

LUCAS SALOMÃO DE SOUSA FERREIRA

**Influência da composição de polímeros plásticos na comunidade microbiana da
plastisfera no ecossistema marinho**

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

2022

LUCAS SALOMÃO DE SOUSA FERREIRA

**Influência da composição de polímeros plásticos na comunidade microbiana da
plastisfera no ecossistema marinho**

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: Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Vivian Helena Pellizari

Versão original

SÃO PAULO

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ferreira, Lucas Salomão de Sousa

Influência da composição de polímeros plásticos na comunidade microbiana da plastisfera no ecossistema marinho / Lucas Salomão de Sousa Ferreira; orientadora Vivian Helena Pellizari. -- São Paulo, 2022.

90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbioma. 2. Biofilmes. 3. Plastisfera. 4. Bactérias Plástico-específicas. 5. Poluição marinha. I. Pellizari, Vivian Helena, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lucas Salomão de Sousa Ferreira

Título da Dissertação: Influência da composição de polímeros plásticos na comunidade microbiana da plastisfera no ecossistema marinho.

Orientador(a): Prof.(a) Dr(a) Vivian Helena Pellizari

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação, em sessão pública

realizada a /...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

Comissão de ética



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1106/2020** referente ao projeto intitulado: **"Influência da composição de polímeros plásticos na comunidade microbiana da plastisfera no ecossistema marinho"**, sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **Lucas Salomão de Sousa Ferreira**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Vivian Helena Pellizari**, do Departamento de Oceanografia Biológica - IO USP, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 28 de maio de 2020.

Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEP SH ICB/USP

À minha família,
principalmente à
minha avó dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao longo de dois anos e alguns meses de mestrado obtive aprendizados que irei carregar para a vida acadêmica, profissional e pessoal. Para que isso fosse possível, o apoio pessoal e institucional foi essencial, os quais eu gostaria de agradecer:

Primeiramente à minha avó, Leonélia Alves Ferreira, por ter me criado, ensinado, guiando e ter sido o meu apoio emocional mesmo de longe. Seguida de toda a minha família. Sempre foi por vocês.

À Universidade de São Paulo (USP), ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) e ao Instituto Oceanográfico (IO) pela infraestrutura, acolhimento e direção da pós-graduação.

À minha orientadora dra. Vivian Helena Pellizari pelo acolhimento, instrução, ensinamentos e também pela amizade. Obrigado por ter confiado no meu potencial e me permitir experienciar fazer ciência junto ao Laboratório de Ecologia Microbiana (LECOM).

À minha amiga e companheira de vida acadêmica Ana Carolina Butarelli, por todos estes anos fazendo ciência juntos e por sempre ter sido um apoio nos bons e nos maus momentos.

À minha co-orientadora Maria Carolina Pezzo Kmit, por tantos meses de trabalho juntos, ensinamentos e amizade. Foram muitos momentos trabalhando, discutindo e revisando os dados deste trabalho.

À todos os integrantes do LECOM, pois todos contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, bem como meu desenvolvimento profissional e pessoal.

À BiologiQ que financiou o desenvolvimento deste projeto.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos. Sem ela eu não poderia desenvolver este trabalho e me manter em São Paulo durante seu desenvolvimento.

Ao professor Alexander Turra, que junto a Vivian, coordenaram este projeto.

À todos os profissionais do IO que de alguma forma contribuem diariamente para o seu funcionamento.

E todos aqueles que, mesmo não mencionados nominalmente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

RESUMO

FERREIRA, L.S.S. **Influência da composição de polímeros plásticos na comunidade microbiana da plastisfera no ecossistema marinho.** 2022. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Os plásticos têm se tornado um dos principais problemas ambientais das últimas décadas, uma vez que milhões de toneladas desse detritos acabam nos oceanos. Ao entrar em contato com a água do mar, o plástico é rapidamente colonizado por uma complexa comunidade microbiana, constituindo um novo habitat denominado “Plastisfera”. Porém os fatores ecológicos que influenciam o desenvolvimento destas comunidades ainda estão sendo elucidados. Neste trabalho buscou-se a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, obtido do biofilme microbiano associada a polímeros plásticos (PEAD, PEBD e PBAT), caracterizar a sucessão temporal em um experimento realizado por 5 semanas na região costeira do Saco da Ribeira em Ubatuba, São Paulo. Os resultados de abundância bacteriana e estrutura da comunidade, indicaram que ambas foram influenciadas pelas variáveis ecológicas tempo de exposição e tipo de substrato. Foi possível também classificar táxons nunca identificados como componentes da plastisfera. Entre os grupos taxonômicos mais abundantes, destacaram-se os filos Proteobacteria, Cyanobacteria e Bacteroidota, bem como as famílias Flavobacteraceae, Rhodobacteraceae e “Cloroplastos”. Ao analisar a sucessão ecológica da plastisfera, pôde-se reconhecer três fases clássicas da colonização do biofilme ao longo do tempo de exposição: Colonização primária (semana I), com ênfase na preparação do biofilme por micro-organismos fotossintéticos e produtores de EPS; Fase de crescimento (semanas II e III), com destaque na manutenção do biofilme a partir do controle populacional e degradação de compostos complexos; e Fase de maturação (Semana IV e V) onde não houveram mais variações significativas na estrutura da comunidade. Na análise de indicadores foi possível identificar 174 ASVs indicadoras somando os diferentes tipos de plásticos. Por fim foram inferidos 25 metabolismos importantes, entre eles estão o ciclo do nitrogênio, carbono e enxofre, bem como biodegradação de hidrocarbonetos. Juntos, estes resultados sugerem que a plastisfera formada em ambiente tropical pode representar um ecossistema único e complexo. Em conclusão os resultados revelaram que a comunidade microbiana foi influenciada pelos tipos de substrato, onde foram identificadas bactérias plástico-específicas, bem como entre as semanas de coleta, e por fim demonstrou a alta complexidade metabólica existente, bem como o potencial biodegradador. Com isso, este

trabalho traz importantes contribuições para o entendimento dos fatores ecológicos que afetam a plastisfera marinha, bem como auxilia o entendimento do desenvolvimento do biofilme associado a matrizes plásticas no ecossistema marinho.

Palavras-chave: Microbioma, Biofilmes, Plastisfera, Bactérias Plástico-específicas, Poluição marinha.

ABSTRACT

FERREIRA, L.S.S. **Influence of the composition of plastic polymers on the microbial community of the plasticsphere in the marine ecosystem.** 2022. XXX p. Dissertation (Master in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022

Plastics have become one of the main environmental problems in recent decades, as millions of tons of this debris end up in the oceans. When in contact with sea water, the plastic is quickly colonized by a complex microbial community, constituting a new habitat called “Plastisphere”. However, the ecological factors that influence the development of these communities are still being elucidated. Based on the sequencing of the 16S rRNA gene, obtained from the microbial biofilm associated with plastic polymers (PEAD, PEBD and PBAT), we sought to characterize the temporal succession in an experiment carried out for 5 weeks in the coastal region of Saco da Ribeira in Ubatuba, São Paulo. The results of bacterial abundance and community structure indicated that both were influenced by ecological variables exposure time and substrate type. It was also possible to classify taxa never identified as components of the plastisphere. Among the most abundant taxonomic groups, the phyla Proteobacteria, Cyanobacteria and Bacteroidota stood out, as well as the families Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae and “Chloroplasts”. By analyzing the ecological succession of the plastisphere, it was possible to recognize three classic phases of biofilm colonization over the exposure time: Primary colonization (week I), with emphasis on biofilm preparation by photosynthetic and EPS-producing microorganisms; Growth phase (weeks II and III), with emphasis on biofilm maintenance from population control and degradation of complex compounds; and Maturation phase (Weeks IV and V) where there were no more significant variations in community structure. In the analysis of indicators, it was possible to identify exclusive microbial groups, such as indicators in the different types of plastics. Finally, 25 important metabolisms were inferred, among them are the nitrogen, carbon and sulfur cycle, as well as the biodegradation of hydrocarbons. Together, these results suggest that the plastisphere formed in a tropical environment may represent a unique and complex ecosystem. In conclusion, the results revealed that the microbial community was influenced by the types of substrate, where plastic-specific bacteria were identified, as well as between the collection weeks, and finally demonstrated the high existing metabolic complexity, as well as the biodegradation potential. Thus, this work brings important contributions to the understanding of ecological factors that affect the marine

plastisphere, as well as helps to understand the development of biofilm associated with plastic matrices in the marine ecosystem.

Keywords: Microbiome, Biofilms, Plastisphere, Plastic-specific Bacteria, Marine Pollution.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estruturas de diferentes tipos de polietileno representando o polietileno de alta densidade (PEAD), o polietileno de baixa densidade (PEAD) e o polietileno linear de baixa densidade (LPEBD).....23
- Figura 2.** Mapa representando os maiores produtores de resíduos plásticos do mundo em milhões de toneladas.....25
- Figura 3.** Demonstração do desenvolvimento do biofilme microbiano em polietileno de alta densidade a partir de microscopia eletrônica de varredura acima e a abundância dos grupos mais abundantes utilizando 16S rRNA ao longo de 16 semanas.....28
- Figura 4.** Montagem experimental e mapa do local onde foi realizado o experimento. (a) Incubações *in situ* foram implantadas na Baía do Flamengo, Oceano Atlântico Sul, costa de Ubatuba, Brasil; o local é marcado por um triângulo verde. (b) Esquema da estrutura flutuante triangular usada para incubar os plásticos e o vidro. (c) exposição *in-situ* com quadro flutuante na costa de Ubatuba. (d) esquema da amostragem e coleta de dados utilizada no estudo.....32
- Figura 5.** Coleta de amostras de matrizes de plástico PEBD e PEAD expostas ao ambiente marinho. PEBD exposto por 7 (A), 14 (B), 21 (C), 28 (D) e 35 (E) dias e PEAD exposto por 7 (F), 14 (G), 21 (H), 28 (I) e 35 (J) dias.....33
- Figura 6.** Curva de rarefação baseada em amostras de superfícies artificiais e água do mar: vidro, PEAD (polietileno de alta densidade), PEBD (polietileno de baixa densidade) e PBAT (polibutileno adipato tereftalato). O gráfico foi colorido quanto ao tempo de coleta das amostras. Semana 0/água do mar (rosa); Semana 1 (amarelo), Semana 2 (verde); Semana 3 (azul forte); Semana 4 (azul claro); Semana 5 (roxo).....38
- Figura 7.** Diversidade alfa, (ASVs Observadas, índices Chao1 e Shannon) representadas em boxplots demonstrando as medianas dos valores calculados. Tipos de amostra: Vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, Polietileno de baixa densidade; PBAT, tereftalato de adipato de polibutileno.....40
- Figura 8.** Diversidade beta, análise de coordenadas principais (PCoA) com base no índice de dissimilaridade de Unifrac ponderado. Os tipos de amostra são representados pelas formas e os tempos de exposição representados pelas diferentes cores, laranja (Semana 1), vermelho (Semana 2), azul (Semana 3), verde (Semana 4) e amarelo (Semana 5)42
- Figura 9.** Abundâncias relativas da composição taxonômica a nível de filo (A), classe (B) e família (C) na água do mar (AM), Vidro, PBAT (Tereftalato de adipato de polibutileno), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade) durante as cinco semanas de exposição. As caixas cinzas no topo indicam o período de exposição na figura.....45
- Figura 10.** Classificação das 30 ASVs mais abundantes na água do mar (AM), Vidro, PBAT (Tereftalato de adipato de polibutileno), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade) durante as cinco semanas de exposição. O tamanho dos círculos está relacionado à abundância relativa de cada ASV.....49
- Figura 11.** Variante de sequência de *amplificons* diferencialmente abundante (ASV) comparando Plástico (PEAD, PEBD e PBAT em conjunto) e vidro. Polímeros: PBAT (Tereftalato de adipato de polibutileno), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade). ASVs significativos ($p < 0,05$) são representados por pontos de dados únicos, agrupados por família no eixo y e por cor de acordo com o filo taxonômico do qual o ASV se origina. Valores positivos ($\log_2\text{FoldChange}$) indicam ASVs

significativamente mais abundantes em amostras de vidro; Valores negativos indicam o contrário. Táxons não cultivados foram representados por “uncultured_”51

Figura 12. Resultados da análise de espécies indicadoras para vidro, PBAT (polibutileno adipato tereftalato), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade). A rede (A) indica a correlação (representada por bordas) de e ASVs compartilhados (entre 2 e 3 superfícies artificiais diferentes) A rede (B) destaca a classificação taxonômica dos nós que pertenciam às ordens mais representadas (ou seja, aqueles que representam > 1% de abundância relativa em pelo menos uma amostra). Táxons não dominantes (isto é, < 1%) são relatados como “Outros”. O tamanho dos nós reflete sua “fidelidade” à superfície artificial, de modo que um nó grande indica ASVs sempre presentes em todas as amostras dessa superfície artificial.....53

Figura 13. Análise de inferência funcional utilizando o banco de dados do FAPROTAX. Quanto maior abundância de presença da função, maior vai ser o tamanho da bola, ao passo que quanto menor a abundância da função, menor vai ser o tamanho da bola. O polietileno de alta densidade (PEAD) está em rosa, polietileno de baixa densidade (PEBD) está em verde e o polibutileno adipato tereftalato (PBAT) está em azul.....54

APÊNDICE F. Diversidade alfa, (ASVs Observadas, índices Chao1 e Shannon) representadas em boxplots demonstrando as medianas dos valores calculados. Tipos de amostra: Plástico com amido e sem amido (Puro).....91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação e sequências dos primers utilizados.....	34
Tabela 2. Resultados dos testes estatísticos de diversidade alfa com tempo de exposição e superfícies artificiais. Valor de $p < 0.05$ são mostradas em negrito.....	41
Tabela 3. Resultados dos pós-testes de diversidade beta com tempo de exposição (semana I, semana II, semana III, semana IV e semana V) e substrato (vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, polietileno de baixa densidade; PBAT , Tereftalato de adipato de polibutileno). Valor de $p < 0.05$ são mostradas em negrito.....	42
Tabela 4. Frequências relativa total dos domínios identificados nas amostras do experimento <i>in situ</i>	43
Tabela 5. Frequência relativa divididos por tempo de exposição dos filos identificados no experimento <i>in situ</i> . Os valores maiores estão representados a esquerda e os menores a direita.....	44
Tabela 6. Frequência relativa e amplitude dos valores (maiores e menores) divididos por tipos de substrato dos filos identificados no experimento <i>in situ</i> . Os valores maiores estão representados a esquerda e os menores a direita.....	45
APÊNDICE A. Sumário quantitativo do controle de qualidade. Com o número de sequências que entraram, o quantitativo após cada processo (filtro, denoise, retirada de quimeras) e suas respectivas porcentagens.....	74
APÊNDICE B. Soma, mediana, erro padrão (DP) para ASVs Observados, índices Chao1 e Shannon para água do mar (AM), vidro, polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD) e tereftalato de polibutileno adipato (PBAT). Resultados do teste Shapiro-Wilk com ASVs observados, índices Chao1 e Shannon.....	77
APÊNDICE C. Resultados dos pós-testes de diversidade alfa com tempo de exposição (semana I, semana II, semana III, semana IV e semana V) e substrato (vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, polietileno de baixa densidade; PBAT , Tereftalato de adipato de polibutileno). Valor de $p < 0.05$ são mostradas em negrito.....	79
APÊNDICE D. Frequência relativa divididos por tempo de exposição e tipos de substratos das classes identificadas no experimento <i>in situ</i>	82
APÊNDICE E. Grupos taxonômicos e os tipos de plásticos onde foram identificados, bem como suas respectivas referências.....	88
APÊNDICE G. Identificação e tipos de plástico das amostra utilizadas.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASV	Sequência Variante de Amplicon
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
PBAT	Poli(butileno Adipato Tereftalato)
PCoA	Análises de Coordenadas Principais
PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
PEAD	Polietileno de Alta Densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 O plástico e poluição marinha.....	18
3.2 Formação de biofilmes microbianos em ambiente marinho.....	22
3.3 Ecologia da Plastisfera e Biodegradação.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Área de estudo e amostras.....	26
4.2 Extração de DNA, amplificação do 16S rRNA e sequenciamento.....	28
4.3 Processamento e análise das sequências e estatística.....	29
5 RESULTADO.....	32
5.1 Controle de qualidade e processamento das sequências brutas.....	32
5.2 Análise de diversidade alfa e beta.....	33
5.3 Caracterização taxonômica e Padrões na Sucessão da Comunidade Microbiana.....	37
5.4 Abundância diferencial e indicadores de espécies.....	42
5.5 Inferência funcional.....	48
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICES.....	67
APÊNDICE A - Sumário quantitativo do controle de qualidade. Com o número de sequências que entraram, o quantitativo após cada processo (filtro, denoise, retirada de quimeras) e suas respectivas porcentagens.....	67

APÊNDICE B - Soma, mediana, erro padrão (DP) para ASVs Observados, índices Chao1 e Shannon para água do mar (AM), vidro, polietileno de alta densidade (PEAD), polietileno de baixa densidade (PEBD) e tereftalato de polibutileno adipato (PBAT). Resultados do teste Shapiro-Wilk com ASVs observados, índices Chao1 e Shannon.....67

APÊNDICE C - Resultados dos pós-testes de diversidade alfa com tempo de exposição (semana I, semana II, semana III, semana IV e semana V) e substrato (vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, polietileno de baixa densidade; PBAT, Tereftalato de adipato de polibutileno). Valor de $p < 0.05$ são mostradas em negrito.....67

APÊNDICE D - Frequência relativa divididos por tempo de exposição e tipos de substratos das classes identificadas no experimento *in situ*.....67

APÊNDICE E - Grupos taxonômicos e os tipos de plásticos onde foram identificados, bem como suas respectivas referências.....67

APÊNDICE F - Diversidade alfa, (ASVs Observadas, índices Chao1 e Shannon) representadas em boxplots demonstrando as medianas dos valores calculados. Tipos de amostra: Plástico com amido e sem amido (Puro).....67

1 INTRODUÇÃO

O plástico é um material versátil e de ampla utilização desde a sua invenção e que desempenha um papel fundamental na sociedade (AMARAL-ZETTLER *et al.*, 2020). Apesar disso, a poluição por esse polímero é reconhecida como um grave problema antropogênico nos ecossistemas marinhos. Atualmente, o aumento e acúmulo de detritos plásticos nos oceanos é uma constante preocupação mundial, visto que, trilhões de partículas de plástico estão flutuando nos oceanos, (VAN SEBILLE *et al.*, 2015). O acúmulo dessas partículas de plástico se torna ainda mais preocupantes pois são materiais considerados recalcitrantes e que se acumulam nas águas superficiais e no fundo do mar, assim como nos giros subtropicais (BARNES *et al.*, 2009; DERRAIK *et al.*, 2002; ERNICASSOLA *et al.*, 2019; KANE; CLARE *et al.*, 2011; VAN SEBILLE *et al.*, 2015).

Grande parte dos polímeros plásticos são sintetizados por monômeros químicos derivados do petróleo e que a partir destes podem ser gerados diversos tipos de materiais, entretanto são poucos os principais plásticos convencionais que dominam o mercado mundial. Sendo eles: polipropileno (PP) 21.1%, polietileno (PE): polietileno de baixa densidade (PEBD) 19.9%, polietileno de alta densidade (PEAD) 16.1%, policloreto de vinila (PVC) 11.8%, polietileno tereftalato (PET) 10.2%, poliuretano (PU) 8.4%, e poliestireno (PS) 7.8% (GEYER *et al.*, 2017). Os tipos de plástico apresentam diferentes aplicações como embalagens plásticas, construção civil, container, cosméticos, entre outros. O PE, apesar de não ser o polímero de maior produção, destaca-se por ser o polímero mais utilizado na produção de produtos de uso único como garrafas e descartáveis, contribuindo para o aumento da poluição no geral (CHEN *et al.*, 2021). Por outro lado, observa-se o crescente interesse no desenvolvimento da produção em larga escala de plásticos considerados biodegradáveis, com o objetivo de reduzir a vida útil destes no ambiente. Um grande exemplo é o poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT), produto considerado o mais promissor nesse sentido (JIAN; XIANGBIN; XIANBO, 2020).

Quando liberados no ambiente marinho, os plásticos fornecem uma área de superfície substancial para colonização de macro e micro-organismos (REISSER *et al.*, 2014), a chamada plastisfera. A vida associada ao plástico nos oceanos compreende uma comunidade complexa de micro-organismos virais, bacterianos e eucarióticos, como

animais e plantas microscópicos e macroscópicos (ZHAO *et al.*, 2021). Bactérias e vírus são os colonizadores primários da superfície plástica, levando ao desenvolvimento inicial do biofilme ao preparar o ambiente para os futuros colonizadores (FLEMMING *et al.*, 2016). Dessa forma produzindo substâncias poliméricas extracelulares (EPS), contribuindo para a agregação de colonizadores microbianos subsequentes, como micro-organismos fotossintéticos, quimiotróficos e heterotróficos (DANG; LOVELL, 2016; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Após a colonização e a estabilização de uma comunidade metabólica diversificada, o biofilme maduro pode alterar as propriedades físico-químicas dos plásticos, facilitando a colonização por fungos, protozoários e larvas de metazoários (HUGGETT; NEDVED; HADFIELD, 2009; GHIGLIONE; LAUDET, 2020; SHIMETA *et al.*, 2012). Micro-organismos ligados à superfície dos plásticos se beneficiam do acesso facilitado aos recursos como os de proteção, e nutrientes, interações e microambiente estável (DANG; LOVELL *et al.*, 2016).

Estudos relatam altos valores de diversidade no microbioma da plastisfera, as quais são distintos das comunidades de vida livre circundantes (ZETTLER *et al.*, 2013; BRYANT *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2019), partículas de sedimento (BASILI *et al.*, 2020), e outras superfícies artificiais, como celulose e vidro (KIRSTEIN *et al.*, 2019; OGONOWSKI *et al.*, 2018). Vários fatores podem influenciar a colonização microbiana na plastisfera (MEYER-CIFUENTES *et al.*, 2020) como o tempo de exposição, tipo de plástico (polietileno, polipropileno, poliestireno), localização geográfica e estação do ano (ZETTLER *et al.*, 2013; AMARAL-ZETTLER *et al.* 2020, PINELL; TURNER, 2019). Apesar dos estudos dos fatores ecológicos para elucidar o comportamento das comunidades das plastisféras, poucos são os trabalhos que buscaram reconhecer o desenvolvimento da mesma em ambientes tropicais no hemisfério sul, como neste trabalho.

No presente trabalho, foi realizado o primeiro experimento *in situ* em uma baía tropical costeira, localizada no Saco da Ribeira em Ubatuba no Oceano Atlântico Sudoeste. Este estudo teve como objetivo avaliar a sucessão da colonização do biofilme ao longo de 5 semanas em três diferentes polímeros, polietileno de alta e baixa densidade (PEAD e PEBD), poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT) e vidro como material controle que foram expostos ao ambiente marinho natural. Durante esse período foram analisados: (1) a diversidade e a estrutura da comunidade microbiana entre os diferentes polímeros e amostras de vidro e entre os polímeros em sua forma pura e polímeros com

amido em sua composição; (2) a diversidade e a estrutura da comunidade microbiana ao longo de cinco semanas de exposição em ambiente natural; (3) quais micro-organismos presentes como membros únicos ou compartilhados nos polímeros e na superfícies de vidro e (4) quais funções metabólicas estão presentes na plastisfera. Para atender aos objetivos acima, foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA, para determinar a dinâmica da microbiota que compõem a plastisfera em termos de mudanças na diversidade microbiana e na estrutura da comunidade, além da predição das funções microbianas.

Este estudo agrega informações importantes sobre a ecologia das comunidades microbianas que compõem a plastisfera marinha, discutindo os fatores que influenciam a adesão e seleção de grupos microbianos específicos. Além disso, este trabalho identificou as ASVs mais abundantes em diferentes estágios de desenvolvimento do biofilme. Isso auxiliou a caracterização de um processo inicial de sucessão ecológica, bem como grupos microbianos únicos selecionados em diferentes tipos de plástico. 25 funções ecológicas, entre elas ciclos biogeoquímicos essenciais para a manutenção das comunidades e também degradação de compostos orgânicos foram inferidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo entender a sucessão temporal da comunidade bacteriana associada a diferentes polímeros plásticos expostos ao ambiente marinho natural, ao longo de 5 semanas, na baía tropical costeira, localizada no Saco da Ribeira em Ubatuba-SP no Oceano Atlântico Sudoeste, sobretudo quanto a sua diversidade taxonômica e potencial metabólico.

2.2 objetivos Específicos

- (i) Caracterizar a estrutura da comunidade microbiana através da análise de dados do sequenciamento do gene 16S rRNA;

- (ii) Avaliar a influência temporal na diversidade taxonômica (alfa e beta diversidade), bem como as mudanças da comunidade microbiana ao longo dos tempos de coleta;
- (iii) Reconhecer quais grupos taxonômicos se destacam durante o processo de sucessão ecológica;
- (iv) Avaliar a variação decorrente de diferentes substratos (plásticos, vidro e plásticos com e sem amido) na estrutura da comunidade da plastisfera;
- (v) Identificar a presença de micro-organismos plástico-específicos como indicadores por tipo de substrato;
- (vi) Predizer funções metabólicas presentes na plastisfera.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Plástico e a poluição marinha

O plástico é um dos responsáveis pela revolução moderna que tem transformado a maneira como vivemos. Desde sua invenção em 1907 mostrou ser um material útil e que desempenha um papel fundamental na sociedade de muitas maneiras, de questões estruturais a transporte e bem-estar (AMARAL-ZETTLER et al., 2020). Dentre os mais de 300 tipos de plásticos produzidos no mundo, o Polietileno (PE) destaca-se por ser o material mais utilizado na produção de produtos descartáveis, agravando o problema de poluição e acúmulo nos ambientes naturais (CHEN et al., 2021).

O PE e seus derivados compõem um grupo de materiais bastante recalcitrante, ou seja, possuem estruturas químicas que conferem aos mesmos grande resistência à degradação ambiental (GHATGE et al., 2020). Essa recalcitrância deve-se a fatores como a apolaridade, a insolubilidade em água, a cadeias lineares de carbono-carbono, ao alto grau de cristalinidade e de peso molecular (WEBB et al., 2012). O plástico de polietileno pode ser dividido em polietileno de baixa densidade (PEBD) e polietileno de alta densidade (PEAD) (**Figura 1**). O PEBD foi preparado e processado pela polimerização de alta pressão das moléculas de etileno e em sua composição há a presença de cadeias ramificadas e essa característica é responsável pela baixa densidade do PEBD. Já o PEAD produzido por processo catalítico e com poucas ramificações, é considerado um

termoplástico e a alta densidade confere a este material forças intermoleculares mais fortes e de maior resistência do que o PEBD (FERREIRA; FALCAO; GIL, 2005; BALASUBRAMANIAN et al., 2010; GHATGE et al., 2020).

Por outro lado, a partir do aumento da produção de materiais plásticos e a dificuldade na degradação ambiental desse material, há uma crescente necessidade da criação de alternativas para a remediação da problemática do acúmulo de lixo plástico no ambiente. Consequentemente existe um aumento no interesse por plásticos considerados biodegradáveis. Levando isso consideração, um dos produtos que tem maior destaque é o poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT)(JIAN; XIANGBIN; XIANBO, 2020). O PBAT é um copoliéster alifático-aromático produzido a partir de fontes não renováveis derivadas do petróleo, obtido pela policondensação de 1,4-butanodil, ácido adípico e ácido tereftálico (JANG et al., 2012). Isso o torna um polímero biodegradável e que apresenta propriedades mecânicas similares aos filmes de polietileno de baixa densidade, porém maior permeabilidade ao vapor de água; sendo obtido por síntese a partir de derivados do petróleo (BASF). Por apresentar métodos de fabricação convencionais, este tem atraído grande atenção devido a facilidade de processabilidade (MECKING et al., 2004).

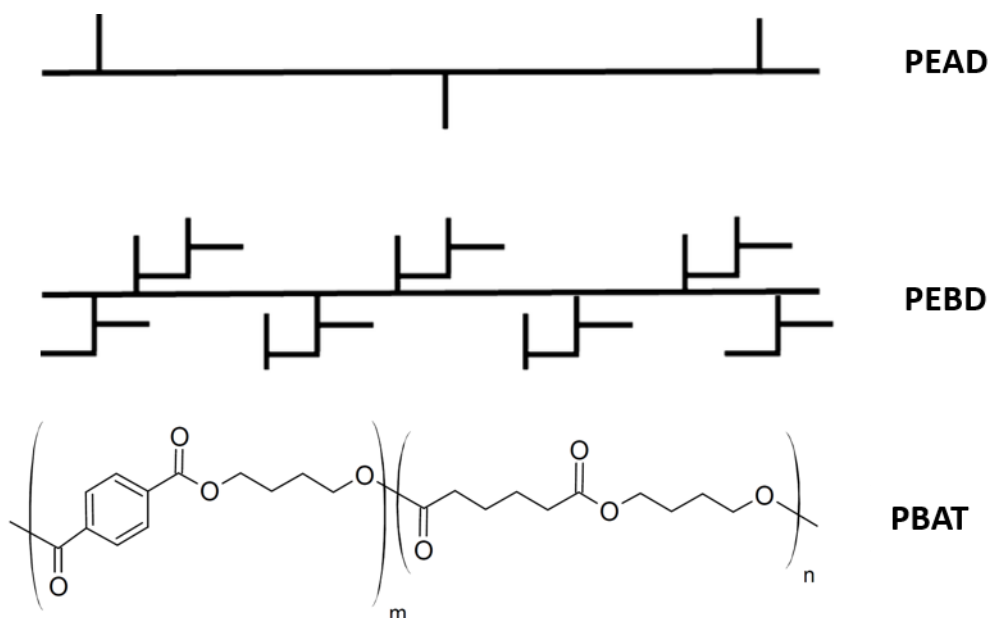


Figura 1. Estruturas de diferentes tipos de polietileno representando o polietileno de alta densidade (PEAD), o polietileno de baixa densidade (PEAD) e poli(butileno adipato co-tereftalato) (PBAT). Retirada e modificada de Ghatge et al (2020) e Jiang; Liu; Zhang (2009).

Outra categoria de plásticos considerados biodegradáveis são os polímeros a base de amido, produtos que possuem atualmente uma intensa busca pelo desenvolvimento em larga escala. Alguns plásticos a base de amido já estão sendo comercializados, porém a busca por esses produtos ainda está abaixo do esperado devido a desvantagens como as propriedades mecânicas e barreira física menor do que os plásticos sem amido (DO VAL SIQUEIRA et al., 2021). Apesar disso e da dinâmica de produção ainda não ser amplamente difundida e padronizada, a mistura de plástico com amido é um processo acessível, promissor e econômico (TOKIWA et al., 2009). Quanto às presenças no ambiente, a presença do amido pode conferir vantagens em relação a outros tipos de plástico puros, pois a presença de moléculas de amido na matriz do polímero, ao ser exposto aos fatores abióticos, colapsa a integridade estrutural, resultando no aumento da superfície de contato para a ação enzimática por micro-organismos, ou seja, favorecimento da degradação e da biodegradação do polímero (AHMED et al., 2018).

A produção em larga escala do plástico iniciou-se em 1950, e estima-se que a humanidade já produziu 8,3 bilhões de toneladas de plástico. Desse montante, cerca de 6,3 bilhões já foram descartadas. Atualmente, todos os ecossistemas do planeta sofrem com o descarte inadequado e a crescente poluição por plásticos, principalmente pelas características que dificultam a degradação e desintegração desse material e persistem no ambiente (GALL; THOMPSON, 2015). Nos últimos anos, a poluição por plástico nos oceanos tem, cada vez mais, se tornado uma preocupação e problemática mundial. Até 2015, trilhões de partículas de plástico estavam flutuando no oceano globalmente (VAN SEBILLE et al., 2015), e essa quantidade tende a aumentar uma vez que aproximadamente 5-13 milhões de toneladas de plástico entram no oceano todos os anos (JAMBECK et al., 2015). No ano de 2017, estimou-se que 8,3 bilhões de toneladas de novos plásticos foram produzidos, sendo que deste montante, cerca de 75% se tornou resíduo (GEYER et al., 2017). Esses resíduos tendem a ser acumulados ao longo dos anos em águas superficiais, mar profundo e giros subtropicais nos oceanos globais (BARNES et al., 2009; DERRAIK et al., 2002; ERNI-CASSOLA et al., 2019; KANE; CLARE et al., 2011; VAN SEBILLE et al., 2015).

O Brasil é o quarto maior produtor de lixo plástico no mundo (**Figura 2**), com 11,3 milhões de toneladas, perdendo apenas dos Estados Unidos, China e Índia. Estima-se que 10,3 milhões de toneladas desse resíduo foram coletadas (91%), mas apenas 145 mil toneladas (1,28%) foram efetivamente recicladas, ou seja, reprocessadas na cadeia de produção como produto secundário (Kaza, 2018). Alguns trabalhos na costa brasileira

vêm demonstrando a quantidade e o impacto dos detritos plásticos, porém poucos lugares foram monitorados até o momento (CASTRO; DA SILVA; DE ARAÚJO, 2018). A presença de 12 a 1300 partículas por m² na Baía de Guanabara (DE CARVALHO; NETO, 2016), os altos riscos de exposição a microplástico em 13 praias de São Paulo (MOREIRA et al., 2016) e a estimativa de mais de 762 milhões de pellets no litoral sudeste, (TURRA et al., 2014) são alguns exemplos da situação da poluição e a necessidade de mais estudos voltados a esta demanda.

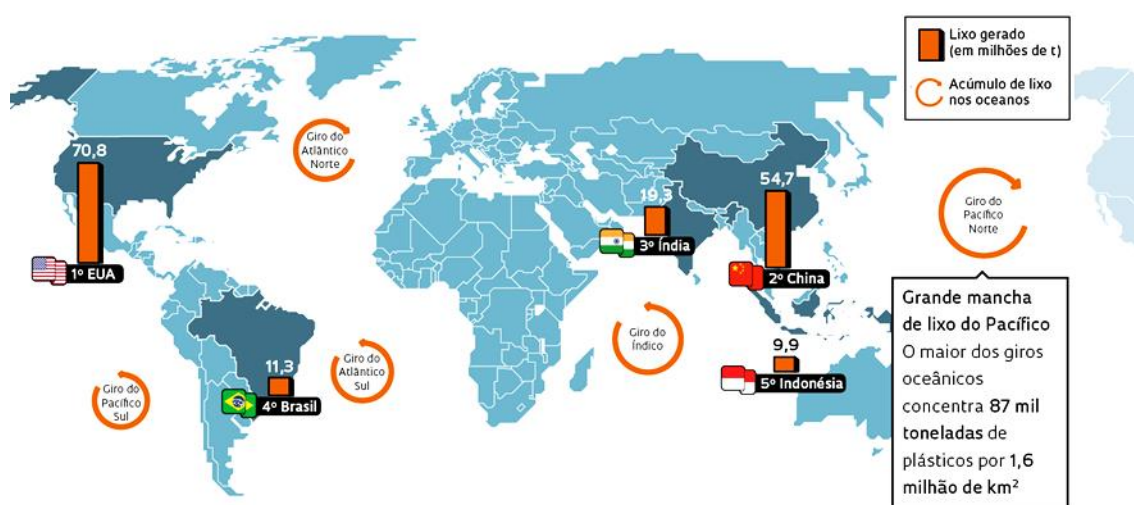


Figura 2. Mapa representando os maiores produtores de resíduos plásticos do mundo em milhões de toneladas. Retirada de Geyer *et al.* (2017) editado e republicado por Pesquisa FAPESP: Yuri, (2019).

A presença das matrizes plásticas no ambiente tem como uma das principais problemáticas a ação direta e indireta sobre a vida dos organismos que entram em contato com estes componentes (GALL; THOMPSON, 2015). Estes efeitos representam um risco em todos os espectros da organização biológica, indo desde o nível subcelular, agindo em ações enzimáticas, expressão gênica e dano oxidativo, passando a nível de indivíduos, agindo sobre a mortalidade, crescimento e taxa de ingestão de alimentos, até o nível populacional e ecossistêmico, interferindo em taxas de fecundidade, desenvolvimento larval, comportamento e funções ecológicas (GALLOWAY; COLE; LEWIS, 2017). Segundo estudos de levantamento sobre os efeitos dos plásticos em diferentes organismos, foram relatados efeitos negativos sobre todas as classes animais (invertebrados, peixes, répteis, aves e mamíferos) com alto grau de irreversibilidade (BEAUMONT et al., 2019). Diferente da macrofauna, micro-organismos como bactérias

e algas sofrem efeito positivo em relação a presença de matrizes plásticas, pois há um aumento da disponibilidade de habitats para colonização dos mesmos (BEAUMONT et al., 2019).

Com isso, há uma corrida global em busca de alternativas para questões relacionadas à poluição marinha, principalmente quanto aos resíduos plásticos (VINCE; HARDESTY, 2017; XANTHOS; WALKER, 2017; THOMPSON; MAXIMENKO, 2016). Como parte da Década da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável (2021-2030) (MCLEAN, 2018), proclamada pelas Nações Unidas, umas das metas é prevenir e reduzir significativamente a poluição marinha de todos os tipos.

4.2 Formação de biofilmes microbianos em ambiente marinho

Assim que entram em contato com o ambiente, os plásticos sofrem a ação de fatores físico-químicos (umidade, temperatura, luz, entre outros) (EMADIAN; ONAY; DEMIREL, 2017), que atuam na decomposição e fragmentação dos resíduos em micro e nano plásticos (REISSER et al., 2014). Além dos fatores abióticos, outro fator primordial é a ação microbiana (DANG; LOVELL, 2016). No ambiente marinho, a superfícies de partículas diversas ou de detritos se tornam alvos potenciais para a rápida colonização por micro-organismos, e o subsequente desenvolvimento de biofilme que fornecem uma série de benefícios aos integrantes do mesmo (DANG; LOVELL, 2016). Essas vantagens se relacionam com funções ecológicas, biofísicas e bioquímicas importantes, oferecendo um novo tipo de substrato para a comunidade microbiana (KIRSTEIN et al., 2018). Os indivíduos que constituem o biofilme são protegidos por uma matriz complexa e rica, composta por polissacarídeos, substâncias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas, ácidos nucleicos, nutrientes, metabólitos primários e secundários, lipídeos e material processado do meio, estabelecendo um microambiente favorável para o crescimento microbiano (STOODLEY et al., 2002; FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016). A formação do biofilme constitui uma mudança na dinâmica do estilo de vida dos micro-organismos que antes habitavam a coluna d'água, e sofrem alterações nos conjuntos de genes específicos envolvidos na quimiotaxia, comunicação, adesão e transporte de substrato que passam a ser expressos para permitir que células individuais formem uma matriz complexa (AMARAL-ZETTLER; ZETTLER; MINCER, 2020).

Bactérias e vírus agem como pioneiros, aderindo às superfícies e resultando no desenvolvimento da comunidade inicial do biofilme, servindo de alicerce para as etapas de

formação e maturação do biofilme (FLEMMING et al., 2016). A adesão das primeiras células modifica as propriedades físico-químicas da superfície do material, além de produzir o EPS, resultando em uma matriz altamente hidratada (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Isso facilita a adesão de colonizadores subsequentes, como micro-organismos fotossintetizantes, quimiotróficos e heterotróficos. (DANG; LOVELL, 2016; O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). Após a colonização e estabilização de uma comunidade composta de diferentes táxons microbianos, ocorre a maturação do biofilme pela produção de produtos como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outros polímeros, tornando-se um microambiente único, complexo e extremamente vantajoso para os integrantes (STOODLEY et al., 2002). Alguns fungos, protozoários e invertebrados podem complementar o biofilme marinho maduro (SHIMETA et al., 2012) (**Figura 3**).

Dentre os principais grupos bacterianos identificados estão em destaque os filos Proteobacteria e Bacteroidetes (DE TENDER et al., 2017), e em trabalhos recentes foram identificadas representantes das famílias Flavobacteriaceae, Hyphomonadaceae e Rhodobacteraceae (ERNI-CASSOLA et al., 2020), famílias tipicamente encontradas em estudos da plastisfera, destaques tanto na colonização inicial quanto nas etapas posteriores. Porém poucas são as discussões no que se refere ao papel destes grupos no biofilme.

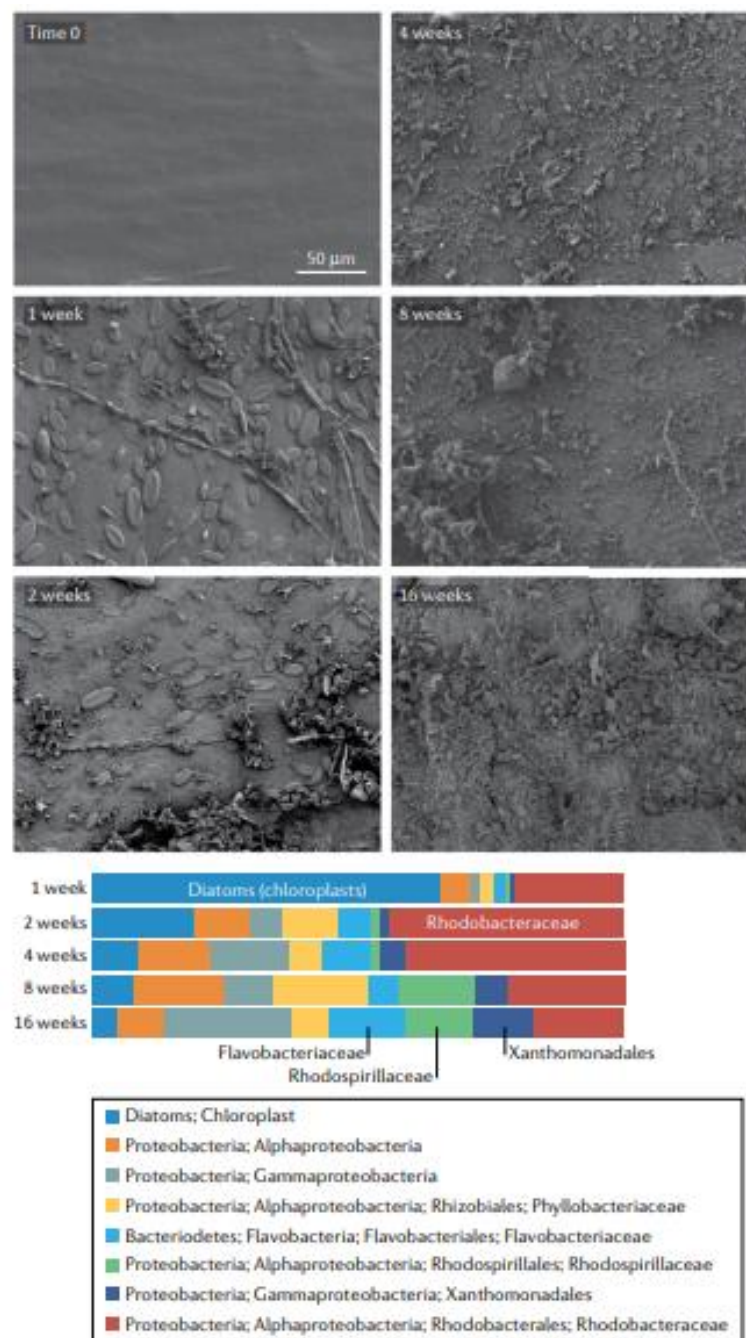


Figura 3. Desenvolvimento do biofilme microbiano em polietileno de alta densidade a partir de microscopia eletrônica de varredura acima e a abundância dos grupos mais abundantes utilizando 16S rRNA ao longo de 16 semanas. Retirada de Amaral-Zettler; Zettler; Mincer (2020).

4.3 Ecologia da Plastisfera e Biodegradação

O primeiro trabalho a nomear um novo micro-habitat como “Plastisfera” (ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013) demonstrou que essas comunidades possuem estruturas taxonômicas ricas, diversas e diferentes da água marinha adjacente, sugerindo que o plástico pode ser usado como substratos, no entanto, não identificaram padrões estruturais na comunidade microbianas afetadas pelo tipo de substrato ou pelo tempo de exposição do plástico no ambiente natural. Os pesquisadores sugeriram também que os micro-organismos associados poderiam apresentar um novo micro-ambiente com potencial para favorecer a biodegradação da matriz plástica.

Estudos posteriores relataram uma grande diversidade no microbioma das superfícies plásticas, apresentando padrão distinto das comunidades de vida livre circundantes (BRYANT et al., 2016; FRÈRE et al., 2018; PINTO et al., 2019), do sedimento (BASILI et al., 2020) e também de outros substratos como cascalho, celulose e vidro (KIRSTEIN et al., 2019; OGONOWSKI et al., 2018; AGOSTINI et al., 2021). Com crescente interesse na comunidade microbiana da plastisfera, surgiram diversos trabalho que investigaram vários fatores que parecem influenciar na colonização microbiana da plastisfera (MEYER-CIFUENTES et al., 2020), como tempo de exposição ao ambiente, tipo de plástico localização geográfica e estação do ano (ZETTLER et al., 2013; AMARAL-ZETTLER et al., 2020; PINELL; TURNER, 2019).

Em microbiomas da plastisfera estudados em regiões costeiras, os micro-organismos mais abundantes foram os representantes dos filos Proteobacteria, principalmente as classes Alpha e Gammaproteobacteria, bem como a família Rhodobacteraceae, seguido do filo Bacteroidetes, com maior abundância da família Flavobacteraceae (ERNI-CASSOLA et al., 2020; XU et al., 2019). Também foi identificada uma forte influência temporal sobre essas as comunidades, suas identificações de funções de biodegradação e metabolização de compostos xenobióticos (ERNI-CASSOLA et al., 2020).

Micro-organismos, de mais de 90 grupos taxonômicos e com metabolismos diversos (aeróbios, anaeróbios, bactérias fotossintéticas, arqueias, eucarióticos entre outros), já foram identificados com potencial para catalisar processos de degradação do plástico (EMADIAN; ONAY; DEMIREL, 2017). Tornando a biodegradação uma

alternativa cada vez mais estudada para a redução do impacto causado pela poluição por plásticos. (EMADIAN; ONAY; DEMIREL, 2017). Um grande exemplo é o reconhecimento da bactéria gram-negativa *Ideoella sakaiensis* capaz de biodegradar eficientemente o polietileno tereftalato (PET) (YOSHIDA et al., 2016). Os esforços também se voltaram para elucidar o processo enzimático por trás da biodegradação. Cientistas descobriram que diferentes enzimas estão envolvidas na biodegradação de PE e PS, como as enzimas lacase, oxidoredutases como as hidroxilases da família AlkB e a hidroquinona peroxidase, além de quitinases, como a PETase (AUSTIN et al., 2018; YOSHIDA et al., 2016).

Atualmente a diversidade de funções metabólicas não são bem elucidadas, porém um estudo metagenômico sugeriu que os micro-organismos presentes na plastisfera são metabolicamente bastante ativos (BRYANT *et al.*, 2016). Entre os ciclos biogeoquímicos clássicos, como o do hidrogênio, carbono e enxofre, também foram identificados biodegradadores de hidrocarbonetos, já relatados em abundância na plastisfera (LI et al, 2021; YOON et al., 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material utilizado

Para o estudo da colonização microbiana foram utilizados três tipos diferentes de plásticos comerciais e suas respectivas misturas com amido; PEBD (polietileno de baixa densidade), mistura de PEBD com 20% de amido, PEAD (polietileno de alta densidade), mistura de PEAD com 20% de amido, PBAT (poli(butileno adipato co-tereftalato), mistura de PBAT com 20% de amido, bem como vidro que foi utilizado como material controle (controle) e água coletada no entorno do experimento. Os plásticos foram disponibilizados pela BiologiQ (<https://www.biologiq.com/>), empresa especializada na produção de bioplásticos.

4.2. Área de estudo e desenho experimental

O fundeio das amostras foi realizado *in situ* em região costeira, na base de pesquisa “Clarimundo de Jesus” do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo na baía de Ubatuba (Brazil, 23° 30' 11.943" S, 45° 7' 36.756" W, **Figura 4A**), com o objetivo de

estudar a colonização microbiana. As amostras de plástico foram cortadas nos tamanhos de 140 x 140 mm em triplicata. Foram utilizadas lâminas de vidro (Lâmina para Microscopia) comercialmente disponíveis pela empresa Perfecta (São Paulo, Brasil) na forma retangular com dimensões de 26x76 mm e 1,0 mm- 1,2 mm de espessura. Antes do fundeio, os pedaços dos plásticos e os vidros foram desinfetados com etanol 70% e enxaguados com água ultra pura.

Todos os plásticos e as lâminas de vidro foram montados em uma estrutura flutuante feita sob medida (**Figura 4B**). Cada tipo de material (PEAD, PEBD, PBAT e vidro) foi fixado a um anel de tubo de PVC que possibilitou as amostras de plástico ficarem dispostas em forma de "bandeira" para evitar a resistência da corrente de água, permitir a circulação da água em torno da moldura flutuante, e simular o movimento dos filmes plásticos no ambiente natural (**Figura 4C**). Os anéis de PVC foram fixados aleatoriamente a uma grade metálica galvanizada, que foram fixadas em armações de cordas triangulares presas a pesos na parte inferior e sustentadas por bóias submarinas (**Figura 4C**), de modo que os painéis fossem montados na posição vertical e as amostras plásticas prontamente expostos ao fluxo de água marinha quando submersos. As estruturas foram ancoradas a uma profundidade de aproximadamente 2m da superfície da água no campo em 10 de fevereiro de 2020.

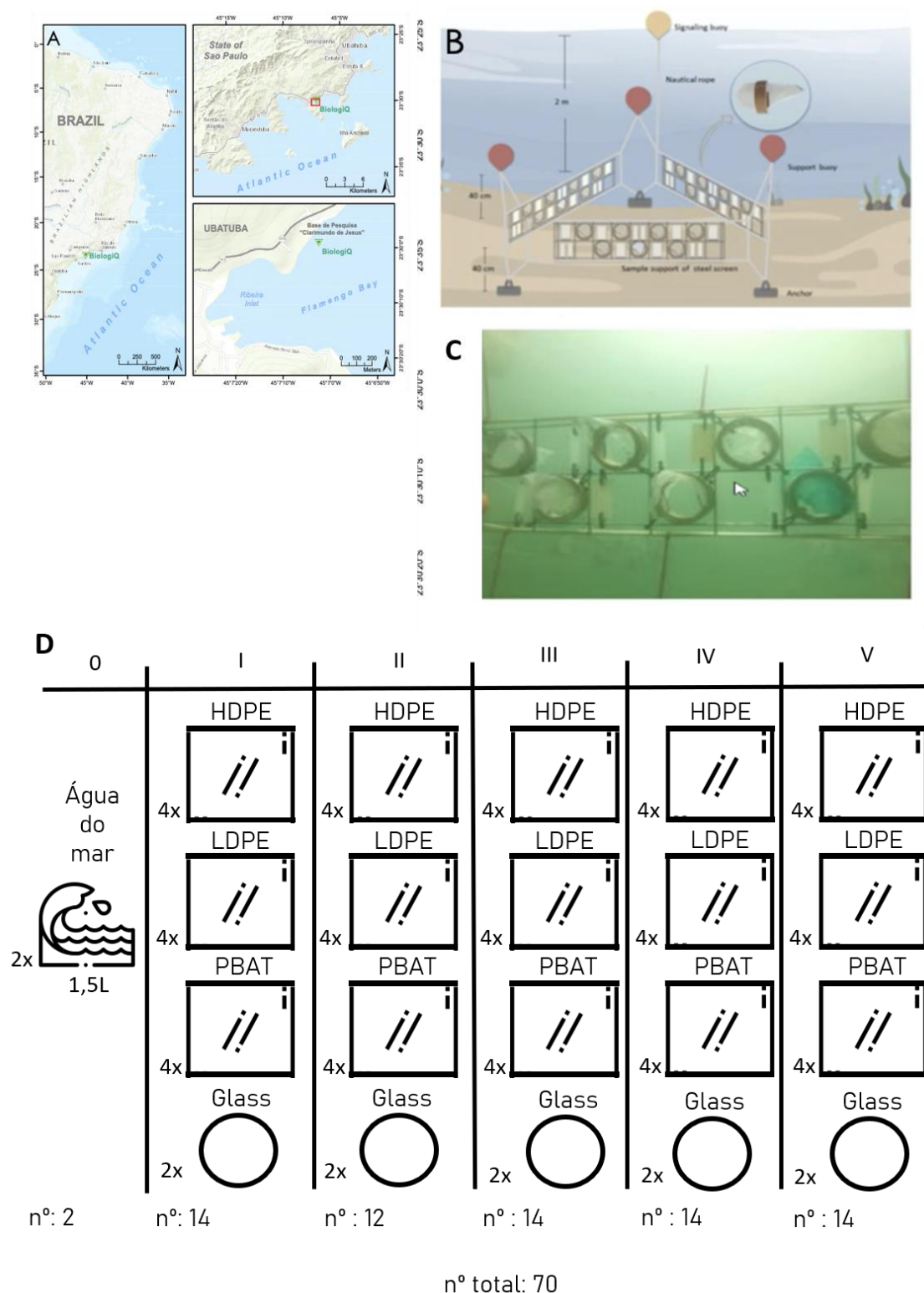


Figura 4. Montagem experimental e mapa do local onde foi realizado o experimento. (a) Incubações *in situ* foram implantadas na Baía do Flamengo, Oceano Atlântico Sul, costa de Ubatuba, Brasil; o local é marcado por um triângulo verde. (b) Esquema da estrutura flutuante triangular usada para incubar os plásticos e o vidro. (c) exposição *in-situ* com quadro flutuante na costa de Ubatuba. (d) esquema da amostragem e coleta de dados utilizada no estudo.

4.3 Amostragem

Para a amostragem do experimento, três painéis foram removidos aleatoriamente em intervalos de uma semana de exposição (semana I: 18 de fevereiro; semana II: 26 de fevereiro; semana III: 3 de março; semanas IV: 10 de março; semana V: 17 de março) totalizando em cada coleta duas amostras de cada polímero e duas amostras de vidro (n total = 70). Os painéis coletados foram imediatamente levados ao laboratório para o adequado processamento das amostras para posterior avaliação do biofilme. Para remover organismos que não faziam parte do biofilme, as amostras foram cuidadosamente enxaguadas 4 vezes com água do mar e imediatamente congeladas a -80°C . Além disso, a comunidade microbiana planctônica circundante foi amostrada no dia da instalação do experimento (dia “zero”). Foram filtrados 1,5 L de água do mar através de uma membrana de filtro Millipore Sterivex™ de $0,2\ \mu\text{m}$ (EMD, Millipore Corporation, Burlington, EUA). Amostras de água do mar foram coletadas em duplicata e os filtros imediatamente congelados a -80°C para extração de DNA.

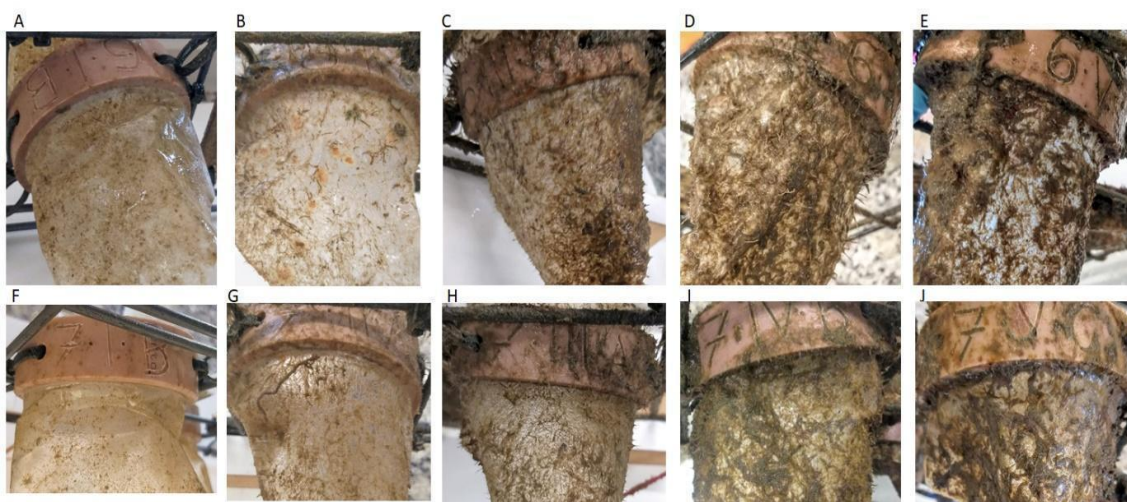


Figura 5. Amostras de matrizes de plástico PEBD e PEAD expostas ao ambiente marinho. PEBD exposto por 7 (A), 14 (B), 21 (C), 28 (D) e 35 (E) dias e PEAD exposto por 7 (F), 14 (G), 21 (H), 28 (I) e 35 (J) dias.

4.4 Extração de DNA

A extração do DNA total de cada uma das amostras foi realizada utilizando-se o Power Biofilm DNA Isolation Kit (MoBioLaboratories, CA, USA), de acordo com o

protocolo do fabricante. O DNA total das amostras de água foi extraído usando o DNeasy PowerWater (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada em Espectrofotômetro NanoDrop™, e a concentração de DNA foi determinada usando o kit de ensaio Qubit dsDNA HS (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

4.5 Amplificação do 16S rRNA e sequenciamento

Antes do envio das amostras para preparação das bibliotecas Illumina e sequenciamento, a região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada com o conjunto de primers 515F e 806R (CAPORASO et al., 2011) (**Tabela 1**). As bibliotecas e o sequenciamento de DNA foram realizados pela empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, São Paulo, Brasil) em uma plataforma MiSeq, com a metodologia de leitura pareada (2 x 250 bp) seguindo as orientações do fabricante. As saídas de sequenciamento eram informações de dados de sequência brutos com informações de qualidade das sequências geradas (arquivos fastq).

Tabela 1. Identificação e sequências dos primers utilizados.

Primer	Sequências	Referência
515F	5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	CAPORASO et al., 2011
806R	5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT	

5.5. Processamento de sequências do gene rRNA 16S

O controle de qualidade das leituras das sequências brutas foi realizado usando o pacote de software Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 2) versão 2020.11 (Bolyen et al., 2018). As sequências foram submetidas ao processamento de *denoise* utilizando o DADA2 (Callahan et al., 2016) com os seguintes parâmetros: trim left-f = 19, trim left-r = 20, trunc-len-f = 240, trunc-len-r = 240. O corte na porção à esquerda das sequências retirou os primers *forward* e *reverse* e no corte da porção à direita das sequências, foram removidos pares de base em com baixa qualidade resultantes da fase final do processo de sequenciamento. Após o *denoise*, as sequências quiméricas e de baixa qualidade foram removidas, as Sequência de Amplicon Variantes (ASVs) foram criadas e as representantes com menos de 10 ocorrências foram removidas. Para a

classificação taxonômica, foi realizado o treinamento do classificador Naive-Bayer utilizando o banco de dados do SILVA 138, seguidamente a taxonomia foi atribuída às sequências representativas de ASVs usando um classificador Naive Bayes pré-treinado agrupado em 99% de identidade. Os principais grupos taxonômicos identificados e seus respectivos substratos, os quais foram identificados em trabalhos anteriores, estão presentes na tabela 11 em anexo.

5.6. Análise de dados

As análises dos dados foram realizadas no software R (Team, 2018), no qual foram utilizados os pacotes PhyloSeq (MCMURDIE; HOLMES, 2012) para o processamento dos dados e análises estatísticas, utilizou-se o ggplot2 (WICKHAM, 2016), para a plotagem dos gráficos e o vegan (OKSANEN et al. 2013) para os cálculos de diversidade.

5.6.1 Análise de diversidade e estatística

Na análise de alfa diversidade, as métricas (quantitativo de ASVs observadas, índice de riqueza de Chao1 e o índice de diversidade de Shannon) foram calculadas com base nas abundâncias relativas da tabela de ASVs. A normalidade das métricas de alfa diversidade foi testada com o teste de hipótese de Shapiro-Wilk, utilizando um α de 0,05. Para analisar as diferenças entre 3 grupos categóricos foram avaliadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) para os dados que apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas e posterior teste post-hoc de Tukey. Para os dados que não apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, as diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância unidirecional (Kruskal-Wallis) e posterior teste emparelhado de Wilcoxon. Para analisar as diferenças entre 2 grupos categóricos, os mesmos foram avaliados utilizando teste-t para dados normais e Mann-Whitney para dados não paramétricos. Para as análises seguintes, as ASVs foram normalizadas utilizando o pacote “DESeq2” do R por transformação estabilizadora de variância (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). A beta diversidade entre o período de exposição e o tipo de superfície foi examinada utilizando a métrica de distância de dissimilaridade ponderada do Unifrac e foi visualizada em gráfico de análises de coordenadas principais (PCoA). O teste de permutação PERMANOVA utilizando a função adonis no pacote

vegan. foi realizado para testar os valores gerados na análise de beta diversidade, comparando a estrutura da comunidade pelo período de exposição e tipo de superfície, análise realizada. Todos os testes estatísticos foram considerados significativos para $p < 0.05$.

5.6.2 Análise das ASVs mais abundantes por tempo de exposição

Para analisar o comportamento das ASVs mais abundantes ao longo do processo de sucessão ecológica inicial, foram separadas as 30 ASVs mais abundantes e analisadas quanto à abundância entre as 5 semanas de exposição.

5.6.3 Abundância diferencial

As ASVs significativamente mais abundantes entre o período de exposição e o tipo de superfície (ou seja, diferentes tipos de plástico e vidro) foram identificados usando o pacote “DESeq2” do R por análise de expressão diferencial/abundância diferencial para dados de contagem de sequências (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Para observar a ocorrência de ASVs, as amostras foram divididas em um grupo denominado “Plástico”, que inclui as diferentes matrizes poliméricas em diferentes momentos de coleta e um grupo denominado “Vidro”, o qual agrupou todas as amostras de vidro nos diferentes tempos de coleta, dessa forma a tabela de abundância dos táxons foi transformada em presença/ausência. Foram então atribuídas as classificações taxonômicas a nível de família para as ASVs diferencialmente abundantes, os resultados foram visualizados usando um gráfico UpSet, pacote UpSetR (CONWAY; LEX; GEHLENBORG, 2017). As ASVs compartilhadas por diferentes matrizes, ou seja, diferencialmente abundantes para os determinados grupos, “Plástico” ou “Vidro” foram considerados o núcleo dos respectivos conjuntos.

5.6.4 Indicadores de Espécie

Para a análise de Indicadores de Espécie, a abundância relativa de indicadores taxonômicos foi identificada pelo IndicSpecies (DE CÁCERES; LEGENDRE; MORETTI, 2010). A análise foi conduzida em contagens de ASV excluindo ASVs < que

20 leituras. Foi comparada a abundância relativa e a frequência relativa de cada ASV para identificar as especificamente associadas (preferência de nicho) a apenas um tipo de superfície (única) e aquelas cuja amplitude de nicho engloba dois ou mais tipos de superfícies (compartilhadas). Os resultados foram visualizados como redes com o pacote *igraph* do R (CSÁRDI et al., 2006). Todas as ASVs únicas e compartilhadas foram coloridas, porém, para taxonomia, apenas as AVSs que apresentaram famílias exclusivas foram coloridas.

5.6.5 Inferência Funcional

Quanto à inferência funcional, os grupos funcionais microbianos previstos foram identificados pelo banco de dados Functional Annotation of Prokaryotic Taxa (FAPROTAX) (LOUCA; PARFREY; DOEBELI, 2016). FAPROTAX extrapola as funções de procariontes cultivados (identificados em nível de gênero ou espécie) para os gêneros procarióticos identificados para estimar funções putativas, sendo um banco de dados construído manualmente (curado) e conta com registros de trabalhos de pesquisa publicados, os quais comprovaram as funções relatadas. Dessa forma, podem extrapolar a comunidade microbiana envolvida em funções ecológicas, como ciclo do nitrogênio, carbono, enxofre, doenças e outros.

5.7. Sequências geradas

As leituras de sequenciamento geradas para este estudo podem ser encontradas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) sob o BioProject PRJNA804579.

5 RESULTADOS

5.1. Controle de qualidade e processamento das sequências brutas

No sequenciamento foi gerado um total de 7.133.231 sequências brutas somando todas as 70 amostras, com uma variação de 170.819 a 42.660 no número de sequências por amostra (APÊNDICE A). Após o processo de *denoise*, onde foram filtradas as sequências de baixa qualidade e retiradas as sequências quiméricas, foram mantidas um

total de 5.762.542 (+/- 80%) sequências. Após o controle de qualidade e processamento das sequências, as mesmas foram agrupadas em 26.579 variantes de sequência de amplicon (ASVs). Uma análise de curva de rarefação (curva do acúmulo de espécie) foi realizada com o propósito de avaliar o esforço amostral. Todas as amostras alcançaram o platô na curva, demonstrando uma boa profundidade e precisão no sequenciamento e uma boa representativa das espécies microbianas presentes nas amostras (**Figura 6**), o que confere aos dados uma confiança significativa para realizar as análises ecológicas posteriores.

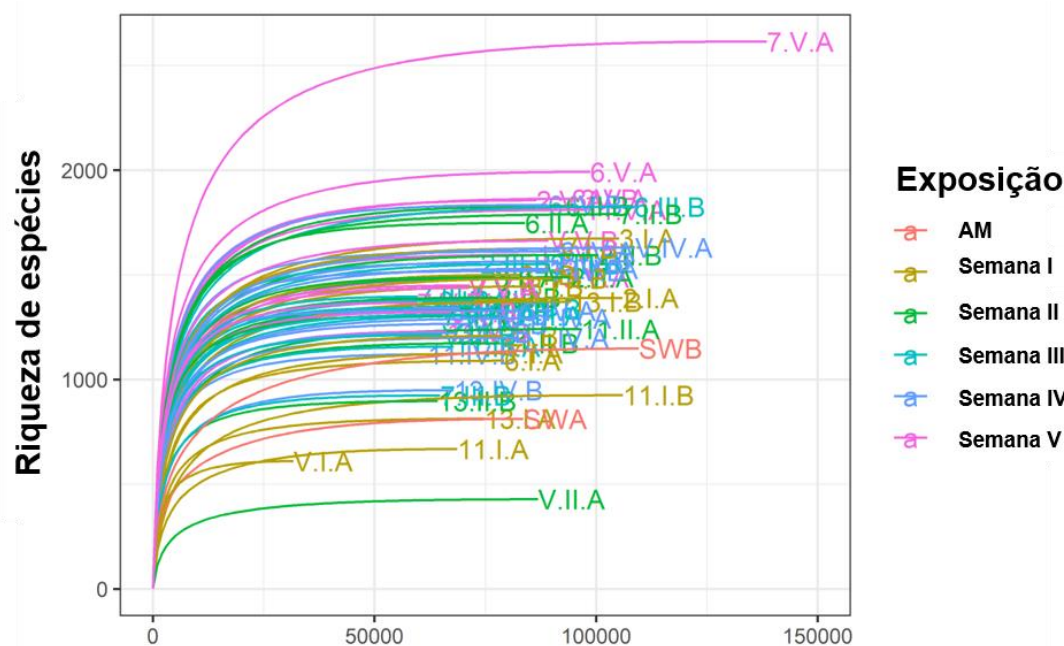


Figura 6. Curva de rarefação baseada em amostras de superfícies artificiais e água do mar (AM): vidro, PEAD (polietileno de alta densidade), PEAD + amido, PEBD (polietileno de baixa densidade), PEBD + amido, PBAT (poli(butileno adipato co-tereftalato) e PBAT + amido. O gráfico foi colorido quanto ao tempo de coleta das amostras. Semana 0/água do mar (rosa); Semana I (amarelo), Semana II (verde); Semana III (azul forte); Semana IV (azul claro); Semana V (roxo). Os códigos das amostras representadas no gráfico estão listados no **APÊNDICE G**.

5.2. Análise de alfa e beta diversidade

Para a análise de alfa diversidade foram testados diferentes fatores que podem influenciar a comunidade microbiana como: o tempo de exposição das amostras no ambiente natural, o tipo de substrato (polímeros e vidro) e a água do entorno do experimento assim como a influência do amido na composição dos polímeros quando comparados as suas formas puras. Na análise da quantidade de ASVs por semana, foi identificado que 15.549 ASVs estavam presentes após a primeira semana de exposição

do plástico à água do mar, 16.215 ASVs após duas semanas, 17.925 ASVs após três semanas, 18.325 após quatro semanas e 21.850 após cinco semanas de exposição (**APÊNDICE B**). As ASVs foram significativamente afetadas pelo período de exposição, onde a Semana I apresentou um número significativamente menor de ASVs observados que as semanas seguintes (teste de Wilcoxon $p < 0.01$; **Figura 7** e **Tabela 2**). As ASVs observadas também foram afetadas pelo tipo de polímero, uma vez que as ASVs observadas nas amostras de PEAD e PEBD em cada semana foram significativamente maiores em comparação com as ASVs observadas no PBAT. Também foram encontradas diferenças estatísticas entre tipos de plástico e água do mar (teste de par emparelhado de Wilcoxon, $p < 0.01$; **APÊNDICE C**), onde os plásticos apresentaram valores maiores que os calculados para as amostras de água do mar.

As medidas de riqueza de Chao1 e de diversidade de Shannon foram também calculadas (**APÊNDICE B**) e testadas, sendo significativamente diferentes entre o tipo de substrato (ou seja, diferentes tipos de plástico e vidro) (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0.01$; teste ANOVA, $p < 0.01$; Respectivamente; **Tabela 2**) e tempo de exposição (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0.01$; teste ANOVA, $p < 0.01$; Respectivamente; **Figura 7**; **Tabela 2**).

Ao comparar os valores estimados de ASVs observadas e os índices de Chao1 e Shannon entre os plásticos que apresentavam amido em sua composição e os sem amido (puros), não foram identificadas diferenças significativas (Teste t; $p = 0.6974$; $p = 0.3586$; $p = 0.6664$; respectivamente; **Tabela 2**; **APÊNDICE F**). Sendo esse o único fator testado que não exerceu nenhuma influência na modulação da comunidade no ambiente natural.

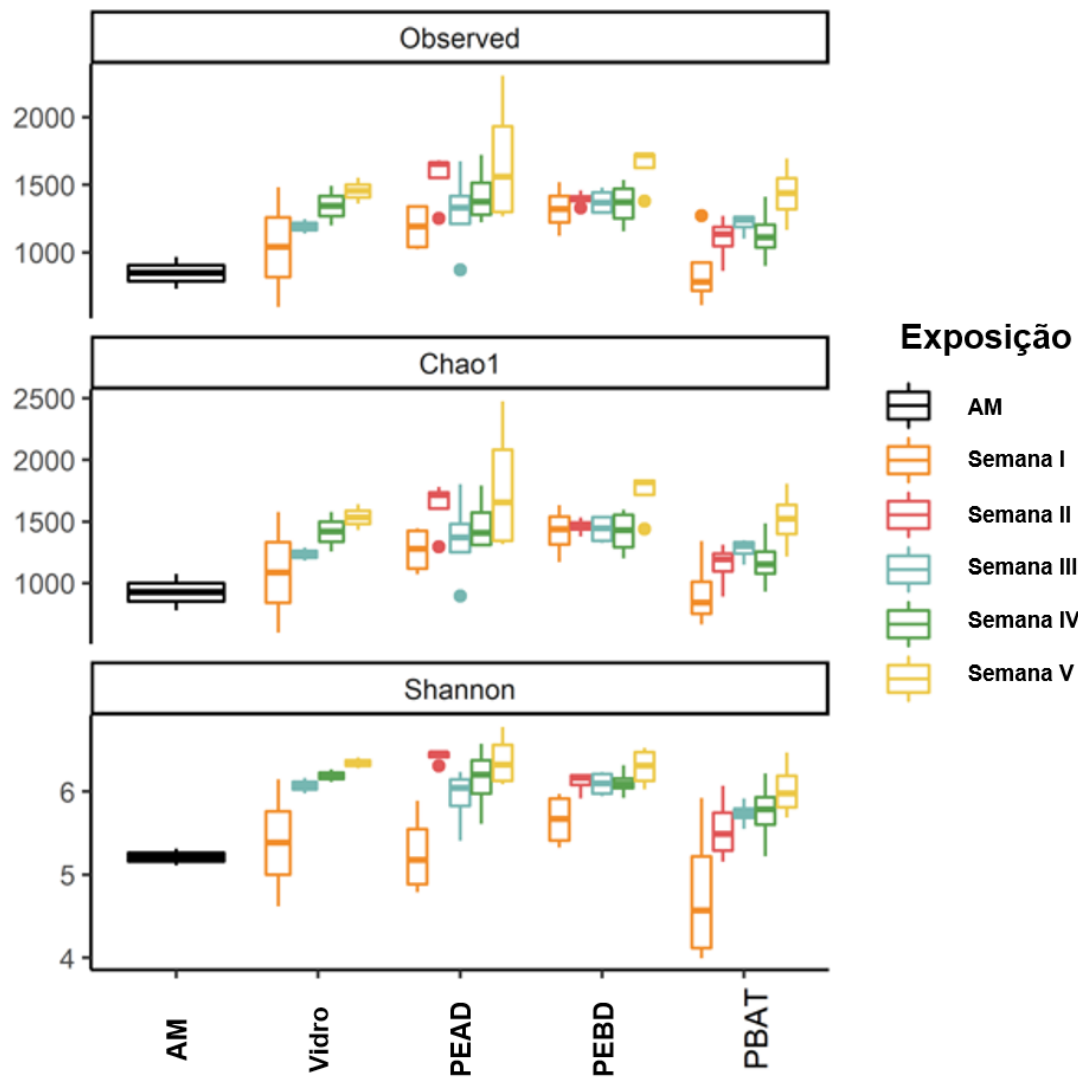


Figura 7. Alfa diversidade (ASVs Observadas, índices Chao1 e Shannon) representadas em boxplots demonstrando as medianas dos valores calculados. Tipos de amostra: AM; água do mar ; Vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, Polietileno de baixa densidade; PBAT, poli(butileno adipato co-tereftalato).

Tabela 2. Resultados dos testes estatísticos de diversidade alfa com tempo de exposição e substrato. Valor de $p < 0.05$ são marcados com asterisco “*”.

Índice	Grupos	Teste	Valor de p
ASVs Observadas	Tempo de exposição	ANOVA	0.0004*
	Substrato		0.0026*
	Presença de amido	Teste-t	0.6974
Chao1	Tempo de exposição	ANOVA	0.0002*
	Substrato		0.0009*
	Presença de amido	Teste-t	0.6664
Shannon	Tempo de exposição	Kruskal–Wallis	0.0001*
	Substrato		0.0020*
	Presença de amido	Teste-t	0.3586

A beta diversidade microbiana foi explorada pela distância calculada através do índice de dissimilaridade ponderado de Unifrac. A análise revelou diferença significativa entre as comunidades microbianas tanto nos diferentes tempos de exposição quanto nos tipos de substrato (**Figura 8**). Foi observado também na análise de PCoA 26% de variação no eixo X e 9,8% no eixo Y, totalizando 35.8% da variação total da composição da comunidade procariótica. A análise de variância com PERMANOVA mostrou que a composição e estrutura da comunidade microbiana diferiu entre o tipo de substrato (adonis, $df=3$, $F=5.34$, $r^2 = 0.14$, $p = 0.001$) e tempo de exposição (adonis, $df=5$, $F = 7.03$, $r^2 = 0.30$, $p = 0.001$). Comparações pareadas de índices de beta diversidade indicaram que: (i) a beta diversidade microbiana não diferiu significativamente entre as semanas IV e V (teste de permanova pareado; $p > 0.05$; **Tabela 3**). Entretanto todas as comparações realizadas entre as semanas demonstraram diferenças na estrutura das comunidades desde a primeira semana de exposição (**Tabela 3**) (ii) a beta diversidade microbiana não diferiu significativamente entre os polímeros PEAD e PEBD (Teste de permanova pareado; $p >$

0.05; **Tabela 3**), porém os mesmos apresentaram diferenças significativas ao serem comparados ao PBAT (Teste de permanova pareado; $p < 0.05$; **Tabela 3**). Também foi testado a diferença entre a estrutura das comunidades dos plásticos com e sem amido, porém não houve diferença significativa (adonis, $F = 0.92$, $p = 0.478$)

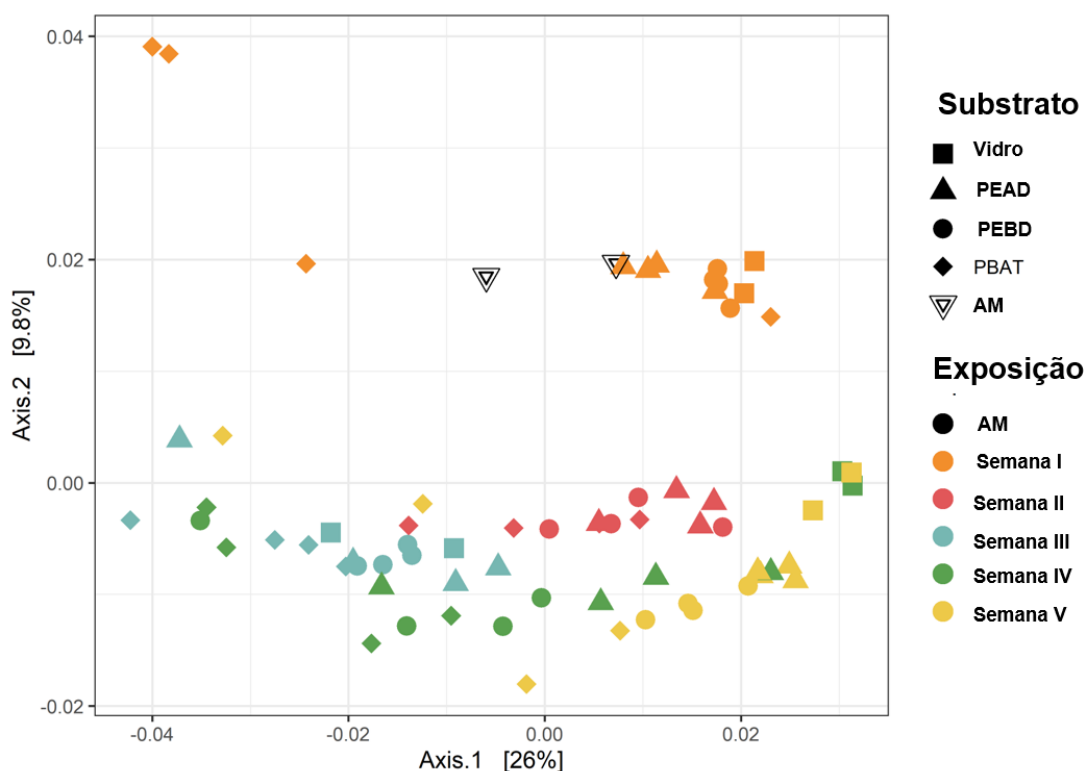


Figura 8. Beta diversidade, análise de coordenadas principais (PCoA) com base no índice de dissimilaridade de Unifrac ponderado. Os tipos de amostra são representados pelas formas e os tempos de exposição representados pelas diferentes cores, laranja (Semana 1), vermelho (Semana 2), azul (Semana 3), verde (Semana 4) e amarelo (Semana 5).

Tabela 3. Resultados dos pós-testes de beta diversidade com tempo de exposição (semana I, semana II, semana III, semana IV e semana V) e substrato (vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, polietileno de baixa densidade; PBAT, poli(butileno adipato co-tereftalato)). Valor de $p < 0.05$ são marcados com asterisco “*”.

Tempo de exposição			Substrato			Presença de amido		
Grupo 1	Grupo 2	p valor	Grupo 1	Grupo 2	p valor	Grupo 1	Grupo 2	P valor

Semana I	Semana II	0.001*	Vidro	PEAD	0.001*	Amido	Puro	0.4780
Semana I	Semana III	0.001*	Vidro	PEBD	0.001*			
Semana I	Semana IV	0.001*	Vidro	PBAT	0.001*			
Semana I	Semana V	0.001*	Vidro	Água do Mar	0.02*			
Semana I	Água do Mar	0.01*	PEAD	PEBD	0.2			
Semana II	Semana III	0.001*	PEAD	PBAT	0.001*			
Semana II	Semana IV	0.01*	PEAD	Água do Mar	0.008*			
Semana II	Semana V	0.01*	PEBD	PBAT	0.001*			
Semana II	Água do Mar	0.01*	PEBD	Água do Mar	0.01*			
Semana III	Semana IV	0.002*	PBAT	Água do Mar	0.004*			
Semana III	Semana V	0.001*						
Semana III	Água do Mar	0.01*						
Semana IV	Semana V	0.06						
Semana IV	Água do Mar	0.01*						
Semana V	Água do Mar	0.005*						

Ao observar que não houveram diferenças estatísticas entre as amostras de plástico com e sem a presença de amido, os agrupamentos “com e sem amido” foram desconsiderados para as análises posteriores e mantidos agrupados dentro de seus respectivos substratos (PEBD, PEAD e PBAT).

5.3. Caracterização taxonômica e Padrões na Sucessão da Comunidade Microbiana

As comunidades microbianas de todas as superfícies artificiais (polímeros e vidro) do experimento *in situ* foram dominadas em geral por ASVs Bacterianas (99.5%), enquanto o domínio Achaea possui apenas 0.5% de abundância total (**Tabela 4**). A maior porcentagem da abundância amostrada pertencente aos filos Proteobacteria (classes Gamma- e Alphaproteobacteria), Bacteroidota, Cyanobacteria e Desulfobacterota, respectivamente, representando cumulativamente uma média 88% das sequências dentro de cada amostra (**Figura 9A; Tabelas 5, 6 10**). Já os filos Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Actinobacteriota e Bdellovibrionota, representam a porção com menor abundância (12%) (**Figura 9A; Tabelas 5, 6 10**).

Tabela 4. Frequências relativa total dos domínios identificados nas amostras do experimento *in situ*.

Domínio	Frequência
<i>Archaea</i>	0.005
<i>Bacteria</i>	0.995

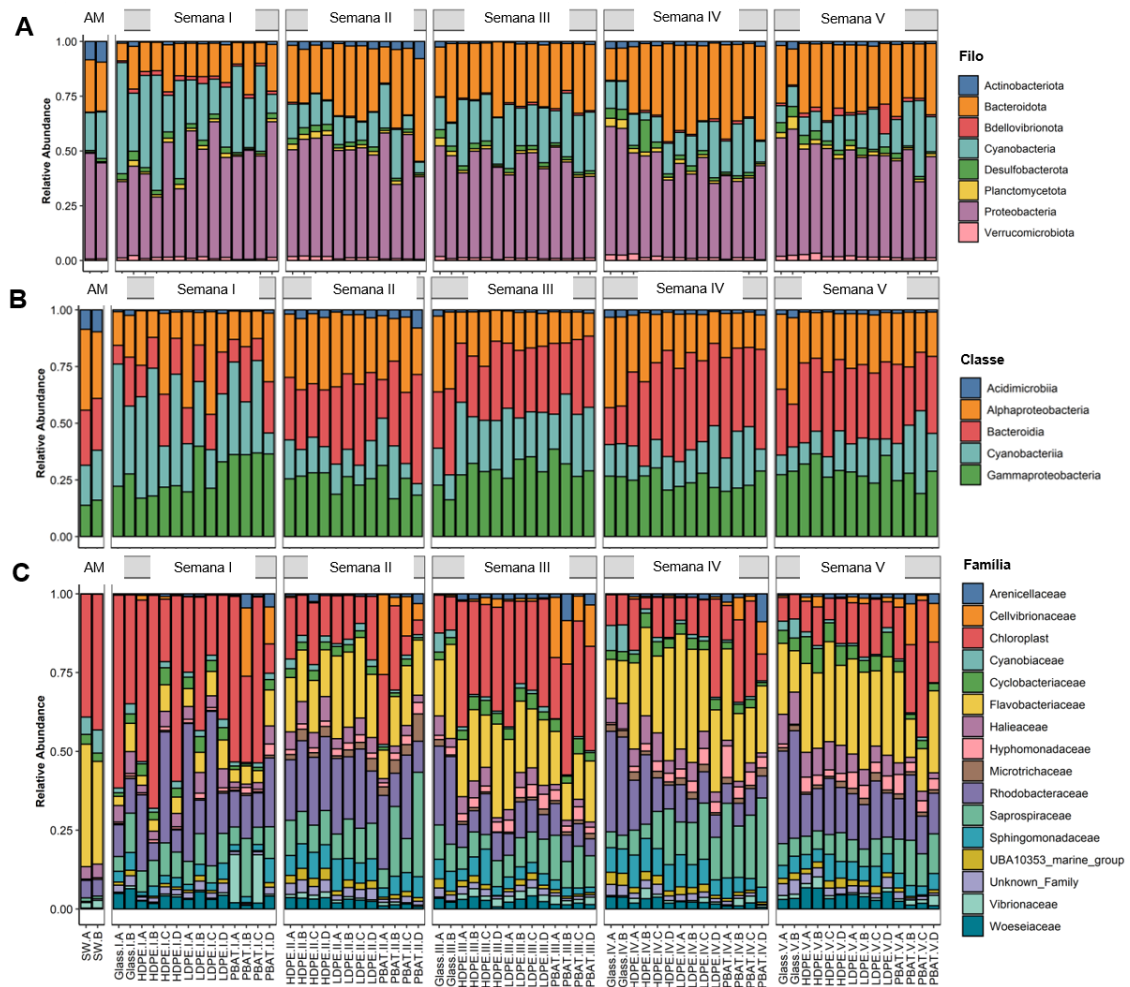


Figura 9. Abundâncias relativas da composição taxonômica a nível de filo (A), classe (B) e família (C) na água do mar (AM), Vidro, PBAT (Tereftalato de adipato de polibutileno), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (poli(butileno adipato co-tereftalato)) durante as cinco semanas de exposição. As caixas cinzas no topo indicam o período de exposição na figura.

Tabela 5. Frequência relativa divididos por tempo de exposição dos filios identificados no experimento *in situ*. Os valores maiores estão representados à esquerda e os menores a direita.

Filo	Semana I	Semana II	Semana III	Semana IV	Semana V
Actinobacteriota	0.006	0.039	0.005	0.013	0.014
Bacteroidota	0.145	0.25	0.25	0.35	0.25
Bdellovibrionota	0.02	0.004	0.006	0.014	0.05
Cyanobacteria	0.29	0.12	0.2	0.115	0.175

Desulfobacterota	0.013	0.019	0.014	0.053	0.023
Planctomycetota	0.007	0.038	0.007	0.013	0.014
Proteobacteria	0.4	0.45	0.4	0.35	0.34
Verrucomicrobiota	0.007	0.025	0.007	0.011	0.038

Tabela 6. Frequência relativa e amplitude dos valores (maiores e menores) divididos por tipos de substrato dos filós identificados no experimento *in situ*. Os valores maiores estão representados à esquerda e os menores a direita.

Filo	Vidro	PEAD	PEBD	PBAT	Água do mar
Actinobacteriota	0.019	0.015	0.017	0.037	0.085
Bacteroidota	0.215	0.28	0.27	0.245	0.225
Bdellovibrionota	0.215	0.018	0.066	0.006	0.003
Cyanobacteria	0.6	0.275	0.17	0.215	0.19
Desulfobacterota	0.0245	0.074	0.02	0.013	0.010
Planctomycetota	0.065	0.017	0.014	0.010	0.004
Proteobacteria	0.199	0.41	0.475	0.47	0.455
Verrucomicrobiota	0.014	0.017	0.013	0.008	0.006

Grupos bacterianos em nível de classe e família variaram em abundância e co-ocorrência entre os tipos de substrato ao longo das cinco semanas do experimento *in situ* (**Figura 9B e 9C**). Foi observado, após a primeira semana de exposição, uma maior dominância nos substratos das famílias da classe Cyanobacteriia (42-24%) e das classes Gammaproteobacteria (36-19%) e Alphaproteobacteria (30-16%) (Ambas classes do filo Proteobacteria), principalmente as famílias Rhodobacteraceae, Saprospiraceae e

membros do Cloroplasto (**Figura 9C**). A família Flavobacteriaceae foi relativamente mais abundante em PEBD e PEAD, e a família Vibrionaceae em PBAT. Além disso, a família Halieaceae foi relativamente mais abundante em vidro. Ao analisar também as ASVs mais abundantes, apesar da presença de outros grupos taxonômicos, a primeira semana se destacou pela família Rhodobacteraceae e membros do grupo “Cloroplasto” do filo Cyanobacteria (**Figura 10**).

Após duas semanas de exposição, foi observada uma diminuição na diferença entre as composições das comunidades microbiana entre os diferentes substratos, com as classes Bacteroidia (33-26%) e Alphaproteobacteria (30-25%) e Gammaproteobacteria (27-23%) dominando as matrizes plásticas (**Figura 9A e B; Tabelas 5, 6 10**). As famílias prevalentes variaram em abundância entre os polímeros, por exemplo, foi observada uma maior abundância em PEBD e PEAD por Rhodobacteraceae (21%), Flavobacteriaceae (24-16%), Cloroplasto (16-14%), Saprospiraceae (10%) e Sphingomonadaceae (7%) (**Figura 9C**). O PBAT, apresentou, além das mesmas famílias dominantes observadas nos demais plásticos, diferenças nas abundâncias em: Saprospiraceae (18%), Rhodobacteraceae (17,5%), Flavobacteriaceae (15%), Cloroplasto (15%), exceto Cellvibrionaceae (11%) que foi destaque apenas neste substrato (**Figura 9C**). Ao analisar as ASVs mais abundantes, o mesmo padrão foi encontrado: as famílias predominantes foram Flavobacteriaceae, Saprospiraceae e Sphingomonadaceae (**Figura 10**). As famílias dominantes no PBAT foram as mesmas dos outros plásticos, exceto a família Cellvibrionaceae, que se destaca apenas neste substrato (**Figura 10**).

Após as amostras serem expostas por três semanas ao ambiente natural, Gammaproteobacteria (31-29%), foi a classe dominante nas superfícies poliméricas seguida por Bacteroidia (29-27%) e Cyanobacteriia (25-25%) (**Figura 9A e 9B; Tabelas 5, 6 10**). As famílias que foram mais abundantes em PEBD, PEAD e PBAT incluíram: o grupo classificado como Cloroplasto, Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae e Saprospiraceae (**Figura 9C**). Em relação as ASVs mais abundantes, na semana III, as famílias que se destacaram foram as mesmas da semana dois: Flavobacteriaceae, Saprospiraceae e Sphingomonadaceae, exceto a família Cellvibrionaceae, destaque apenas em PBAT (**Figura 10**).

Após quatro e cinco semanas de exposição, as diferenças entre as composições das comunidades entre as diferentes superfícies dos polímeros diminuíram, já não apresentando diferença significativa na estrutura das comunidades (**Tabela 3**). As classes mais abundantes foram Bacteroidia (40-32%), Gammaproteobacteria (31-24%) e

Cyanobacteriia (22-13%) (**Figura 9A e 9B; Tabelas 5, 6 10**). Os grupos bacterianos no nível da família variaram em abundância entre as superfícies do polímero. As famílias que foram mais abundantes nas superfícies PEBD, PEAD e PBAT na semana IV incluíram: Flavobacteriaceae (31-22%), Rhodobacteraceae (14-7%), Saprospiraceae (22-14%), Sphingomonadaceae (9-5%) e Cloroplasto (19-11%) (**Figura 9C**). Após cinco semanas de exposição, as famílias prevalentes entre as superfícies dos polímeros eram as mesmas, porém com diferentes abundâncias relativas: Flavobacteriaceae (29-20%), Cloroplasto (23-10%), Rhodobacteraceae (15-14%), Saprospiraceae (12- 6%) e Sphingomonadaceae (5-4%) (**Figura 9C**). Ao visualizar as ASVs mais abundantes, os grupos bacterianos no nível de família pouco variaram em abundância entre as superfícies dos polímeros, as famílias que eram mais abundantes nas superfícies PEBD, PEAD e PBAT na semana quatro incluíam: Flavobacteriaceae, Rhodobacteraceae, Saprospiraceae, Sphingomonadaceae e Cloroplasto, as quais se mantiveram após cinco semanas de exposição. O mesmo padrão foi observado para amostras de vidro durante as quatro e cinco semanas de exposição (**Figura 10**). O vidro foi altamente dominado por famílias das classes Alphaproteobacteria (40-36%) e Gammaproteobacteria (28-26%), principalmente as famílias Rhodobacteraceae, Flavobacteriaceae, Cyanobiaceae e Halieaceae e membros do Cloroplasto.

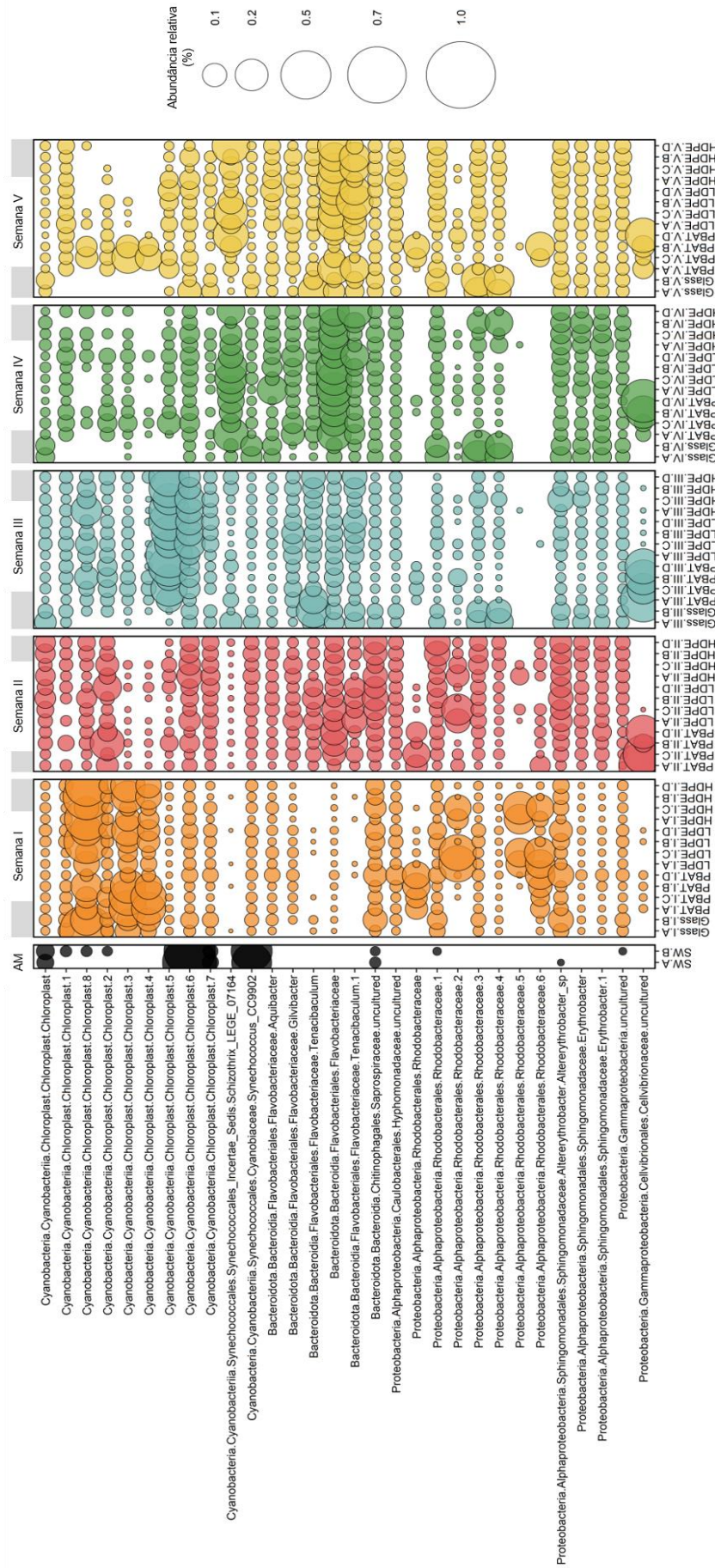


Figura 10. Classificação das 30 ASVs mais abundantes na água do mar (AM), Vidro, PBAT poli(butileno adipato co-terefalato), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade) durante as cinco semanas de exposição. O tamanho dos círculos está relacionado à abundância relativa de cada ASV.

5.4. Abundância diferencial e indicadores de espécies

As diferenças entre a colonização dos plásticos e das superfícies do vidro foram evidentes quando examinadas em níveis de família por análise de abundância diferencial (**Figura 11**). Das 42 famílias presentes, 31 foram significativamente mais abundantes em todas as superfícies dos polímeros (diferentes tipos de Plásticos) quando comparadas ao vidro. Essas ASVs eram principalmente representantes das famílias Oleiphilaceae, Alcanivoraceae, Cellvibrionaceae, Sphingobacteriaceae, Vibrionaceae, Granulosicoccaceae, Microtrichaceae, Nitrosopumilaceae, Nitrospiraceae, OM182_clade, Thiotrichaceae, Sphingomonadaceae, Bdellovibrionaceae, Cyclobacteriaceae, Hyphomonadaceae, Microscillaceae, Pseudoalteromonadaceae, Colwelliaceae, Arenicellaceae, Flavobacteriaceae, Saprospiraceae (**Figura 11**).

As amostras de vidro exibiram apenas 5 famílias significativamente mais abundantes em comparação com as superfícies poliméricas (Plástico): Halieaceae, Sandaracinaceae, Cyanobiaceae, Methylobacteriaceae e Thiomicrospiraceae (**Figura 11**). ASVs Representantes das famílias Rhizobiaceae, Chloroplast e Rhodobacteriaceae foram significativamente mais abundantes em amostras de polímeros e vidro em conjunto, ou seja, níveis taxonômicos mais específicos destas famílias podem ter preferências de diferentes substratos.

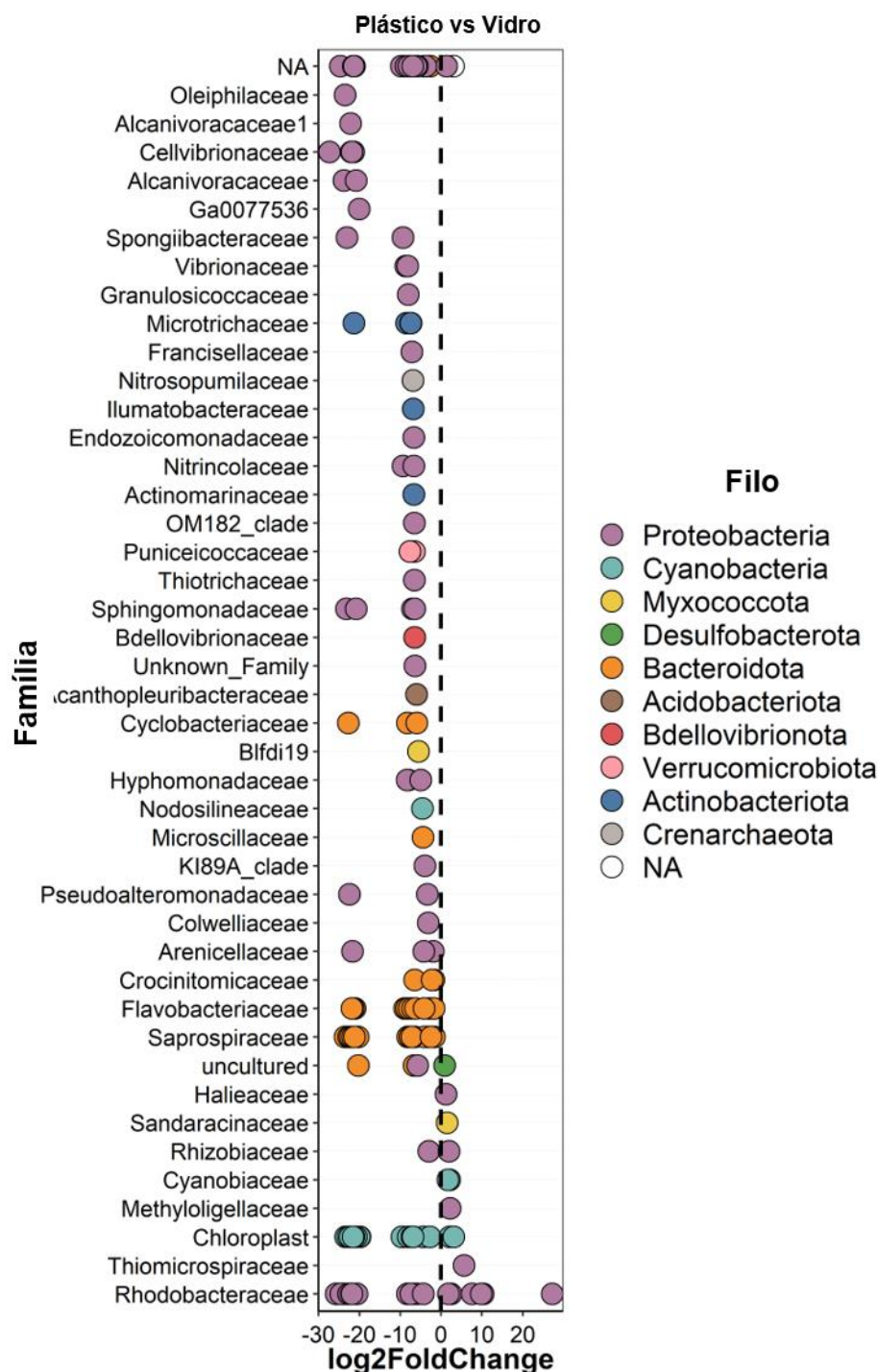


Figura11. Variante de sequência de *amplificons* diferencialmente abundante (ASV) comparando Plástico (PEAD, PEBD e PBAT em conjunto) e vidro. Polímeros: PBAT ((poli(butileno adipato co-tereftalato)), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade). ASVs significativos ($p_{adj} < 0,05$) são representados por pontos de dados únicos, agrupados por família no eixo y e por cor de acordo com o filo taxonômico do qual o ASV se origina. Valores positivos ($\log_2\text{FoldChange}$) indicam ASVs significativamente mais abundantes em amostras de vidro; Valores negativos indicam o contrário. Táxons não cultivados foram representados por “uncultured_”.

A composição da comunidade microbiana entre diferentes polímeros e a superfície do vidro foi também investigada utilizando a análise de indicadores de espécies (**Figura 12A e 12B**). Comparamos a abundância relativa e a frequência relativa de cada ASV para

identificar aquelas cujo são especificamente associados a apenas um tipo de substrato (único) e aqueles cujo nicho engloba todos os polímeros e superfícies de vidro (compartilhados). A análise de indicadores de espécie demonstrou que as ASVs das comunidades microbianas variaram entre as diferentes superfícies artificiais. Entre os polímeros, o PBAT abrigou os conjuntos mais altos de ASVs únicos ($n = 87$, **Figura 12A**). Algumas ASVs exclusivas do PBAT revelaram a presença de grupos taxonômicos específicos, os quais pertenciam principalmente às ordens Saccharimonadales, Vampirovibrionales, Cellvibrionales, Rhodosspirillales e OM182_clade e família Cellvibrionaceae e filos candidatos Myxococcota e Gracilibacteria (**Figura 12B**). Em contraste, PEBD e PEAD, abrigavam menos ASVs únicos ($n=7$ e $n= 5$, respectivamente) (**Figura 12A**). As ASVs também representaram grupos exclusivos presentes no PEBD, as quais pertencem às famílias Alcanivoracaceae e Desulfuromonadaceae. Também foram identificadas famílias exclusivas nas amostras de PEAD e eram representantes da ordem Babelialesm do gênero Candidatus Endobugala e da família Cellvibrionaceae (**Figura 12B**). Foi observado também que todos os polímeros (PEBD, PEAD e PBAT) compartilharam algumas ASVs ($n=33$) e as mesmas abrigam grupos taxonômicos exclusivos desse agrupamento. Esses grupos são pertencentes às famílias Actinomarinaceae, Arenicellaceae, Pseudoalteromonadaceae, Blfdi19 e representantes da ordem Flavobacteriales. PEBD e PEAD compartilharam 18 ASVs pertencentes a Ga0077536, Nitrincolaceae e Schleiferiaceae e representativos da ordem Rhizobiales (**Figura 12A e 12B**). Foi observado que os polímeros PEBD e PBAT compartilharam 24 ASVs e compartilham também grupos exclusivos classificados na família Kangiellaceae e representantes da ordem Chitinophagales (**Figura 12A e 12B**).

Entre todos os substratos, foi observado no Vidro o maior número de ASVs únicas ($n = 317$), as quais pertenciam principalmente às famílias Anaerolineaceae, Clostridiaceae, classe Bacilli, Gimesiaceae, Legionellaceae, Peptostreptococcaceae, Leptospiraceae e ordens Microtrichales, Planctomycetales e Rickettsiales (**Figura 12B**). O vidro compartilhou menos ASVs com PEAD, PEBD e PBAT ($n=20$, $n=1$ e $n=2$, respectivamente). Entre as amostras de vidro e PEAD foram compartilhadas ASVs da classe Microvibrinaceae, PeM15 e Verrucomicrobiae (**Figura 12B**). Quando analisadas as amostras de Vidro, PEBD e PEAD observou-se um maior número de ASVs compartilhados ($n=124$), principalmente pertencentes às famílias Ectothiorhodospiraceae, Kiloniellaceae, Vibrionaceae, Sva0485, EPR3968-O8a-Bc78 e ordem Oligoflexales (**Figura 12B**).

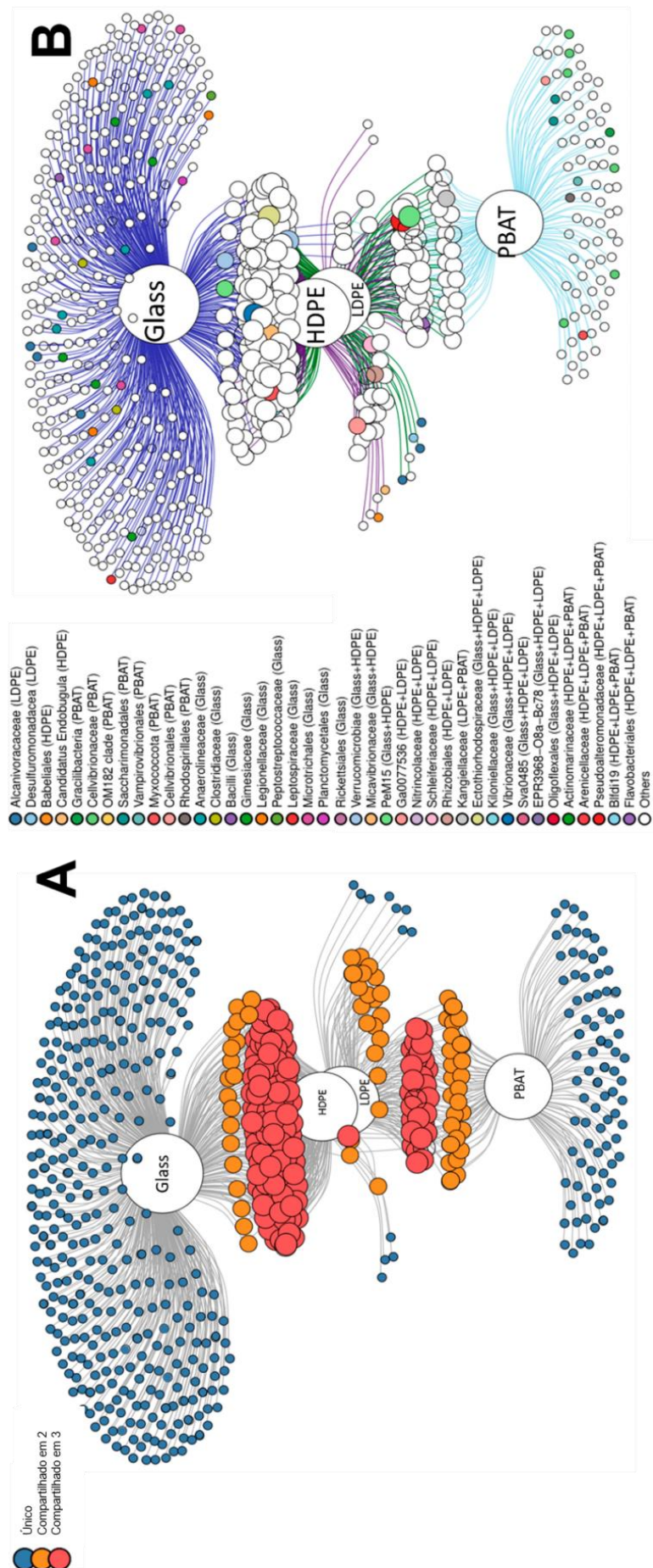


Figura 12. Resultados da análise de espécies indicadoras para vidro, PBAT (poli (butileno adipato co-terefalato)), PEAD (polietileno de alta densidade) e PEBD (polietileno de baixa densidade). A rede (A) indica a correlação (representada por bordas) de e ASVs compartilhados (entre 2 e 3 superfícies artificiais diferentes) A rede (B) destaca a classificação taxonômica dos nós que pertenciam às ordens mais representadas (ou seja, aqueles que representam > 1% de abundância relativa em pelo menos uma amostra). Taxons não dominantes (isto é, < 1%) são relatados como “Outros”.

5.5. Inferência funcional

A partir da análise de predição funcional utilizando a classificação taxonômica das sequências de 16S rRNA, foi possível identificar 25 categorias funcionais (**Figura 13**), que foram identificadas sem variação e se apresentaram com a mesma abundância entre os tipos de plásticos, bem como predições funcionais que apresentaram variações. Funções relacionadas a fototrofia (fototrofia, cianobactérias fotossintéticas e cloroplastos), quimioheterotrofia (quimioheterotrofia, quimioheterotrofia aeróbica) e funções relacionadas à degradação de xileno e celulose, foram identificadas e preditas de forma igualitária entre os tipos de plástico, não apresentando diferenças entre os substratos (**Figura 13**). Funções relacionadas ao enxofre como respiração celular carregadas a base de compostos de enxofre como o tiosulfato está em maior destaque no PEAD (**Figura 13**), e funções relacionadas à degradação de hidrocarboneto e degradação de hidrocarboneto alifático não metano estão em maior abundância em PEBD (**Figura 13**). Funções relacionadas ao ciclo do nitrogênio como redução de nitrato, fixação de nitrogênio e respiração relacionada ao nitrogênio se apresentaram como mais abundantes no PBAT (**Figura 13**).

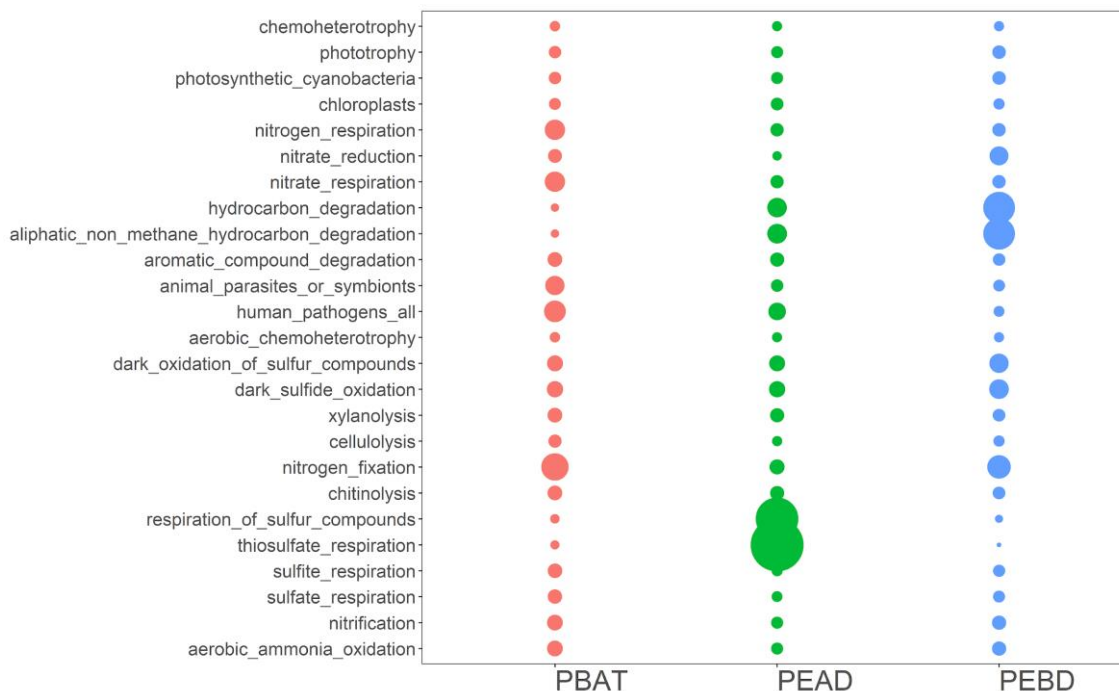


Figura 13. Análise de inferência funcional utilizando o banco de dados do FAPROTAX. Quanto maior abundância de presença da função, maior vai ser o tamanho da bola, ao passo que quanto menor a abundância da função, menor vai ser o tamanho da bola. O polietileno de alta densidade (PEAD) está em rosa, polietileno de baixa densidade (PEBD) está em verde e o (poli(butileno adipato co-tereftalato)(PBAT) está em azul.

6 DISCUSSÃO

Os estudos de micro-organismos associados ao plástico aumentaram nos últimos anos (AMARAL-ZETTLER et al., 2020; WRIGHT et al., 2021). No entanto, as informações sobre o padrão de desenvolvimento dessas comunidades permanecem limitadas, especialmente em experimentos de exposição *in situ* em regiões tropicais. No presente estudo, investigamos a estrutura da comunidade de biofilmes microbianos em três diferentes tipos de plásticos em uma baía tropical, localizada no Saco da Ribeira em Ubatuba.

Nossos resultados estão de acordo com observações anteriores de que a riqueza e a diversidade microbiana aumentaram ao longo do período de exposição em todos os substratos (ODOBEL et al., 2021; ERNI-CASSOLA et al., 2020; PINTO et al., 2019). Segundo ZHANG e colaboradores (2022), a presença de plásticos no oceano pode atuar como novos nichos ecológicos para colonização microbiana, selecionando novos grupos taxonômicos e levando a mudanças na diversidade, como visto em nossos resultados. Quanto à baixa abundância na colonização inicial, essa condição pode ser explicada pela alta taxa de hidrofobicidade dos plásticos, bem como pela baixa biodisponibilidade de nutrientes (LOBELLE; CUNLIFFE, 2011; XU et al, 2019). Odobel e colaboradores (2021) sugeriram que os primeiros colonizadores da plastisfera eram táxons menos abundantes ou raros na água do mar, espécies normalmente oportunistas capazes de crescer e se tornar a “espécie central” vivendo em plásticos.

O aumento da riqueza e diversidade, com o passar das semanas de exposição, pode ser causada pelo aumento da biodisponibilidade metabólica pelos diferentes grupos microbianos que colonizam o biofilme, o que pode causar alterações na hidrofobicidade (XU et al, 2019), tornando o ambiente mais favorável para novos colonizadores. Estes fatores favorecem uma maior diversidade metabólica, promovendo o desenvolvimento de uma comunidade microbiana cada vez mais complexa (LINARES et al., 2018; XU et al., 2019; ZHANG et al., 2022).

A maioria dos trabalhos que compararam plásticos com e sem amido foram em amostras de solo ou sedimentos (BANDOPADHYAY et al., 2020; RÜTHI et al., 2020; VANNINI, Claudia et al., 2021), onde todos identificaram que as comunidades microbianas podem ser afetadas pela presença do amido. Nos resultados encontrados em nosso trabalho, essa diferença não foi identificada. Porém estudos que tenham como foco identificar a influência deste tratamento levando em consideração diferentes tipos de

plásticos biodegradáveis devem ser realizados, levando-se em consideração a crescente importância destes produtos para a remediação da problemática da poluição global por plásticos.

A análise de beta diversidade mostrou que a estrutura da comunidade foi influenciada pelo tipo de substrato e período de exposição. Junto com o aumento significativo demonstrado nos resultados da alfa diversidade, a estrutura das comunidades também se modifica ao longo do tempo, reforçando sua influência nas comunidades da plastisfera e sugerindo um claro processo de sucessão ecológica ao longo do tempo de exposição. Foi identificada diferença significativa entre as comunidades microbianas dos plásticos e da água do mar, padrão identificado por Zettler et al., (2013). Essa diferença pode ser explicada pela colonização e formação do biofilme da plastisfera, muitas vezes caracterizados por interações complexas, como foi discutido anteriormente (XU et al., 2019; LINARES et al., 2018; XU et al., 2019; ZHANG et al., 2022). A influência na estrutura da comunidade, se comparadas com a água do mar, reforça e indica que os plásticos podem atuar como novos nichos ecológicos para a colonização microbiana (MIAO et al., 2019, WANG et al., 2020).

A estrutura da comunidade também foi influenciada pelo tipo de substrato e essa diferença pode estar relacionada a fatores que modulam a forma de adesão celular às matrizes plásticas, como a polaridade (ZHANG et al., 2015), fator este que pode explicar a grande diferença encontrada entre plástico (apolar) e vidro (polar). Diferenças na estrutura das comunidades microbianas também foram encontradas entre os diferentes tipos de plásticos, como o PBAT e Polietilenos (PEAD e PEBD), essas diferenças podem estar relacionadas às características físico-químicas de cada plástico, que pode ser inicialmente preferível para diferentes grupos microbianos, como rugosidade, níveis de hidrofobicidade e níveis de degradabilidade (PBAT é classificado como sendo um plástico biodegradável diferentemente do polietileno que é classificado como não-biodegradável) (AMARAL-ZETTLER et al., 2020; LOBELLE; CUNLIFFE, 2011). Entre as semanas IV e V não foi identificada diferença significativa entre as estruturas das comunidades, demonstrando que as características físico-químicas, mencionadas anteriormente, possuem um maior impacto na colonização inicial da comunidade (RUMMEL et al., 2017).

Para todo o material estudado, PBAT, Polietilenos (PEBD e PEAD) e amostras de vidro de todas as datas de amostragem, destacaram-se três fases sucessivas clássicas de

maturação de formação de biofilme descritas em superfícies artificiais imerso na água do mar, (vidro, acrílico, aço e plásticos) são elas: primo-colonização ou colonização primárias, crescimento e maturação (CARUSO et al., 2020). Foi observada uma abundância relativamente alta de ASVs nas superfícies artificiais associadas a grupos fotossintéticos e heterotróficos do filo Cyanobacteria/Chloroplast e família Rhodobacteraceae (Proteobacteria), respectivamente. Cianobactérias e diatomáceas foram encontradas como colonizadores dominantes em detritos plásticos (MICHELS et al., 2018; KETTNER et al., 2019; AMARAL-ZETTLER et al., 2020). As cianobactérias entre os representantes fotossintéticos contribuem para tornar a produção primária líquida positiva na plastisfera e consequentemente fixando o C na comunidade e produção de EPS, o que fornece a fonte de energia inicial para os colonizadores primários e prepara o microambiente para outros grupos (BRYANT *et al.*, 2016). Representantes da família Rhodobacteraceae podem crescer rapidamente mesmo em baixas concentrações de nutrientes, produzir antibióticos para competir com outros táxons bacterianos e, assim, modular a composição do biofilme (SCHLUNDT *et al.*, 2019). Esta família pode iniciar com sucesso o desenvolvimento de biofilme pela produção de EPS (KVIATKOVSKI; MINZ, 2015), convertendo o baixo estado de nutrientes do biofilme para um estado de alto teor de nutrientes (DANG *et al.*, 2016). Os membros da família Rhodobacteraceae são caracterizados por uma alta diversidade ecológica (PUJALTE *et al.*, 2014) sendo atores-chave nos ciclos de carbono e enxofre orgânico, parte do seu metabolismo inclui a utilização de compostos orgânicos e inorgânicos, matéria orgânica derivada do fitoplâncton (BAKENHUS et al., 2017), oxidação de enxofre, fotossíntese anoxigênica aeróbia, oxidação de monóxido de carbono e produção de metabólitos secundários (PUJALTE et al., 2014). A predominância de grupos fotossintéticos e de grupos heterotróficos na primeira semana, indica que eles desempenham um papel fundamental na fase inicial da sucessão ecológica da plastisfera, preparando o microambiente para a colonização de novos colonizadores.

Alguns autores têm descrito que na fase seguinte do desenvolvimento do biofilme, as atividades e taxas metabólicas microbianas aumentam e, consequentemente, a hidrofobicidade das superfícies plásticas diminui (PINTO et al., 2019; Wang et al., 2021), no entanto, não se sabe como as propriedades físico-químicas dos plásticos são alteradas pelo microbioma da plastisfera (WANG *et al.*, 2021). Em nosso experimento *in situ*, na segunda e terceira semanas, a abundância de representantes fotossintéticos diminui e, a

riqueza aumenta. Esses resultados sugerem um biofilme mais maduro e com alta disponibilidade de recursos favoráveis à colonização de outros micro-organismos.

Nesta etapa (segunda e terceira semanas), considera da fase de crescimento, a abundância das famílias Flavobacteriaceae (filo Bacteroidota), Sphingomonadaceae (classe Alphaproteobacteria) e Saprospiraceae (filo Bacteroidota) aumentaram em todos os tipos de plástico, exceto Cellvibrionaceae (classe Gamaproteobacteria), com destaque apenas em PBAT. Recentemente, Agostini e colaboradores (2021) descreveram a família Flavobacteriaceae em um biofilme PEAD e PEAD-OXO em um experimento no Oceano Atlântico Sul em profundidade de 1500 ms. Espécies desta família demonstram uma interação negativa com as diatomáceas (AMIN; PARKER; ARMBRUST, 2012), sugerindo que ela pode atuar como um controlador populacional da comunidade do biofilme e desempenhar um papel fundamental na interação trófica na plastisfera. Representantes da família Flavobacteraceae também mostraram potencial para degradar policaprolactona poliéster (plástico alifático biodegradável), que é um composto complexo. Função semelhante também foi identificada em membros das famílias Sphingomonadaceae e Saprospiraceae (DELACUVELLERIE et al., 2019; ROAGER; SONNENSCHNEIN, 2019). Além disso, as famílias Sphingomonadaceae e Saprospiraceae demonstraram potencial para degradar hidrocarbonetos aromáticos (OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016; OBERBECKMANN; LABRENZ, 2020). Estudos anteriores descreveram a dominância das famílias Sphingomonadaceae e Saprospiraceae em biofilmes de PET e PEAD em diferentes condições ambientais, como biofilmes enriquecidos em laboratório e plásticos flutuantes e do fundo do mar (OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016; DELACUVELLERIE et al., 2019, BRYANT et al., 2016; OBERBECKMANN; LABRENZ, 2020).

A família Cellvibrionaceae foi abundante apenas na superfície do PBAT. Os membros desta família foram identificados anteriormente apenas no microbioma PE, PLA e PVC (Cheng et al., 2021; PINTO et al., 2019). O PBAT mostrou ASVs com riqueza e diversidade observados significativamente menores durante todos os experimentos *in situ* em comparação com as outras superfícies artificiais e além disso, a estrutura da comunidade foi significativamente diferente de outras superfícies artificiais. Isso pode ser porque o PBAT é um polímero biodegradável, diferente do PEAD, PEBD e vidro, reforçando a influência do tipo de plástico na seleção de diferentes grupos microbianos. O PBAT é um copoliéster alifático-aromático sintético biodegradável, no qual os monômeros aromáticos contribuem para a estabilidade térmica e propriedades

mecânicas e os monômeros alifáticos proporcionam flexibilidade e biodegradabilidade (GUO et al., 2015). Todas estas características em conjunto podem estar selecionando um microbioma único.

No estágio sucessional posterior de desenvolvimento do biofilme (Semanas IV e V), após 36 dias do início do experimento e exposição dos polímeros ao ambiente marinho natural, não foram detectadas diferenças significativas na estrutura da comunidade. Este resultado pode indicar que o biofilme começou a se estabilizar na semana IV do experimento *in situ* com um nível considerável de maturação e manutenção da comunidade. As famílias Flavobacteriaceae, Sphingomonadaceae e Saprospiraceae ainda eram grupos dominantes em todas as superfícies artificiais, exceto para PBAT (a família Cellvibrionaceae ainda era dominante apenas na superfície do PBAT). Essas famílias apresentaram uma pequena variação de abundância em todas as superfícies entre quatro e cinco semanas do experimento, porém os resultados não foram significativos. Este resultado pode indicar que após 36 dias de exposição, o microbioma da plastisfera foi possivelmente mais influenciado por processos ecológicos externos e internos do biofilme do que por características relacionadas à superfície. Esse resultado também reforça a evidência de que o efeito do substrato (características físico-químicas) tende a ser mais influente nos estágios iniciais do que em estágios mais avançados do biofilme. As variabilidades na estrutura das comunidades parecem ser regidas por fatores ambientais como luz, salinidade, turbidez e condições relacionadas à cadeia trófica (HUGGETT; NEDVED; HADFIELD, 2009; CARUSO et al., 2020), o que pode ser um dos fatores que explicam o aumento da similaridade entre as comunidades ao longo das semanas, uma vez que esses fatores foram os mesmos para todos os substratos.

Quanto à análise de abundância diferencial, a comparação taxonômica em nível de família entre os polímeros (Plástico) e as amostras de vidro demonstrou diferenças claras, Figura 11. Das 31 famílias identificadas como diferencialmente abundantes em amostras relacionadas ao agrupamento “Plástico”, 21 são descritas em estudos anteriores como membros da plastisfera marinha (OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016; WU et al., 2020; WEN et al., 2020; KIRSTEIN et al., 2019; ZHURINA et al., 2022; HARVEY et al., 2020; AMIN; PARKER; ARMBRUST, 2012; PINTO et al., 2019; PUROHIT; CHATTOPADHYAY; TELI, 2020; AGOSTINI et al., 2021; WANG et al., 2021). No entanto, as famílias Francisellaceae, Ilumatobacteraceae, Endozoicomonadaceae, Actinomarinaceae, Puniceicoccaceae, clado KI89A, Acanthoppleuribacteraceae, grupo Blfdi19, Nodosilineaceae e Crocinitomicaceae não

foram descritas em estudos anteriores, como membros da plastisfera marinha. Este resultado sugere que essas famílias podem ter sido naturalmente selecionadas pelo ambiente tropical onde este estudo foi realizado e também podem ser importantes componentes da plastisfera, além de desempenhar papéis que ainda não foram elucidados dentro da comunidade microbiana. Análises de fatores físico-químicos do ambiente devem ser executados em trabalhos futuros para o melhor entendimento da presença destes novos grupos bacterianos.

Das famílias identificadas como abundantemente diferentes associadas aos plásticos, discutidas no parágrafo anterior, destacam-se 5 famílias que podem ser potenciais riscos para a vida marinha. O aumento de sua abundância quando associado a matrizes plásticas e a capacidade do plástico de transportar comunidades microbianas por longas distâncias (LACERDA et al., 2019; LEAR et al., 2021) podem facilitar sua ação, pois estão diretamente associados à causa de doenças ou indiretamente na cadeia alimentar de diferentes classes de animais, plantas e também em macroalgas. São elas: Vibrionaceae, Francisellaceae, Sphingomonadaceae, Flavobacteriaceae e Saprospiraceae. As famílias Vibrionaceae, Flavobacteriaceae e Francisellaceae possuem representantes diretamente associados a doenças de peixes e podem causar grande devastação em populações de peixes como já relatado em ambientes naturais e também em aquicultura (DUCHAUD et al., 2007; LEUNG; BATES, 2013; MOHAMAD et al., 2019; SHAHIN et al., 2018; SMÅGE et al., 2016), esta última também está diretamente relacionada a doenças em humanos como a tularemia (STEINER; FURUYA; METZGER., 2014). Às famílias Sphingomonadaceae e Saprospiraceae foram identificadas em trabalhos recentes como potenciais causas ou associadas a doenças em corais e algumas macroalgas (ROSALES et al., 2019; HURTADO-MCCORMICK et al., 2021), bem como representantes da família Vibrionaceae, que foram identificados como associados a doenças e branqueamento de corais (FENG et al., 2020). Trabalhos visando um melhor entendimento dos grupos microbianos que crescem na plastisfera e são carregados pelo plástico, com o intuito de analisar o seu potencial patogênico, seus genes patogênicos, bem como a resistômica, devem ser feitos nos próximos anos.

A análise dos indicadores de espécies mostrou que há ASVs específicas para cada tipo de substrato. Em relação aos plásticos, o PBAT foi o substrato que apresentou mais ASVs exclusivas (n=87), enquanto o PEBD e PEAD (n=2; n=3) (Fig. 12), compartilharam 18 ASVs entre si. O vidro apresentou o maior número de ASVs únicas (n=317). As diferenças no número de ASVs únicas e compartilhadas reforçam mais uma

vez a importância das características estruturais físicas e químicas nas comunidades microbianas que podem ser selecionadas, uma vez que o PBAT possui um número relativamente maior de ASVs únicas em comparação aos PEs, que possuem poucas ASVs únicas e muitas compartilhadas entre si. Foi observado o mesmo padrão nas amostras de vidro, que possui maior número de ASVs únicas, o que pode ser explicado pela grande diferença em sua estrutura em relação aos plásticos como já discutido anteriormente.

A análise dos indicadores de espécies também proporcionou a identificação de grupos taxonômicos exclusivos para cada substrato. Em relação ao PBAT, foram identificados 8 grupos exclusivos, são eles: representantes do filo Cellvibrionaceae, candidato Gracilibacteria, ordem Saccharimonadales, ordem Vampirovibrionales, filo Myxococcota, ordem Cellvibrionales, ordem Rhodospirillales e OM182_clade. Todos os táxons já foram previamente indicados em estudos de plastisfera (PINTO et al., 2019; ZHANG et al., 2022; RÜTHI et al., 2020; COONS et al., 2021; ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013; HARVEY et al., 2020; AGOSTINI et al., 2021), menos a ordem Vampirovibrionales, que identificamos pela primeira vez como membro da plastisfera.

. O filo Myxococcota foi descrito anteriormente como um potencial grupo produtor da enzima PHA despolimerase, produto que auxilia na degradação do bioplástico PHA (VILJAKAINEN; HUG, 2021). Em geral, apesar de já terem sido descritos anteriormente, pouco se sabe sobre o papel desempenhado por esses grupos na comunidade associada ao plástico. Quanto ao PEBD, também foram identificadas famílias exclusivas como Alcanivoraceae e Desulfuromonadaceae, membros da família Alcanivoraceae são caracterizados como bactérias hidrocarbonoclasticas obrigatórias (OHCB), (YAKIMOV et al., 2019) e tem sido amplamente descrita como membro colonizador do Polietileno (PINTO et al., 2019; ROAGER; SONNENSCHN, 2019; DELACUVELLERIE et al., 2019). A família Desulfuromonadaceae não foi descrita anteriormente em estudos sobre a plastisfera, podendo ser a primeira sua descrição neste ambiente. Representantes da ordem Babeliales e do gênero Candidatus Endobugala foram os grupos exclusivos identificados no PEAD, sendo este o primeiro trabalho em que são identificados como componentes da plastisfera.

No agrupamento formado por PEBD e PEAD, também foram identificados 4 grupos microbianos exclusivos, com destaque para as famílias Nitrincolaceae e Schleiferiaceae. A família Nitrincolaceae, previamente identificada na plastisfera marinha (AGOSTINI et al., 2021), pode estar contribuindo para o ciclo do nitrogênio no

biofilme (HUANG et al., 2021), este ciclo é importante não só para os colonizadores da plastisfera, mas também sua relação direta com o processo de biodegradação do PE, recentemente descrito por Peixoto et al. (2022). A família Schleiferiaceae não foi previamente descrita em estudos sobre a plastisfera, porém, um trabalho recente isolou uma espécie desta família que foi enriquecida em um consórcio visando a biodegradação do Polietileno (LIU et al., 2021), sugerindo que o polietileno pode ter selecionado representantes desta família nas amostras de PE. Entre as ASVs compartilhados entre PEBD e PBAT, também foram identificados grupos exclusivos, já tendo sido identificados em trabalhos anteriores sobre plastisfera (KELLY et al., 2022; VAKSMAA et al., 2021). A família Kangiellaceae tem seu papel ecológico e seu potencial metabólico ainda pouco conhecidos (WANG et al., 2018), a ordem Chitinophagales, por outro lado, possui representantes amplamente conhecidos com seu potencial para degradar compostos de carbono recalcitrantes como a quitina e celulose (HOU et al., 2021), além de sintetizar EPS (VU et al., 2009), podendo auxiliar na manutenção do biofilme.

Por fim, também foram identificados nos táxons microbianos indicadores que apresentaram como nicho preferencial o agrupamento que engloba todos os tipos de plástico (PEAD, PEBD e PBAT). Algumas não relatadas anteriormente (Actinomarinaceae e Blfdi19) e outras já identificadas em pesquisas anteriores, como as famílias Arenicellaceae (PINTO et al., 2019; ODOBEL et al., 2021), Pseudoalteromonadaceae (FRÈRE et al., 2018) e Flavobacteriales (VAKSMAA et al., 2021; ROAGER; SONNENSCHNEIN, 2019), os dois últimos grupos taxonômicos são amplamente discutidos na plastisfera por sua capacidade de degradar hidrocarbonetos (WRIGHT; LANGILLE; WALKER, 2021; VAKSMAA et al., 2021), esta função pode ser essencial na plastisfera, principalmente no que diz respeito à biodegradação do plástico.

Utilizando a predição metabólica do FAPROTAX, foi possível observar que a inferência do ciclo do carbono (C), nitrogênio (N) e enxofre (S), padrão identificado em outros estudos de plastisfera marinha (LI et al., 2021; ZHANG et al., 2022). Isso demonstrando que os biofilmes associados aos plásticos podem afetar a função do ciclo de alguns dos principais elementos do ecossistema, formando comunidades microbianas únicas na plastisfera (LI et al., 2021).

A presença de funções relacionadas a fototrofia está de acordo com a análise taxonômica, onde foi identificada abundância relevante de Cianobactérias e do grupo chamado “Cloroplasto”. A presença destas funções reforça a importância da fotossíntese

na plastisfera, funcionando como fonte energética inicial do biofilme em desenvolvimento, bem como na fixação de C (BRYANT *et al.*, 2016). A presença das funções de quimioheterotrofia e de quimioheterotrofia aeróbia sugerem um enriquecimento de heterótrofos nas matrizes plásticas, o que pode ser explicada pela capacidade da mesma em armazenar e reter o carbono orgânico e nitrogênio da água do mar circundante (SUN *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021), bem como uma provável utilização dos subprodutos da degradação do plástico. Funções relacionadas à degradação de compostos de difícil degradação também foram identificadas, como a degradação do xileno e celulose. Outra explicação por funções relacionadas à degradação de diferentes compostos, segundo LI e colaboradores (2021), se deve ao fato de que os plásticos são mais de 100 vezes hidrofóbicos que a água do mar (MATO *et al.*, 2001), dessa forma, haveria uma seleção de grupos com potencial para colonizar e possivelmente participar desses componentes. Micro-organismos presentes na plastisfera e que possuem a capacidade de degradar o xileno, já foram reportados anteriormente (PRINCE; AMANDE; MCGENITY, 2019) por ser um hidrocarboneto aromático. Hipóteses sobre o potencial de biodegradação do plástico ou de suas subunidades são levantadas (DELACUVELLERIE *et al.*, 2019) e merecem ser estudadas para o melhor entendimento e relação entre estes dois processos.

Funções relacionadas ao ciclo do enxofre foram destaque nas amostras relacionadas ao polietileno de alta densidade (**Figura 13**). Funções do ciclo do enxofre já foram identificadas anteriormente em outros trabalhos relacionados à plastisfera marinha. LI e colaboradores (2021) identificaram a oxidação de tiosulfato em abundância significativamente maior em amostras da plastisfera que na água do mar circundantes. O mesmo padrão foi identificado por XUE e colaboradores (2020), que relataram o domínio de ocorrência de funções relacionadas a oxidação e redução do enxofre na plastisfera.

Com relação ao PBAT, as funções relacionadas ao ciclo do nitrogênio foram mais abundantes, como a redução de nitrato, fixação de nitrogênio e respiração relacionada ao nitrogênio. Funções enriquecidas relacionadas ao ciclo do nitrogênio na plastisfera, foram identificadas em trabalhos anteriores (LUO *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2021). O nitrogênio é fundamental para as funções vitais da vida no ecossistema, e seus ciclos redox são essenciais para o metabolismo energético (WANG *et al.*, 2021). Segundo WANG e colaboradores (2021), o aumento ou diminuição da taxa de processos relacionados ao ciclo do nitrogênio também pode estar sendo influenciada pelo tipo de plástico, tamanho, topografia de superfície e biodisponibilidade da matriz do material, pois estas

influenciam diretamente a comunidade selecionada pelo tipo de plástico, o que pode explicar o aumento destas funções no PBAT. O ciclo do nitrogênio se mostrou importante não só para os colonizadores da plastisfera, mas também função importante da biodegradação do plástico. Recentemente PEIXOTO e colaboradores (2022) propuseram um modelo com o novo papel do metabolismo do nitrogênio na fragmentação e oxidação do plástico a partir da produção de Nox. Este processo foi descrito em polietileno, porém com o destaque de funções relacionadas ao ciclo do nitrogênio no PBAT, pode-se sugerir que o mesmo processo pode estar ocorrendo neste tipo de plástico.

De fato, o nitrogênio e o enxofre são constituem alguns dos nutrientes fundamentais para o metabolismo celular (SCHLESINGER et al., 2011). As taxas dos ciclos elevados do nitrogênio e enxofre pelos colonizadores da plastisfera parecem exercer alguma influência sobre os ciclos biogeoquímicos de nutrientes (XUE et al., 2020). Estes efeitos precisam ser melhor elucidados a partir de estudos quantitativos dos nutrientes e sua relação com as comunidades microbianas da plastisfera.

Quanto ao polietileno de baixa densidade, as funções que se destacaram foram as relacionadas a degradação de hidrocarbonetos, indício da presença de representantes microbianos que podem participar ou agir do processo de biodegradação do polietileno, função já identificada anteriormente em trabalho da plastisfera marinha (LI et al., 2021).

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos resultados revelaram que: (1) A comunidade microbiana de plásticos marinhos foi influenciada pelos tipos de substrato testados neste estudo (PEBD, PEAD, PBAT e Vidro), entretanto não foi observado nenhuma influência na estruturação da comunidade quanto ao emprego do amido integrado ao polímero; (2) a diversidade bacteriana e a estrutura da comunidade no experimento *in situ* diferiram entre as semanas de coleta, demonstrando que cada estágio da sucessão do biofilme tem grupos microbianos proeminentes, sugerindo que o microbioma da plastisfera passou por um claro processo de sucessão ecológica, e tornando-se mais diversificado e complexo com o tempo; (3) a presença de grupos microbianos plásticos específicos, destaca a importância do tipo de polímero na colonização da plastisfera marinha. E por fim (4) perceber a complexidade metabólica existente na plastisfera a partir da inferência funcional, bem como o possível enriquecimento para diferentes funções em diferentes plásticos.

Assim, para melhor elucidar os processos ecológicos e a influência do microbioma pelágico na plastisfera do Oceano Atlântico Sul, sugere-se a realização da continuidade dos estudos empregando-se da técnica de metagenômica e metatranscriptoma em conjunto com a medição das condições oceanográficas locais.

REFERÊNCIAS¹

- AGOSTINI, L. et al. Deep-sea plastisphere: long-term colonization by plastic-associated bacterial and archaeal communities in the Southwest Atlantic Ocean. **Science of the Total Environment**, v. 793, p. 148335, 2021.
- AHMED, T. et al. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. **Environmental science and pollution research**, v. 25, n. 8, p. 7287-7298, 2018.
- AMARAL-ZETTLER, L. A.; ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J. Ecology of the plastisphere. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-13, 2020.
- AMIN, S. A.; PARKER, M. S.; ARMBRUST, E. Virginia. Interactions between diatoms and bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 667-684, 2012.
- AUSTIN, H. P. et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 19, p. E4350-E4357, 2018.
- BAKENHUS, I. et al. Composition of total and cell-proliferating bacterioplankton community in early summer in the North Sea—roseobacters are the most active component. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1771, 2017.
- BALASUBRAMANIAN, V. et al. High-density polyethylene (PEAD)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. **Letters in applied microbiology**, v. 51, n. 2, p. 205-211, 2010.
- BANDOPADHYAY, S. et al. Soil microbial communities associated with biodegradable plastic mulch films. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 587074, 2020.
- BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences**, v. 364, n. 1526, p. 1985-1998, 2009.
- BASILI, M. et al. Major role of surrounding environment in shaping biofilm community composition on marine plastic debris. **Frontiers in Marine Science**, p. 262, 2020.
- BEAUMONT, N. J. et al. Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. **Marine pollution bulletin**, v. 142, p. 189-195, 2019.
- BOLYEN, E. et al. QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science. **PeerJ Preprints**, 2018.
- BRYANT, J. A. et al. Diversity and activity of communities inhabiting plastic debris in the North Pacific Gyre. **MSystems**, v. 1, n. 3, p. e00024-16, 2016.
- CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581, 2016.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2022. 24 p.

- CAPORASO, J. G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4516-4522, 2011.
- CARUSO, G. Microbial colonization in marine environments: overview of current knowledge and emerging research topics. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 8, n. 2, p. 78, 2020.
- CASTRO, R. O.; DA SILVA, M. L.; DE ARAÚJO, F. V. Review on microplastic studies in Brazilian aquatic ecosystems. **Ocean & Coastal Management**, v. 165, p. 385-400, 2018.
- CHEN, Y. et al. Single-use plastics: Production, usage, disposal, and adverse impacts. **Science of the total environment**, v. 752, p. 141772, 2021.
- CONWAY, J. R.; LEX, A.; GEHLENBORG, N. UpSetR: an R package for the visualization of intersecting sets and their properties. **Bioinformatics**, 2017.
- COONS, A. K. et al. Biogeography rather than substrate type determines bacterial colonization dynamics of marine plastics. **PeerJ**, v. 9, p. e12135, 2021.
- CSARDI, G. et al. The igraph software package for complex network research. **InterJournal, complex systems**, v. 1695, n. 5, p. 1-9, 2006.
- DANG, H.; LOVELL, C. R. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 1, p. 91-138, 2016.
- DE CÁCERES, M.; LEGENDRE, P.; MORETTI, M. Improving indicator species analysis by combining groups of sites. **Oikos**, v. 119, n. 10, p. 1674-1684, 2010.
- DE CARVALHO, D. G.; NETO, J. A. B. Microplastic pollution of the beaches of Guanabara Bay, Southeast Brazil. **Ocean & Coastal Management**, v. 128, p. 10-17, 2016.
- DELACUVELLERIE, A. et al. The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including *Alcanivorax borkumensis* as a key player for the low-density polyethylene degradation. **Journal of hazardous materials**, v. 380, p. 120899, 2019.
- DERRAIK, J. GB. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 9, p. 842-852, 2002.
- DO VAL SIQUEIRA, L. et al. Starch-based biodegradable plastics: Methods of production, challenges and future perspectives. **Current Opinion in Food Science**, v. 38, p. 122-130, 2021.
- DUCHAUD, E. et al. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 763-769, 2007.
- EMADIAN, S. M.; ONAY, T. T.; DEMIREL, Burak. Biodegradation of bioplastics in natural environments. **Waste management**, v. 59, p. 526-536, 2017.
- ERNI-CASSOLA, G. et al. Distribution of plastic polymer types in the marine environment; A meta-analysis. **Journal of hazardous materials**, v. 369, p. 691-698, 2019.
- ERNI-CASSOLA, G. et al. Early colonization of weathered polyethylene by distinct bacteria in marine coastal seawater. **Microbial ecology**, v. 79, n. 3, p. 517-526, 2020.

- FERREIRA, L. M.; FALCAO, A. N.; GIL, M. H. Modification of PEBD molecular structure by gamma irradiation for bioapplications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 236, n. 1-4, p. 513-520, 2005.
- FLEMMING, H. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563, 2016.
- FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.
- FRÈRE, L. et al. Microplastic bacterial communities in the Bay of Brest: Influence of polymer type and size. **Environmental pollution**, v. 242, p. 614-625, 2018.
- GALL, S. C.; THOMPSON, R. C. The impact of debris on marine life. **Marine pollution bulletin**, v. 92, n. 1-2, p. 170-179, 2015.
- GALLOWAY, T. S.; COLE, M.; LEWIS, C. Interactions of microplastic debris throughout the marine ecosystem. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 5, p. 1-8, 2017.
- GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science advances**, v. 3, n. 7, p. e1700782, 2017.
- GHATGE, S. et al. Biodegradation of polyethylene: a brief review. **Applied Biological Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 1-14, 2020.
- GHIGLIONE, J.; LAUDET, V. Marine life cycle: a polluted terra incognita is unveiled. **Current Biology**, v. 30, n. 3, p. R130-R133, 2020.
- GUO, G. et al. Structure and property of biodegradable soy protein isolate/PBAT blends. **Industrial crops and Products**, v. 74, p. 731-736, 2015.
- HARVEY, B. P. et al. Ocean acidification alters bacterial communities on marine plastic debris. **Marine Pollution Bulletin**, v. 161, p. 111749, 2020.
- HOU, Y. et al. Responses of bacterial communities and organic matter degradation in surface sediment to *Macrobrachium nipponense* bioturbation. **Science of The Total Environment**, v. 759, p. 143534, 2021.
- HUANG, D. et al. Characterization and ecological function of bacterial communities in seabed sediments of the southwestern Yellow Sea and northwestern East China Sea, Western Pacific. **Science of The Total Environment**, v. 761, p. 143233, 2021.
- HUGGETT, M. J.; NEDVED, B. T.; HADFIELD, M. G. Effects of initial surface wettability on biofilm formation and subsequent settlement of *Hydroides elegans*. **Biofouling**, v. 25, n. 5, p. 387-399, 2009.
- HURTADO-MCCORMICK, V. et al. Shifts in the seagrass leaf microbiome associated with wasting disease in *Zostera muelleri*. **Marine and Freshwater Research**, v. 72, n. 9, p. 1303-1320, 2021.
- JAMBECK, J. R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**. 347, 768-771. 2015.
- JANG, M.; KIM, S.; NAM, B. Transesterification effects on miscibility polycarbonate/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. **Polymer bulletin**, v. 68, n. 1, p. 287-298, 2012.

- JIAN, J.; XIANGBIN, Z.; XIANBO, H. An overview on synthesis, properties and applications of poly (butylene-adipate-co-terephthalate)–PBAT. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2020.
- JIANG, L.; LIU, B.; ZHANG, J. Properties of poly (lactic acid)/poly (butylene adipate-co-terephthalate)/nanoparticle ternary composites. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 16, p. 7594-7602, 2009.
- KANE, I. A.; CLARE, M. A. Dispersion, accumulation, and the ultimate fate of microplastics in deep-marine environments: a review and future directions. **Frontiers in earth science**, v. 7, p. 80, 2019.
- KELLY, M. R. et al. Bacterial colonisation of plastic in the Rockall Trough, North-East Atlantic: An improved understanding of the deep-sea plastisphere. **Environmental Pollution**, v. 305, p. 119314, 2022.
- KETTNER, M. T. et al. The eukaryotic life on microplastics in brackish ecosystems. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 538, 2019.
- KIRSTEIN, I. V. et al. The plastisphere–uncovering tightly attached plastic “specific” microorganisms. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215859, 2019.
- KIRSTEIN, Inga V. et al. Mature biofilm communities on synthetic polymers in seawater-Specific or general?. **Marine Environmental Research**, v. 142, p. 147-154, 2018.
- KRAUSE, S. et al. Persistence of plastic debris and its colonization by bacterial communities after two decades on the abyssal seafloor. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.
- KVIATKOVSKI, I.; MINZ, D. A member of the Rhodobacteraceae promotes initial biofilm formation via the secretion of extracellular factor (s). **Aquatic Microbial Ecology**, v. 75, n. 2, p. 155-167, 2015.
- LACERDA, A. L. d F. et al. Plastics in sea surface waters around the Antarctic Peninsula. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.
- LANGILLE, M. G. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814, 2013.
- LEAR, G. et al. Plastics and the microbiome: impacts and solutions. **Environmental Microbiome**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2021.
- LEUNG, T. LF; BATES, A. E. More rapid and severe disease outbreaks for aquaculture at the tropics: implications for food security. **Journal of applied ecology**, p. 215-222, 2013.
- LI, C. et al. The ecology of the plastisphere: microbial composition, function, assembly, and network in the freshwater and seawater ecosystems. **Water Research**, v. 202, p. 117428, 2021.
- LINARES, D. M. et al. Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. **Probiotic Dairy Products**, p. 359-388, 2018.
- LIU, R. et al. *Croceimicrobium hydrocarbonivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium isolated from a bacterial consortium that degrades polyethylene terephthalate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 004770, 2021.

- LOBELLE, D.; CUNLIFFE, M. Early microbial biofilm formation on marine plastic debris. **Marine pollution bulletin**, v. 62, n. 1, p. 197-200, 2011.
- LOUCA, S.; PARFREY, L. W.; DOEBELI, M. Decoupling function and taxonomy in the global ocean microbiome. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1272-1277, 2016.
- LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 1-21, 2014.
- LUO, G. et al. Deciphering the diversity and functions of plastisphere bacterial communities in plastic-mulching croplands of subtropical China. **Journal of hazardous materials**, v. 422, p. 126865, 2022.
- MCLEAN, C. N. United Nations Decade of Ocean Science for Sustainable Development. In: **AGU Fall Meeting Abstracts**. 2018.
- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.
- MECKING, S. Nature or petrochemistry?—biologically degradable materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 9, p. 1078-1085, 2004.
- MEYER-CIFUENTES, I. E. et al. Synergistic biodegradation of aromatic-aliphatic copolyester plastic by a marine microbial consortium. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.
- MIAO, L. et al. Distinct community structure and microbial functions of biofilms colonizing microplastics. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 2395-2402, 2019.
- MICHELS, J. et al. Rapid aggregation of biofilm-covered microplastics with marine biogenic particles. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1885, p. 20181203, 2018.
- MOHAMAD, N. et al. Vibriosis in cultured marine fishes: a review. **Aquaculture**, v. 512, p. 734289, 2019.
- MOREIRA, F. T. et al. Revealing accumulation zones of plastic pellets in sandy beaches. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 313-321, 2016.
- 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**, v. 11, n. 8, p. e0159289, 2016.
- OBERBECKMANN, S.; LABRENS, M. Marine Microbial Assemblages on Microplastic; Diversity, Adaptation and Role in Degradation. **Annual Review of marine Science**, v. 12, p. 209-232. 2020.
- ODOBEL, C. et al. Bacterial abundance, diversity and activity During long-term colonization of non-biodegradable and biodegradable Plastics in seawater. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
- OGONOWSKI, M. et al. Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 8, p. 2796-2808, 2018.
- OKSANEN, J. et al. Package ‘vegan’. **Community ecology package, version**, v. 2, n. 9, p. 1-295, 2013.

- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.
- PEIXOTO, J. et al. The role of nitrogen metabolism on polyethylene biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 432, p. 128682, 2022.
- PINNELL, L. J.; TURNER, Jeffrey W. Shotgun metagenomics reveals the benthic microbial community response to plastic and bioplastic in a coastal marine environment. **Frontiers in microbiology**, p. 1252, 2019.
- PINTO, M. et al. The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0217165, 2019.
- PRINCE, R. C.; AMANDE, Tivkaa J.; MCGENITY, Terry J. Prokaryotic hydrocarbon degraders. **Taxonomy, genomics and ecophysiology of hydrocarbon-degrading microbes**, p. 1-39, 2019.
- PUJALTE, M. J. et al. The family rhodobacteraceae. **Springer**. 2014
- PUROHIT, J.; CHATTOPADHYAY, A.; TELI, B. Metagenomic exploration of plastic degrading microbes for biotechnological application. **Current Genomics**, v. 21, n. 4, p. 253-270, 2020.
- REISSER, J. et al. Millimeter-sized marine plastics: a new pelagic habitat for microorganisms and invertebrates. **PloS one**, v. 9, n. 6, 2014.
- ROAGER, L.; SONNENSCHN, E. C. Bacterial candidates for colonization and degradation of marine plastic debris. **Environmental science & technology**, v. 53, n. 20, p. 11636-11643, 2019.
- ROSALES, S. M. et al. Microbiome differences in disease-resistant vs. susceptible *Acropora* corals subjected to disease challenge assays. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- RUMMEL, C. D. et al. Impacts of biofilm formation on the fate and potential effects of microplastic in the aquatic environment. **Environmental science & technology letters**, v. 4, n. 7, p. 258-267, 2017.
- RÜTHI, J. et al. The “plastisphere” of biodegradable plastics is characterized by specific microbial taxa of alpine and arctic soils. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 562263, 2020.
- SCHLESINGER, W. H. et al. Introduction to coupled biogeochemical cycles. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 9, n. 1, p. 5-8, 2011.
- SCHLUNDT, C. et al. Spatial structure in the “Plastisphere”: Molecular resources for imaging microscopic communities on plastic marine debris. **Molecular ecology resources**, v. 20, n. 3, p. 620-634, 2020.
- SHAHIN, K. et al. Development of a recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0192979, 2018.
- SHIMETA, J. et al. Influences of biofilm-associated ciliates on the settlement of marine invertebrate larvae. **Marine Ecology Progress Series**, v. 449, p. 1-12, 2012.

- SMÅGE, S. B. et al. *Tenacibaculum finnmarkense* sp. nov., a fish pathogenic bacterium of the family Flavobacteriaceae isolated from Atlantic salmon. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 2, p. 273-285, 2016.
- STEINER, D. J.; FURUYA, Y.; METZGER, D. W. Host–pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. **Infection and drug resistance**, v. 7, p. 239, 2014.
- STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187-209, 2002.
- SUN, Y. et al. Contribution of stochastic processes to the microbial community assembly on field-collected microplastics. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 11, p. 6707-6720, 2021.
- TEAM, R. et al. RStudio: integrated development for R. **RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>**, v. 42, p. 14, 2015.
- THOMPSON, R. C.; MAXIMENKO, N. Plastic pollution in the marine environment. **Future of the Ocean and Its Seas, a Non-Governmental Scientific Perspective on Seven Marine Research Issues of G7 Interest**, p. 12-18, 2016.
- TOKIWA, Y. et al. Biodegradability of plastics. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 9, p. 3722-3742, 2009.
- TURRA, A. et al. Three-dimensional distribution of plastic pellets in sandy beaches: shifting paradigms. **Scientific reports**, v. 4, p. 4435, 2014.
- VAKSMAA, A. et al. Microbial communities on plastic polymers in the Mediterranean Sea. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 1021, 2021.
- VAN SEBILLE, E. et al. A global inventory of small floating plastic debris. **Env. Res. Lett.** **10**, 124006 (2015).
- VANNINI, C. et al. Microbial communities of polyhydroxyalkanoate (PHA)-based biodegradable composites plastisphere and of surrounding environmental matrix: a comparison between marine (seabed) and coastal sediments (dune sand) over a long-time scale. **Science of The Total Environment**, v. 764, p. 142814, 2021.
- VILJAKAINEN, V. R.; HUG, L. A. The phylogenetic and global distribution of bacterial polyhydroxyalkanoate bioplastic-degrading genes. **Environmental microbiology**, v. 23, n. 3, p. 1717-1731, 2021.
- VINCE, J.; HARDESTY, B. D. Plastic pollution challenges in marine and coastal environments: from local to global governance. **Restoration ecology**, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2017.
- VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.
- WANG, J. et al. Comparative genomics reveals evidence of genome reduction and high extracellular protein degradation potential in *Kangiella*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1224, 2018.
- WANG, J. et al. The impact of microplastic-microbe interactions on animal health and biogeochemical cycles: a mini-review. **Science of The Total Environment**, v. 773, p. 145697, 2021.

- WANG, L. et al. Bacterial community colonization on tire microplastics in typical urban water environments and associated impacting factors. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114922, 2020.
- WEBB, H. K. et al. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly (ethylene terephthalate). **Polymers**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2012.
- WEN, B. et al. Community structure and functional diversity of the plastisphere in aquaculture waters: Does plastic color matter?. **Science of The Total Environment**, v. 740, p. 140082, 2020.
- WICKHAM, H. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**. Springer, 2016.
- WRIGHT, R. J. et al. A multi-OMIC characterisation of biodegradation and microbial community succession within the PET plastisphere. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 1-22, 2021.
- WRIGHT, R. J.; LANGILLE, M. GI; WALKER, T. R. Food or just a free ride? A meta-analysis reveals the global diversity of the Plastisphere. **The ISME journal**, v. 15, n. 3, p. 789-806, 2021.
- WU, N. et al. Colonization characteristics of bacterial communities on microplastics compared with ambient environments (water and sediment) in Haihe Estuary. **Science of The Total Environment**, v. 708, p. 134876, 2020.
- XANTHOS, D.; WALKER, T. R. International policies to reduce plastic marine pollution from single-use plastics (plastic bags and microbeads): a review. **Marine pollution bulletin**, v. 118, n. 1-2, p. 17-26, 2017.
- XU, X. et al. Marine microplastic-associated bacterial community succession in response to geography, exposure time, and plastic type in China's coastal seawaters. **Marine pollution bulletin**, v. 145, p. 278-286, 2019.
- XUE, N. et al. Increased inheritance of structure and function of bacterial communities and pathogen propagation in plastisphere along a river with increasing antibiotics pollution gradient. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114641, 2020.
- YAKIMOV, M. M. et al. Marine, aerobic hydrocarbon-degrading Gammaproteobacteria: the family Alcanivoracaceae. **Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes**, p. 167-179, 2019.
- YOON, M. G. et al. Biodegradation of polyethylene by a soil bacterium and AlkB cloned recombinant cell. **J Bioremed Biodegrad**, v. 3, n. 4, p. 1-8, 2012.
- YOSHIDA, S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1196-1199, 2016.
- ZETTLER, E. R.; MINCER, T. J.; AMARAL-ZETTLER, L. A. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 13, p. 7137-7146, 2013.
- ZHANG, S. et al. The structure and assembly mechanisms of plastisphere microbial community in natural marine environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 421, p. 126780, 2022.

ZHANG, X. et al. Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 10, p. 6164-6171, 2015.

ZHAO, S. et al. Microbial carrying capacity and carbon biomass of plastic marine debris. **The ISME journal**, v. 15, n. 1, p. 67-77, 2021.

ZHURINA, M. V. et al. Microplastics as a New Ecological Niche For Multispecies Microbial Biofilms within the Plastisphere. **Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 107-123, 2022.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Sumário quantitativo do controle de qualidade. Com o número de sequências que entraram, o quantitativo após cada processo (filtro, denoise, retirada de quimeras) e suas respectivas porcentagens.

Amostr as	Entra da	Filtrad as	Porcentag em de após o filtro	denois ed	Porcentag em de após o denoise	Retirada de sequênc ias quiméri cas	Porcentagem de após a retirada de sequências quiméricas
7.V.A	1708 19	15991 0	93.61	15282 9	82.08	138533	81.1
SWB	1381 36	12979 5	93.96	12509 5	84.66	109677	79.4
V.IV.A	1353 89	12550 4	92.7	12048 8	81.92	108828	80.38
6.III.B	1351 54	12428 2	91.96	11915 3	80.66	108572	80.33
2.I.A	1338 48	12369 2	92.41	11889 5	80.97	106037	79.22
3.I.A	1312 93	12249 4	93.3	11704 8	81.71	105232	80.15
7.II.B	1299 37	12064 4	92.85	11581 0	81.81	105176	80.94
11.I.B	1280 04	11977 4	93.57	11662 1	86.9	106071	82.87
2.II.B	1250 15	11669 2	93.34	11289 0	82	100540	80.42
6.V.A	1247 45	11544 0	92.54	10967 4	79.85	98686	79.11
3.V.A	1205 57	11284 9	93.61	10773 3	80.53	96497	80.04
11.V.A	1192 67	11163 5	93.6	10730 2	82.57	97410	81.67
6.II.B	1176 73	10965 3	93.18	10460 7	80.15	93200	79.2
13.I.B	1169 65	10924 6	93.4	10441 6	81.8	94354	80.67
11.II.A	1167 21	10793 0	92.47	10495 7	83.6	96568	82.73
V.I.B	1161 17	10778 0	92.82	10254 3	80.41	91636	78.92
3.V.B	1158 22	10955 9	94.59	10472 5	82.41	94559	81.64

	1143	10551		10231			
2.II.A	48	7	92.28	3	82.97	94077	82.27
	1130	10599		10095			
7.I.B	49	8	93.76	6	81.97	89973	79.59
	1125	10457					
V.V.B	00	5	92.96	99673	80.55	89307	79.38
	1110	10333					
3.III.B	74	2	93.03	99187	81.16	89594	80.66
	1105	10241					
2.IV.B	98	0	92.6	99055	83.03	91141	82.41
	1104	10160					
3.IV.A	58	9	91.99	99195	83.6	92017	83.3
13.IV.	1095	10208					
A	89	2	93.15	98481	83.18	89307	81.49
	1088	10168					
6.IV.B	15	6	93.45	98006	82.32	89176	81.95
	1081	10032					
13.V.A	70	4	92.75	96865	82.97	88977	82.26
	1078	10120					
2.V.A	72	3	93.82	96393	81.02	86560	80.24
	1059						
6.I.B	94	99345	93.73	94576	81.72	84575	79.79
	1051						
7.IV.B	46	98324	93.51	96336	86.11	89701	85.31
	1050						
3.I.B	81	97580	92.86	92772	80.38	82849	78.84
	1049						
13.V.B	83	97540	92.91	94063	82.94	86534	82.43
	1044						
7.IV.A	19	96054	91.99	93254	83.38	86640	82.97
	1039						
6.II.A	52	96208	92.55	92560	81.21	83989	80.8
	1032						
SWA	29	96732	93.71	93501	85.58	83599	80.98
	1008						
6.I.A	83	93435	92.62	89332	80.9	79292	78.6
11.IV.	9960						
A	2	92201	92.57	89664	83.64	82665	83
	9922						
7.I.A	1	93864	94.6	89810	83.36	79870	80.5
	9907						
2.I.B	0	92612	93.48	88139	81.26	78867	79.61
	9858						
6.IV.A	1	90115	91.41	88749	85.12	83161	84.36
	9734						
3.II.B	4	89747	92.2	86271	80.42	77725	79.85
	9663						
11.II.B	7	89413	92.52	86166	81.47	78406	81.13

	9576						
3.II.A	2	88890	92.82	85515	80.9	77027	80.44
13.III.	9526						
A	4	89397	93.84	85321	82.28	77339	81.18
11.III.	9405						
B	7	88391	93.98	84946	82.78	77130	82
	9397						
2.III.B	9	87854	93.48	83353	79.35	73941	78.68
	9132						
V.V.A	8	83772	91.73	79679	78.76	71286	78.05
	9083						
13.I.A	9	84303	92.8	81373	83.97	74800	82.34
	9033						
V.IV.B	4	83594	92.54	79840	80.39	71662	79.33
	8904						
13.II.A	8	81781	91.84	78960	81.29	71881	80.72
	8871						
2.III.A	2	83764	94.42	79639	82.32	72442	81.66
	8861						
V.III.A	7	82010	92.54	77949	79.32	69763	78.72
	8853						
2.V.B	3	83456	94.27	79714	81.19	71500	80.76
13.III.	8831						
B	0	82966	93.95	79372	82.17	72184	81.74
	8624						
3.IV.B	2	78989	91.59	75945	80.5	68805	79.78
	8558						
2.IV.A	8	79193	92.53	76382	81.56	69368	81.05
	8344						
7.II.A	1	77478	92.85	73634	79.17	65355	78.32
	8315						
11.I.A	6	78483	94.38	75901	86.64	68750	82.68
	8242						
6.V.B	7	77460	93.97	74171	82.01	67142	81.46
	8204						
V.III.B	8	76402	93.12	72499	80.47	65328	79.62
13.IV.	8194						
B	2	76026	92.78	73537	83.76	67873	82.83
11.III.	8184						
A	2	77139	94.25	73885	83.37	67890	82.95
	8107						
11.V.B	8	75783	93.47	72747	82.49	66261	81.73
	8024						
6.III.A	9	74880	93.31	71145	80.44	64370	80.21
	8012						
7.III.B	6	72431	90.4	70068	81.26	64877	80.97
	7998						
13.II.B	3	72577	90.74	69795	81.26	64310	80.4

Semana II	PEAD	623 5	1652 .5	204.87	6505. 27	1714. 07	222.1 2	25. 71	6.45	0.08
	PEBD	558 2	1399	52.42	5840. 00	1465. 76	64.90	24. 43	6.16	0.13
	PBAT	439 8	1133 .5	172.20	4580. 49	1190. 65	180.4 5	22. 19	5.49	0.40
Semana III	Vidro	238 3	1191 .5	74.25	2467. 70	1233. 85	75.96	12. 14	6.07	0.13
	PEAD	520 1	1329	327.90	5439. 08	1370. 37	369.1 0	23. 72	6.04	0.37
	PEBD	549 2	1365 .5	95.88	5747. 46	1441. 83	116.6 7	24. 36	6.10	0.15
	PBAT	484 9	1237	77.36	5096. 61	1300. 06	90.07	22. 94	5.74	0.15
Semana IV	Vidro	268 7	1343 .5	207.18	2832. 18	1416. 09	227.7 5	12. 37	6.19	0.11
	PEAD	568 6	1373	219.59	5905. 04	1405. 47	227.8 5	24. 58	6.20	0.41
	PEBD	542 2	1368	169.90	5655. 23	1429. 55	185.3 2	24. 41	6.09	0.16
	PBAT	453 0	1110	211.70	4714. 65	1151. 27	229.7 6	23. 00	5.78	0.41
Semana V	Vidro	290 8	1454	135.76	3065. 63	1532. 81	150.5 7	12. 68	6.34	0.09

	PEAD	668 4	1557 .5	488.83	7090. 59	1652. 19	550.7 8	25. 49	6.32	0.32
	PEBD	652 9	1714 .5	169.65	6910. 87	1817. 41	192.8 0	25. 16	6.31	0.24
	PBAT	572 9	1435 .5	222.12	6056. 58	1518. 71	245.3 3	24. 10	5.97	0.34
<hr/>										
Shapiro	Valor									
–Wilk	de p									
test				0.07376		0.09872			0.00002	

APÊNDICE C. Resultados dos pós-testes de diversidade alfa com tempo de exposição (semana I, semana II, semana III, semana IV e semana V) e substrato (vidro; PEAD, polietileno de alta densidade; PEBD, polietileno de baixa densidade; PBAT, Tereftalato de adipato de polibutileno). Valor de $p < 0.05$ são mostradas em negrito.

Índice	Pós-teste	Tempo de exposição	p valor	Substrato	p valor
Observa d	Wilcoxon	Semana I x Semana II	0.01	Vidro x PEAD	0.7
		Semana I x Semana III	0.01	Vidro x PEBD	0.6
		Semana I x Semana IV	0.01	Vidro x PBAT	0.03
		Semana I x Semana V	0.001	Vidro x Sea Water	0.2

		Semana II x Semana III	0.5	PEAD x PEBD	0.6
		Semana II x Semana IV	0.7	PEAD x PBAT	0.02
		Semana II x Semana V	0.5	PEAD x Água do Mar	0.1
		Semana III x Semana IV	0.7	PEBD x PBAT	0.006
		Semana III x Semana V	0.1	PEBD x Água do Mar	0.02
		Semana IV x Semana V	0.3	PBAT x Água do Mar	0.3
Chao1	Tukey	Semana I x Semana II	0.1	Vidro x PEAD	0.5
		Semana I x Semana III	0.5	Vidro x PEBD	0.6
		Semana I x Semana IV	0.3	Vidro x PBAT	0.8
		Semana I x Semana V	0.000 2	Vidro x Água do Mar	0.2
		Semana II x Semana III	0.9	PEAD x PEBD	0.9
		Semana II x Semana IV	0.9	PEAD x PBAT	0.01

		Semana II x Semana V	0.2	PEAD x Água do Mar	0.03
		Semana III x Semana IV	0.9	PEBD x PBAT	0.01
		Semana III x Semana V	0.05	PEBD x Água do Mar	0.03
		Semana IV x Semana V	0.1	PBAT x Água do Mar	0.5
Shannon	Tukey	Semana I x Semana II	0.4	Vidro x PEAD	0.5
		Semana I x Semana III	0.8	Vidro x PEBD	0.6
		Semana I x Semana IV	0.7	Vidro x PBAT	0.8
		Semana I x Semana V	0.004	Vidro x Sea Water	0.3
		Semana II x Semana III	0.9	PEAD x PEBD	0.9
		Semana II x Semana IV	0.9	PEAD x PBAT	0.009
		Semana II x Semana V	0.5	PEAD x Água do Mar	0.03
		Semana III x Semana IV	1	PEBD x PBAT	0.01

Semana III x Semana V	0.2	PEBD x Água do Mar	0.04
Semana IV x Semana V	0.2	PBAT x Água do Mar	0.5

APÊNDICE D. Frequência relativa divididos por tempo de exposição e tipos de substratos das classes identificadas no experimento *in situ*.

Classe	Tempo de exposição		Tipo de substrato	Abundância
Acidimicrobiia	Semana	I	Vidro	0.01595070 1
Alphaproteobacteria	Semana	I	Vidro	0.16625643 8
Bacteroidia	Semana	I	Vidro	0.14955240 9
Cyanobacteriia	Semana	I	Vidro	0.41896792 8
Gammaproteobacteria	Semana	I	Vidro	0.24927252 4
Acidimicrobiia	Semana	III	Vidro	0.01855451 7
Alphaproteobacteria	Semana	III	Vidro	0.33657513 7
Bacteroidia	Semana	III	Vidro	0.31426604 4
Cyanobacteriia	Semana	III	Vidro	0.13623254 6

Gammaproteobacteria	Semana	III	Vidro	0.19437175 6
Acidimicrobiia	Semana	IV	Vidro	0.03186644 8
Alphaproteobacteria	Semana	IV	Vidro	0.39578529 6
Bacteroidia	Semana	IV	Vidro	0.16484799 1
Cyanobacteriia	Semana	IV	Vidro	0.14220334 2
Gammaproteobacteria	Semana	IV	Vidro	0.26529692 2
Acidimicrobiia	Semana	V	Vidro	0.02668803 5
Alphaproteobacteria	Semana	V	Vidro	0.35627943 2
Bacteroidia	Semana	V	Vidro	0.23996009 9
Cyanobacteriia	Semana	V	Vidro	0.09661420 2
Gammaproteobacteria	Semana	V	Vidro	0.28045823 2
Acidimicrobiia	Semana	I	PEAD	0.00811118 7
Alphaproteobacteria	Semana	I	PEAD	0.20794394 3
Bacteroidia	Semana	I	PEAD	0.16513846 6
Cyanobacteriia	Semana	I	PEAD	0.42120991 5
Gammaproteobacteria	Semana	I	PEAD	0.19759648 9

Acidimicrobiia	Semana	II	PEAD	0.02689366 5
Alphaproteobacteria	Semana	II	PEAD	0.30539386 8
Bacteroidia	Semana	II	PEAD	0.25651362 7
Cyanobacteriia	Semana	II	PEAD	0.14048814 8
Gammaproteobacteria	Semana	II	PEAD	0.27071069 2
Acidimicrobiia	Semana	III	PEAD	0.00676036 8
Alphaproteobacteria	Semana	III	PEAD	0.17755053
Bacteroidia	Semana	III	PEAD	0.27932055 9
Cyanobacteriia	Semana	III	PEAD	0.24246191 4
Gammaproteobacteria	Semana	III	PEAD	0.29390662 9
Acidimicrobiia	Semana	IV	PEAD	0.01650377 2
Alphaproteobacteria	Semana	IV	PEAD	0.23415749 4
Bacteroidia	Semana	IV	PEAD	0.37655180 9
Cyanobacteriia	Semana	IV	PEAD	0.11700253 3
Gammaproteobacteria	Semana	IV	PEAD	0.25578439 2
Acidimicrobiia	Semana	V	PEAD	0.01184792
Alphaproteobacteria	Semana	V	PEAD	0.22333640 3

Bacteroidia	Semana	V	PEAD	0.34060004 1
Cyanobacteriia	Semana	V	PEAD	0.11465879 3
Gammaproteobacteria	Semana	V	PEAD	0.30955684 3
Acidimicrobiia	Semana	I	PEBD	0.01071358 6
Alphaproteobacteria	Semana	I	PEBD	0.29807255 1
Bacteroidia	Semana	I	PEBD	0.16463599 7
Cyanobacteriia	Semana	I	PEBD	0.24207263
Gammaproteobacteria	Semana	I	PEBD	0.28450523 6
Acidimicrobiia	Semana	II	PEBD	0.02197726 9
Alphaproteobacteria	Semana	II	PEBD	0.28446771 2
Bacteroidia	Semana	II	PEBD	0.33313049 8
Cyanobacteriia	Semana	II	PEBD	0.12717903
Gammaproteobacteria	Semana	II	PEBD	0.23324549
Acidimicrobiia	Semana	III	PEBD	0.01044302 9
Alphaproteobacteria	Semana	III	PEBD	0.15330777 1
Bacteroidia	Semana	III	PEBD	0.28933338 2
Cyanobacteriia	Semana	III	PEBD	0.23799646 7
Gammaproteobacteria	Semana	III	PEBD	0.30891935

Acidimicrobiia	Semana	IV	PEBD	0.01615314 3
Alphaproteobacteria	Semana	IV	PEBD	0.18836099 2
Bacteroidia	Semana	IV	PEBD	0.39058111 9
Cyanobacteriia	Semana	IV	PEBD	0.16643492 7
Gammaproteobacteria	Semana	IV	PEBD	0.23846981 9
Acidimicrobiia	Semana	V	PEBD	0.01704895
Alphaproteobacteria	Semana	V	PEBD	0.23487003
Bacteroidia	Semana	V	PEBD	0.32227332 6
Cyanobacteriia	Semana	V	PEBD	0.13971302 7
Gammaproteobacteria	Semana	V	PEBD	0.28609466 7
Acidimicrobiia	Semana	I	PBAT	0.00783090 9
Alphaproteobacteria	Semana	I	PBAT	0.17644403 7
Bacteroidia	Semana	I	PBAT	0.16662371 1
Cyanobacteriia	Semana	I	PBAT	0.28506387 5
Gammaproteobacteria	Semana	I	PBAT	0.36403746 9
Acidimicrobiia	Semana	II	PBAT	0.04415846 1
Alphaproteobacteria	Semana	II	PBAT	0.25186857 9

Bacteroidia	Semana	II	PBAT	0.33493281
Cyanobacteriia	Semana	II	PBAT	0.13901497
				4
Gammaproteobacteria	Semana	II	PBAT	0.23002517
				6
Acidimicrobiia	Semana	III	PBAT	0.01058807
				6
Alphaproteobacteria	Semana	III	PBAT	0.12462664
Bacteroidia	Semana	III	PBAT	0.29541534
				8
Cyanobacteriia	Semana	III	PBAT	0.25407002
				6
Gammaproteobacteria	Semana	III	PBAT	0.31529991
Acidimicrobiia	Semana	IV	PBAT	0.01545541
				2
Alphaproteobacteria	Semana	IV	PBAT	0.16416787
				6
Bacteroidia	Semana	IV	PBAT	0.39998761
				3
Cyanobacteriia	Semana	IV	PBAT	0.18833566
				2
Gammaproteobacteria	Semana	IV	PBAT	0.23205343
				7
Acidimicrobiia	Semana	V	PBAT	0.01160410
				5
Alphaproteobacteria	Semana	V	PBAT	0.20964439
				7
Bacteroidia	Semana	V	PBAT	0.30076388
				8
Cyanobacteriia	Semana	V	PBAT	0.22696174
Gammaproteobacteria	Semana	V	PBAT	0.25102587

Acidimicrobiia	AM	AM	0.09071640 2
Alphaproteobacteria	AM	AM	0.32583138 7
Bacteroidia	AM	AM	0.23580587 5
Cyanobacteriia	AM	AM	0.19851877
Gammaproteobacteria	AM	AM	0.14912756 6

APÊNDICE E. Grupos taxonômicos e os tipos de plásticos onde foram identificados, bem como suas respectivas referências.

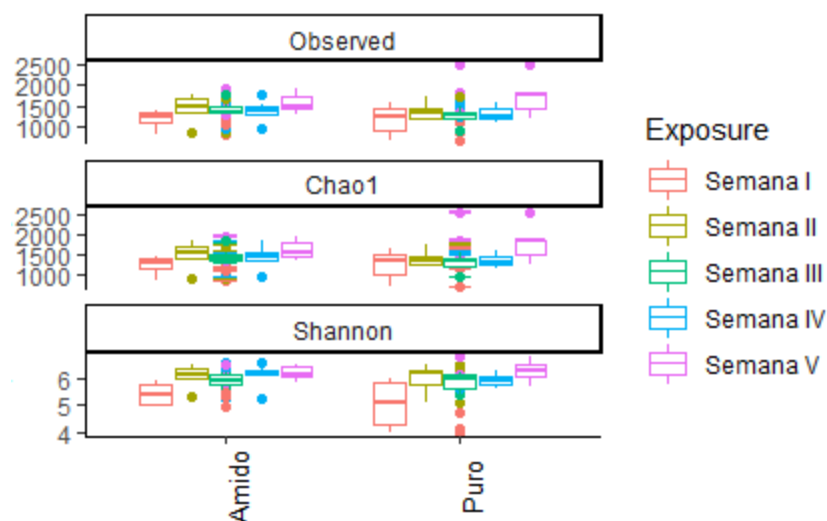
Grupo taxômico	Tipo de polímero	Referência
Cellvibrionaceae	PVC	PINTO, Maria et al., 2019
	PE e PLA	CHENG, Jingguang et al., 2021
Rhodobacteraceae	PEBD	DELACUVELLERIE, Alice et al., 2019
	PE (sem distinção entre PEBD e PEAD)	SCHLUNDT, Cathleen et al., 2020
Flavobacteriaceae	PEAD e PEAD-OXO	AGOSTINI, Luana et al., 2021
	PEBD	DELACUVELLERIE, Alice et al., 2019
Sphingomonadaceae	PE (sem distinção entre PEBD e PEAD)	OBERBECKMANN; KREIKEMEYER; LABRENZ, 2018
	PE, PP e PS	OGONOWSKI, Martin et al., 2018
Saprospiraceae	PE e PP	ZETTLER; MINCER; AMARAL-ZETTLER, 2013
	PET	OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016
	PS	OGONOWSKI, Martin et al., 2018

Alcanivoraceae	PET	OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016
Vibrionaceae	PET	OBERBECKMANN; OSBORN; DUHAIME, 2016
Pseudoalteromonadaceae	PE, PP e PS	WU, et al., 2020
Hyphomonadaceae	PE, PP e PS	WU et al., 2020
Microscillaceae	Microplástico não identificado	WEN et al., 2020
Oleiphilaceae	PEAD e PEAD-OXO	AGOSTINI, Luana et al., 2021
Sphingobacteriaceae	PEAD-OXO	AGOSTINI, Luana et al., 2021
Microtrichaceae	PEAD, PEAD-OXO e PP	AGOSTINI, Luana et al., 2021
Nitrosopumilaceae	PEAD	AGOSTINI, Luana et al., 2021
	PS	BHAGWAT, et al., 2021
Nitrospiraceae	Plásticos (tipo de plástico não especificado)	AGOSTINI, Luana et al., 2021
OM182 clade	PET	HARVEY, et al, 2020
Granulosicoccaceae	PET	PUROHIT; CHATTOPADHYAY; TELI, 2020
Thiotrichaceae	Plásticos (tipo de plástico não especificado)	KRAUSE, et al., 2020
Bdellovibrionaceae	Plásticos (tipo de plástico não especificado)	AGOSTINI, Luana et al., 2021
Cyclobacteriaceae	PET	PINNELL; TURNER, 2020
Arenicellaceae	PEBD, PEAD e PP	PINTO, et al., 2019
Gracilibacteria	PET	CRISAFI, et al., 2022
Saccharimonadales	PLA	RÜTHI, et al., 2020

Tabela 12. Comparação entre as comunidades microbianas de plásticos com adição de amido e plástico puro utilizando PERMANOVA.

Grupo 1	Grupo 2	P valor
Com amido	Puro	0.4780

APÊNDICE F. Diversidade alfa, (ASVs Observadas, índices Chao1 e Shannon) representadas em boxplots demonstrando as medianas dos valores calculados. Tipos de amostra: Plástico com amido e sem amido (Puro).



APÊNDICE G. Identificação e tipos de plástico das amostra utilizadas.

Amostra	Tipo de amostra
2.I.A	PEBD
3.I.A	PEBD
6.I.A	PEAD
7.I.A	PEAD
11.I.A	PBAT
13.I.A	PBAT
V.I.A	Vidro
2.I.B	PEBD
3.I.B	PEBD
6.I.B	PEAD
7.I.B	PEAD
11.I.B	PBAT
13.I.B	PBAT
V.I.B	Vidro
2.II.A	PEBD
3.II.A	PEBD
6.II.A	PEAD
7.II.A	PEAD
11.II.A	PBAT
13.II.A	PBAT
V.II.A	Vidro

2.II.B	PEBD
3.II.B	PEBD
6.II.B	PEAD
7.II.B	PEAD
11.II.B	PBAT
13.II.B	PBAT
2.III.A	PEBD
3.III.A	PEBD
6.III.A	PEAD
7.III.A	PEAD
11.III.A	PBAT
13.III.A	PBAT
V.III.A	Vidro
2.III.B	PEBD
3.III.B	PEBD
6.III.B	PEAD
7.III.B	PEAD
11.III.B	PBAT
13.III.B	PBAT
V.III.B	Vidro
2.IV.A	PEBD
3.IV.A	PEBD
6.IV.A	PEAD
7.IV.A	PEAD
11.IV.A	PBAT
13.IV.A	PBAT
V.IV.A	Vidro
2.IV.B	PEBD
3.IV.B	PEBD
6.IV.B	PEAD
7.IV.B	PEAD
11.IV.B	PBAT
13.IV.B	PBAT
V.IV.B	Vidro
2.V.A	PEBD
3.V.A	PEBD
6.V.A	PEAD
7.V.A	PEAD
11.V.A	PBAT
13.V.A	PBAT
V.V.A	Vidro
2.V.B	PEBD
3.V.B	PEBD
6.V.B	PEAD
7.V.B	PEAD
11.V.B	PBAT

13.V.B	PBAT
V.V.B	Vidro
SWA	Sea Water
SWB	Sea Water
