROSS, J. A. High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 3, p. 249–260, 2000.

KERSHAW, P. J. & LESLIE, H. (Eds. . Sources, fate & effects of micro-plastics in the marine environment - a global assessment. p. 1–45, 2012.

KERTESZ, M. A.; KAWASAKI, A.; STOLZ, A. Aerobic Hydrocarbon-Degrading Alphaproteobacteria : Sphingomonadales. p. 1–21, 2018.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KING, G. M.; KOSTKA, J. E.; HAZEN, T. C.; SOBECKY, P. A. Microbial Responses to the Deepwater Horizon Oil Spill : From Coastal Wetlands to the Deep Sea. 2015.

KOSTKA, J. E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W. A.; GREEN, S. J.; FREYER, G.;

CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T. C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7962–7974, 2011.

KRUEGER, M. C.; HARMS, H.; SCHLOSSER, D. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 21, p. 8857–8874, 30 nov. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6879-4>>.

KUBOWICZ, S.; BOOTH, A. M. Biodegradability of Plastics: Challenges and Misconceptions. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 21, p. 12058–12060, 7 nov. 2017. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.7b04051>>.

LARA, E.; HOLMFELDT, K.; SOLONENKO, N.; SÀ, E. L.; IGNACIO-ESPINOZA, J. C.; CORNEJO-CASTILLO, F. M.; VERBERKMOES, N. C.; VAQUÉ, D.; SULLIVAN, M. B.; ACINAS, S. G. Life-style and genome structure of marine Pseudoalteromonas siphovirus B8b isolated from the northwestern Mediterranean Sea. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, p. 1–26, 2015.

LARKIN, M. J.; KULAKOV, L. A.; ALLEN, C. C. R. Biodegradation and Rhodococcus - Masters of catabolic versatility. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 3 SPEC. ISS., p. 282–290, 2005.

LAURO, F. M.; BARTLETT, D. H. Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. **Extremophiles**, v. 12, n. 1, p. 15–25, 17 jan. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00792-006-0059-5>>.

LEARY, D. H.; LI, R. W.; HAMDAN, L. J.; HERVEY, W. J.; LEBEDEV, N.; WANG, Z.; DESCHAMPS, J. R.; KUSTERBECK, A. W.; VORA, G. J. Integrated metagenomic and metaproteomic analyses of marine biofilm communities. **Biofouling**, v. 30, n. 10, p. 1211–1223, 2014.

LEE, J. W.; NAM, J. H.; KIM, Y. H.; LEE, K. H.; LEE, D. H. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 174–182, 2008.

LI, H.; ZHANG, Q.; WANG, X. L.; MA, X. Y.; LIN, K. F.; LIU, Y. D.; GU, J. D.; LU, S. G.; SHI, L.; LU, Q.; SHEN, T. T. Biodegradation of benzene homologues in contaminated sediment of the East China Sea. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 129–136, 2012.

LOBELLE, D.; CUNLIFFE, M. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 1, p. 197–200, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093883>>. Acesso em: 28 jul. 2012.

LOZUPONE, C.; LLADSER, M. E.; KNIGHTS, D.; STOMBAUGH, J.; KNIGHT, R. UniFrac : an effective distance metric for microbial community comparison. **The ISME Journal**, v. 5, n. 2, p. 169–172, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2010.133>>.

MAXIMENKO, N.; HAFNER, J.; NIILER, P. Pathways of marine debris derived from trajectories of Lagrangian drifters. **Marine pollution bulletin**, v. 65, n. 1–3, p. 51–62, jan. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21696778>>. Acesso em: 26 set. 2012.

MCCLAIN, C. R.; SIGNORINI, S. R.; CHRISTIAN, J. R. Subtropical gyre variability observed by ocean-color satellites. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 51, n. 1–3, p. 281–301, 2004.

MINCER, T. J.; ERICK R. ZETTLER; AMARAL-ZETTLER, L. A. Biofilms on Plastic Debris and Their Influence on Marine Nutrient Cycling, Productivity, and Hazardous Chemical Mobility. **Hdb Env Chem**, n. October, p. 41–53, 2016.

MUKHERJEE, S.; CHATTERJEE, S. Original Research Article A comparative study of commercially available plastic carry bag biodegradation by microorganisms isolated from hydrocarbon effluent enriched soil. v. 3, n. 5, p. 318–325, 2014.

NAUENDORF, A.; KRAUSE, S.; BIGALKE, N. K.; GORB, E. V.; GORB, S. N.; HAECKEL, M.; WAHL, M.; TREUDE, T. Microbial colonization and degradation of polyethylene and biodegradable plastic bags in temperate fine-grained organic-rich marine sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 103, n. 1–2, p. 168–178, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.024>>.

O'BRINE, T.; THOMPSON, R. C. Degradation of plastic carrier bags in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 12, p. 2279–2283, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.08.005>>.

OBERBECKMANN, S.; KREIKEMEYER, B.; LABRENZ, M. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. January, p. 2709, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02709/abstract>>.

OBERBECKMANN, S.; LOEDER, M. G. J.; GERDTS, G.; MARK OSBORN, a. Spatial and seasonal variation in diversity and structure of microbial biofilms on marine plastics in Northern European waters. **FEMS microbiology ecology**, v. 49, n. 0, p. 478–492, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25109340>>.

OBERBECKMANN, S.; OSBORN, A. M.; DUHAIME, M. B. Microbes on a Bottle : Substrate , Season and Geography Influence Community Composition of Microbes Colonizing Marine Plastic Debris. **Plos One**, p. 1–24, 2016.

ORCUTT, B. N.; SYLVAN, J. B.; KNAB, N. J.; EDWARDS, K. J. Microbial Ecology of the Dark Ocean above , at , and below the Seafloor. v. 75, n. 2, p. 361–422, 2011.

ORR, I. G.; HADAR, Y.; SIVAN, A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 65, p. 97–104, 2004.

OSBORN, A. M.; STOJKOVIC, S. Marine microbes in the Plastic Age. **Microbiology Australia**, p. 7–10, 2014.

PACE, N. R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. v. 276, n. May, 1997.

PAÇO, A.; DUARTE, K.; DA COSTA, J. P.; SANTOS, P. S. M.; PEREIRA, R.;

PEREIRA, M. E.; FREITAS, A. C.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 10–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.017>>.

PAULSON, JOSEPH N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. **Nature methods**, v. 10, n. 12, p. 1200, 2013.

PETERS, K.; FLAHERTY, T. Marine Debris in Gulf Saint Vincent Bioregion. **Report for the Adelaide and Mount Lofty Natural Resources and Management Board**, n. October, 2011.

PRIETO, A. To be , or not to be biodegradable . . . that is the question for the bio-based plastics. n. 633962, 2016.

QIN, Q.-L.; ZHANG, X.-Y.; WANG, X.-M.; LIU, G.-M.; CHEN, X.-L.; XIE, B.-B.; DANG, H.-Y.; ZHOU, B.-C.; YU, J.; ZHANG, Y.-Z. The complete genome of *Zunongwangia profunda* SM-A87 reveals its adaptation to the deep-sea environment and ecological role in sedimentary organic nitrogen degradation. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 247, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2864250&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-247>>.

R Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/2011>.

RAMIREZ-LLODRA, E.; TYLER, P. A.; BAKER, M. C.; BERGSTAD, O. A.; CLARK, M. R.; LEVIN, L. A.; MENOT, L.; ROWDEN, A. A.; SMITH, C. R.; DOVER, C. L. Van. Man and the Last Great Wilderness : Human Impact on the Deep Sea. v. 6, n. 7, 2011.

REISSER, J.; SHAW, J.; HALLEGRAEFF, G.; PROIETTI, M.; BARNES, D. K. a; THUMS, M.; WILCOX, C.; HARDESTY, B. D.; PATTIARATCHI, C. Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100289, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4062529&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 out. 2014.

RIBEIRO, C. G.; MARIE, D.; DOS SANTOS, A. L.; BRANDINI, F. P.; VAULOT, D. Estimating microbial populations by flow cytometry: Comparison between instruments. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 14, n. 11, p. 750–758, 2016.

RIOS, L. M.; MOORE, C.; JONES, P. R. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. **Marine pollution bulletin**, v. 54, n. 8, p. 1230–7, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17532349>>. Acesso em: 7 ago. 2012.

SALAZAR, G.; CORNEJO-CASTILLO, F. M.; BENÍTEZ-BARRIOS, V.; FRAILE-NUEZ, E.; ÁLVAREZ-SALGADO, X. A.; DUARTE, C. M.; GASOL, J. M.; ACINAS, S. G. Global diversity and biogeography of deep-sea pelagic prokaryotes. **ISME Journal**, v. 10, n. 3, p. 596–608, 2016.

SANGALE, M. K.; SHAHNAWAZ, M.; ADE, A. B. A Review on Biodegradation of Polythene : The Microbial Approach. v. 3, n. 10, 2012.

SANLI, K.; BENGTSSON-PALME, J.; HENRIK NILSSON, R.; KRISTIANSOON, E.; ROSENBLAD, M. A.; BLANCK, H.; ERIKSSON, K. M. Metagenomic sequencing of marine periphyton: Taxonomic and functional insights into biofilm communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–14, 2015.

SEKIGUCHI, T.; SATO, T.; ENOKI, M.; KANEHIRO, H.; KATO, C. Procedure for isolation of the plastic degrading piezophilic bacteria from deep-sea environments. **Journal of Japanese Society for Extremophiles**, v. 9, p. 25–30, 2010a.

SEKIGUCHI, T.; SATO, T.; ENOKI, M.; KANEHIRO, H.; UEMATSU, K.; KATO, C. Isolation and characterization of biodegradable plastic degrading bacteria from deep-sea environments. **JAMSTEC Rep. Res. Dev.**, v. 11, n. September, p. 33–41, 2010b.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 3, p. 246–65, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337047>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

SHAO, R.; LAI, Q.; LIU, X.; SUN, F.; DU, Y.; LI, G.; SHAO, Z. *Zunongwangia atlantica* sp. nov., isolated from deep-sea water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 1, p. 16–20, 2014.

SILVEIRA, I. C. A. da; SCHMIDT, A. C. K.; CAMPOS, E. J. D.; GODOI, S. S. de; IKEDA, Y. A corrente do Brasil ao largo da costa leste brasileira. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 48, n. 2, p. 171–183, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-77392000000200008&lng=pt&tlng=pt>.

SIVAN, A.; SZANTO, M.; PAVLOV, V. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 346–352, 2006.

SMITH, CRAIG R. & BACO, A. R. ECOLOGY OF WHALE FALLS AT THE DEEP-SEA FLOOR. **Oceanography and Marine Biology: an Annual Review**, v. 41, p. 311–354, 2003.

SMITH, S. D. a; RULE, M. J.; HARRISON, M.; DALTON, S. J. Monitoring the sea change: preliminary assessment of the conservation value of nearshore reefs, and existing impacts, in a high-growth, coastal region of subtropical eastern Australia. **Marine pollution bulletin**, v. 56, n. 3, p. 525–34, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191421>>. Acesso em: 30 jul. 2012.

SOLÉ, R.; FONTICH, E.; VIDIELLA, B.; DURAN-NEBREDA, S.; MONTANEZ, R.; PINERO, J.; VALVERDE, S. The Paradox Of Constant Oceanic Plastic Debris: Evidence For Evolved Microbial Biodegradation? **Doi.Org**, n. Law 2010, p. 135582, 2017. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/05/09/135582?%3Fcollection>>.

SPRING, S.; SCHEUNER, C.; GÖKER, M.; KLENK, H. P. A taxonomic

framework for emerging groups of ecologically important marine gammaproteobacteria based on the reconstruction of evolutionary relationships using genome-scale data. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–17, 2015.

STROUS, M.; JHON, A. F.; EVELIEN, H. M. K.; SUSANNE, L.; GERARD, M.; KATINKA, T. van de P.-S.; RICHARD, W.; J. GIJS, K.; MIKE, S. M. J. Missing lithotroph identified as new planctomycete. **Nature**, v. 400, n. July, 1999.

SUDHAKAR, M.; DOBLE, M.; MURTHY, P. S.; VENKATESAN, R. Marine microbe-mediated biodegradation of low- and high-density polyethylenes. v. 61, p. 203–213, 2008.

SUDHAKAR, M.; PRIYADARSHINI, C.; DOBLE, M.; SRIYUTHA MURTHY, P.; VENKATESAN, R. Marine bacteria mediated degradation of nylon 66 and 6. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, n. 3, p. 144–151, 2007.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix - An immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222–227, 2001.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TORRALBA, M. G.; FRANKS, J. S.; GOMEZ, A.; YOOSEPH, S.; NELSON, K. E.; GRIMES, D. J. Effect of Macondo Prospect 252 Oil on Microbiota Associated with Pelagic Sargassum in the Northern Gulf of Mexico. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 1, p. 91–100, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-016-0857-y>>.

TREVORS, J. T. Hypothesized origin of microbial life in a prebiotic gel and the transition to a living biofilm and microbial mats. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 334, n. 4, p. 269–272, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2011.02.010>>.

VAN CAUWENBERGHE, L.; VANREUSEL, A.; MEES, J.; JANSSEN, C. R. Microplastic pollution in deep-sea sediments. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 495–499, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.08.013>>.

WATNICK, P. MINIREVIEW Biofilm , City of Microbes. v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WOODALL, L. C.; SANCHEZ-VIDAL, A.; PATERSON, G. L. J.; COPPOCK, R.; SLEIGHT, V.; CALAFAT, A.; ROGERS, A. D.; NARAYANASWAMY, B. E.; THOMPSON, R. C. The deep sea is a major sink for microplastic debris. **Royal Society Open Science**, v. 1, n. 120317, 2014.

XU, L.; XU, X. W.; MENG, F. X.; HUO, Y. Y.; OREN, A.; YANG, J. Y.; WANG, C. S. *Halomonas zincidurans* sp. nov., a heavy-metaltolerant bacterium isolated from the deep-sea environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 11, p. 4230–4236, 2013.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil-degrading

marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 257–266, 2007.

YANG, J.; YANG, Y.; WU, W.; ZHAO, J.; JIANG, L. Evidence of Polyethylene Biodegradation by Bacterial Strains from the Guts of Plastic-Eating Waxworms. 2014.

YE, S.; ANDRADY, A. L. Fouling of Floating Plastic Debris Under Biscayne Bay Exposure Conditions. **Marine pollution bulletin**, v. 22, n. 12, 1991.

YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; TAKEHANA, T.; TANIGUCHI, I.; YAMAJI, H.; MAEDA, Y.; TOYOHARA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 11 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aad6359>>.

ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J.; AMARAL-ZETTLER, L. A. Life in the “Plastisphere”: Microbial Communities on Plastic Marine Debris. 2013.

ZHAO, S.; DANLEY, M.; WARD, J. E.; LI, D.; MINCER, T. J. An approach for extraction, characterization and quantitation of microplastic in natural marine snow using Raman microscopy. **Anal. Methods**, v. 9, n. 9, p. 1470–1478, 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY02302A>>.

ZHOU, W.; WANG, J.; SHEN, B.; HOU, W.; ZHANG, Y. Biosorption of copper(II) and cadmium(II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 2, p. 295–302, 2009.

APENDICE

APENDICE A – Classificação taxônomica das 194 OTUs que compoem o microbioma central da plastisfera de mar profundo.

OTU	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
OTU21	Thaumarchaeota	Marine GroupI	-	-	-	-
OTU87	Thaumarchaeota	Marine GroupI	-	-	Candidatus Nitrosopumilus	-
OTU10	Thaumarchaeota	Marine GroupI	-	-	Candidatus Nitrosopumilus	-
OTU1631	Thaumarchaeota	Marine GroupI	-	-	Candidatus Nitrosopumilus	-
OTU627	Acidobacteria	Holophagae	Acanthopleuribacterales	Acanthopleuribacteraceae	Acanthopleuribacter	-
OTU445	Acidobacteria	Holophagae	-	-	-	-
OTU491	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	OM1	-	-
OTU119	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	OM1	Candidatus Actinomarina	-
OTU443	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	OM1	-	-
OTU120	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	-	-	-
OTU18	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	-	-	-
OTU49	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	-	-	-
OTU97	Actinobacteria	Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	-	-	-
OTU157	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Corynebacterium	-
OTU56	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	Lawsonella	-
OTU17	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Micrococcus	-
OTU599	Actinobacteria	Actinobacteria	Micrococcales	Micrococcaceae	Nesterenkonia	-
OTU309	Actinobacteria	Rubrobacteria	Rubrobacterales	Rubrobacteriaceae	Rubrobacter	-
OTU1227	Atribacteria	-	-	-	-	-
OTU177	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	Fabibacter	-
OTU25	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	Fulvivirga	-
OTU77	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Flammeovirgaceae	Reichenbachiella-	-
OTU159	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorphaceae	Crocinitomix	-

OTU82	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Cryomorpaceae	Owenweeksiasp.	-
OTU35	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Aquibacter	-
OTU349	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Cloacibacterium	-
OTU185	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	-	-
OTU98	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	-	-
OTU614	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	-	-	-
OTU93	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Schleiferiaceae	Schleiferia	-
OTU62	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	Lewinella	-
OTU298	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	Portibacter	-
OTU412	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Saprospiraceae	-	-
OTU92	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	-	-	-
OTU650	Chloroflexi	S085	-	-	-	-
OTU70	Chloroflexi	SAR202	-	-	-	-
OTU903	Cyanobacteria	Cyanobacteria	-	-	Prochlorococcus	-
OTU84	Deinococcus	Deinococci	Thermales	Thermaceae	Meiothermus	-
OTU71	Fibrobacteres	Chitinivibrionia	-	-	Desulfobulbus	-
OTU60	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Anoxybacillus	-
OTU269	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	-	-
OTU1183	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	-
OTU4	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	-
OTU27	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillusaryabhatai
OTU147	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacilluscoagulans
OTU63	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Bacillus	Bacillushalodurans
OTU48	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Caldalkalibacillus	-
OTU96	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Caldalkalibacillus	-
OTU475	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Fictibacillus	-
OTU161	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Geobacillus	-
OTU16	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Family XII	Exiguobacterium	-
OTU378	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	-	-

OTU235	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Planomicrobium	-
OTU322	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Sporolactobacillaceae	-	-
OTU22	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	Staphylococcus aureus
OTU42	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	Lactobacillus crispatus
OTU51	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	-
OTU158	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Streptococcus salivarius
OTU1005	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae1	Uncultured	-
OTU167	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family XI	Finegoldia	-
OTU421	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Peptostreptococcaceae	Tepidibacter	-
OTU249	Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium	-
OTU647	Marinimicrobia	-	-	-	-	-
OTU32	Marinimicrobia	-	-	-	-	-
OTU129	Peregrinibacteria	-	-	-	-	-
OTU106	Planctomycetes	OM190	-	-	-	-
OTU36	Planctomycetes	OM190	-	-	-	-
OTU81	Planctomycetes	OM190	-	-	-	-
OTU91	Planctomycetes	Phycisphaerae	CCM11a	-	-	-
OTU1150	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	-	-
OTU23	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteriabacteria	-	-	-
OTU24	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Alphaproteobacteriabacteria	-	-	-
OTU61	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Hyphomonadaceae	Robiginitomaculum	-
OTU416	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	-
OTU138	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloceae	Methylobacterium	-
OTU86	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methyloceae	Methylobacterium	-
OTU148	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	-	-
OTU153	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	OCS116 clade	-	-
OTU46	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	OCS116 clade	Pseudovibriosp.Pseudovibriosp.	-
OTU3	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phylloceae	Pseudahrensia	-
OTU34	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phylloceae	Pseudahrensia	-

OTU55	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phylloceae	Pseudahrensia	-
OTU2014	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phylloceae	Pseudahrensia	-
OTU29	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Phylloceae	Pseudahrensia	-
OTU510	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	Rhizobiumradiobacter
OTU7	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	-	-
OTU383	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Loktanela	-
OTU1311	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-	-
OTU529	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-	-
OTU41	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-	-
OTU59	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Sedimentitalea	-
OTU165	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-	-
OTU244	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	-	-
OTU238	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	AEGEAN-169	-
OTU247	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	AEGEAN-169	-
OTU978	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	-	-
OTU13	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Mitochondria	Acremonium	Acremoniumchrysogenum
OTU114	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	-	-	-
OTU284	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	SAR116	-	-
OTU624	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	SAR116	-	-
OTU20	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11	-	-	-
OTU68	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11	-	-	-
OTU50	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11	-	-	-
OTU131	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	SAR11	-	-	-
OTU1075	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	-
OTU253	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingomonas	-
OTU266	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	-	-	-	-
OTU79	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	-
OTU384	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	-
OTU1276	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Burkholderiales	-	-	-

OTU999	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	-	-
OTU89	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Delftia	-
OTU230	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Tepidimonas	-
OTU144	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Hydrogenophilales	Hydrogenophilaceae	Tepidiphilus	-
OTU280	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria	-
OTU328	Proteobacteria	BetaProteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Uncultured	-
OTU221	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	OM27clade-	-
OTU1617	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfurellales	Desulfurellaceae	Desulfuromonasp.	-
OTU65	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfurellales	Desulfurellaceae	Desulfuromonasp.	-
OTU2620	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	-	-	-
OTU549	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	-	-	-
OTU123	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	Haliangium	-
OTU172	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Haliangiaceae	Haliangium	-
OTU370	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Nannocystaceae	Nannocystis	-
OTU150	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	-	-	-
OTU31	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	-	-	-
OTU53	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	-	-	-
OTU64	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	-	-	-
OTU815	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	-	-	-
OTU170	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	NB1-j	-	-	-
OTU417	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	SAR324	-	-	-
OTU14	Proteobacteria	Deltaproteobacteria	SAR324	-	-	-
OTU254	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	Aeromonas	-
OTU5	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	-	-
OTU28	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Marinobacter	-
OTU429	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Alteromonadaceae	Paraglaciecola	-
OTU108	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	-	-
OTU154	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	Colwellia	-
OTU2060	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	Colwellia	-

OTU47	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Colwelliaceae	Colwellia	-
OTU9	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Idiomarinaceae	Idiomarina	-
OTU8	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	Pseudoalteromonas	-
OTU164	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Pseudoalteromonadaceae	-	-
OTU288	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Alteromonadales	Psychromonadaceae	Psychromonas	-
OTU58	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Arenicellales	Arenicellaceae	Arenicella	-
OTU434	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	BD7-8	-	-	-
OTU11	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	-	Maricurvus nonylphenolicus
OTU33	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Cellvibrionaceae	-	-
OTU194	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Haliaceae	-	-
OTU12	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Haliaceae	Halioglobus	-
OTU3247	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Songiibacteraceae	BD1-7clade	-
OTU808	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Songiibacteraceae	BD1-7clade	-
OTU2	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Songiibacteraceae	BD1-7clade	-
OTU74	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Songiibacteraceae	Dasania	-
OTU1	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Cellvibrionales	Songiibacteraceae	-	-
OTU162	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales,	Enterobacteriaceae,	Enterobacter	-
OTU19	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales,	Enterobacteriaceae,	Escherichia-Shigella	-
OTU619	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	-	-	-	-
OTU95	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	-	-	-	-
OTU15	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	-	-	-	-
OTU6	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	-	-	-	-
OTU40	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Alcanivoracaceae	Alcanivorax	Alcanivoraxdieselolei
OTU54	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Alcanivoracaceae	Kangiella-	-
OTU100	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Alcanivoracaceae	Kangiella	-
OTU76	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Halomonas	-
OTU45	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	Salinicola-	-
OTU39	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Oleispira	-
OTU37	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Pseudohongiella	-

OTU66	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	Reinekea	-
OTU67	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	-	-
OTU72	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	-	-	-
OTU30	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oleiphilaceae	Oleiphilus	-
OTU2268	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Oleiphilaceae	-	-
OTU156	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	OM182	-	-
OTU756	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	OM182	-	-
OTU78	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	OM182	-	-
OTU814	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	SAR86	-	-
OTU485	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	SAR86	-	-
OTU709	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	SAR86	-	-
OTU26	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	-	-	-
OTU102	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pasteurellales	Pasteurellaceae	Haemophilus-	-
OTU113	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	-
OTU124	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	-
OTU139	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	-
OTU228	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Psychrobacter	-
OTU142	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	-
OTU795	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	-
OTU1288	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas citronellolis
OTU609	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	Pseudomonas fluorescens
OTU229	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	-	-	-
OTU616	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	-	-	-
OTU110	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	-
OTU364	Proteobacteria	-	-	-	-	-