UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isolamento de bactérias com potencial para biodegradação de plásticos

Danae Kala Rodríguez Bardají

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Isolamento de bactérias com potencial para biodegradação de plásticos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Danae Kala Rodríguez Bardají

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 04/09/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rodríguez Bardají, Danae Kala

Isolamento de bactérias com potencial para biodegradação de plásticos. Ribeirão Preto, 2018.
83 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Stehling, Eliana Guedes

1. Contaminação por plásticos. 2. Biodegradação. 3. Perda de peso.

4. EIVTF. 5. MEV. 6. Susceptibilidade antimicrobiana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Danae Kala Rodríguez Bardají

Isolamento de bactérias com potencial para biodegradação de plásticos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Este trabalho foi realizado no laboratório de pesquisa:

Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação - LAMAB do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob orientação da Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling.

Dedico este trabalho:

A minha mãe, que me ensinou a sonhar e ao meu pai, que sempre realiza os meus sonhos ...

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, em primeiro lugar, a Deus, por estar comigo em todos os momentos e iluminando-me.

À Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling, pela disponibilidade e orientação prestada e pelos valiosos ensinamentos durante o Doutorado.

A minha família, minha mãe, meu pai e meu irmão por sempre me estimular a continuar, pelo amor, pelo carinho e afeto.

Ao meu esposo Cicero Matos pela compreensão, dedicação e apoio em todos os momentos.

As minhas amigas de sempre, Anabel, Dayana, Lissandra e Yadira por sempre estar dispostas a me ajudar no que for preciso.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação (LAMAB), pelo companheirismo e carinho.

Aos técnicos Vinicius e Inara por sempre me ajudarem nos experimentos e pelos esclarecimentos químicos.

A Nathália Gonsales da Rosa pelo auxílio e dedicação nos experimentos e ao laboratório do professor Dr. Hamilton Cabral pelos recursos disponibilizados.

Ao Rodrigo Silva, do departamento de química da FFCLRP pela disposição, a paciência e o tempo concedidos na análise das micrografias.

As minhas amigas Jéssica, Ana Flávia, Vânia e Paola, que me acompanharam de perto durante a maior parte do Doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelos ensinamentos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

E a todos os que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê...

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Bardají, D. K. R. **Isolamento de bactérias com potencial para biodegradação de plásticos.** 2018. 83 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os plásticos são moléculas poliméricas de cadeia longa. O plástico é versátil, leve, flexível, resistente à umidade, forte e economicamente viavel. Essas qualidades atraentes levam a um consumo excessivo de bens plásticos. No entanto, eles são duráveis e muito dificeis de degradar pelo que os materiais plásticos que são usados na fabricação de tantos produtos se tornam resíduos com poder de permanência. Nossa tremenda atração pelo plástico, juntamente com uma propensão inegável de consumir cada vez mais, descartar, jogar lixo e, assim, poluir, tornou-se uma combinação de natureza letal. A produção anual de plásticos duplicou nos últimos 15 anos, alcançando 245 milhões de toneladas, portanto, uma grande quantidade de plásticos é acumulada no meio ambiente gerando problemas ecológicos. O objetivo do presente estudo foi isolar bactérias de um aterro sanitário e de uma amostra de água contaminada com diesel com potencial para degradar o polietileno e outros plásticos, como o polivinil e o poliuretano. Essas bactérias foram isoladas em Ribeirão Preto, SP, utilizando filmes dos três tipos de plástico como fonte de carbono e meio mínimo de sais (MMS). Após a extração do DNA genômico foi utilizada a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar o gene *alk*B e as bactérias que apresentaram esse gene foram identificadas e incubadas com os filmes dos plásticos (polietileno, poliuretano e policloreto de vinil) e o meio MMS (90mL) por 6 meses. Após a incubação foram realizadas as análises de perda de peso, dos espectros obtidos por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada Fourier (EIVTF) e das micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para avaliar a capacidade de biodegradação dos isolados. Foram realizados também testes de suscetibilidade antimicrobiana para conhecer o perfil de resistência dos isolados. Dois isolados bacterianos apresentaram o gene *alk*B e foram identificados como *Paenibacillus* sp. S5 e *Bacillus cereus* A1, respectivamente, utilizando o sequenciamento do gene 16S rDNA. Após o período de incubação foi detectada uma diferença significativa no peso final em relação ao peso inicial para os 3 tipos de plástico e também foram observadas alterações químicas pela EIVTF, como o aparecimento de novos grupos funcionais e rupturas de ligações, sendo essas alterações mais evidentes para os filmes de polietileno. Através da MEV foram visualizadas mudanças físicas, como formação de poros e fissuras, e colonização bacteriana na superfície plástica em todos os casos, especialmente nos filmes de polietileno. Os resultados mais promissores foram obtidos com o isolado *Paenibacillus* sp. S5, na biodegradação dos três plásticos testados. Esse isolado apresentou suscetibilidade a todos os antibióticos testados, exceto para amicacina e *B. cereus* A1 foi resistente a 7 dos 12 antibióticos testados. Portanto, as bactérias do presente estudo, especialmente o *Paenibacillus* sp. S5 podem ser utilizadas em processos de biodegradação para a eliminação de plásticos do meio ambiente.

Palavras-chaves: Contaminação por plásticos, biodegradação, perda de peso, EIVTF, MEV, susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

Bardají, D. K. R. **Isolation of bacteria with potencial for biodegradation of plastics.** 2018. 83 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Plastics are man-made long chain polymeric molecules. Plastic is versatile, lightweight, flexible, moisture resistant, strong, and relatively inexpensive. Those are the attractive qualities that lead us, around the world, to such a voracious appetite and over-consumption of plastic goods. However, durable and very slow to degrade, plastic materials that are used in the production of so many products all, ultimately, become waste with staying power. Our tremendous attraction to plastic, coupled with an undeniable behavioral propensity of increasingly over-consuming, discarding, littering and thus polluting, has become a combination of lethal nature. The annual production of plastics has doubled over the past 15 years to 245 million tons due to their great physical and chemical properties, thus a large amount of plastic gets accumulated in the environment generating plastic waste ecological problems. The purpose of this study was to isolate bacteria from a waste disposal area and also from diesel contaminated water with potential to degrade polyethylene and other plastics as polyvinyl and polyurethane. These bacteria were isolated in Ribeirão Preto, SP, Brazil using plastic discs as a carbon source and a minimal salt medium (MSM). After genomic DNA extraction, PCR reactions were performed to detect the *alk*B gene and bacteria that showed this gene were identified and incubated with plastic discs (polyethylene, polyurethane and polyvinyl chloride 5cm discs) and MSM (90mL) for 6 months. After incubation, lose weight measurement analysis, Fourier Transforms Infra-red (FT-IR) analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis and antimicrobial susceptibility tests were performed to evaluate the biodegradation capacity and the resistance profile of the isolates. Five bacteria were isolated from soil however, only one showed the *alk*B gene. From water just one bacterium was isolated which presented the *alk*B gene. These bacteria were identified as *Paenibacillus* sp. S5 and *Bacillus cereus* A1 respectively using the 16S rDNA gene sequencing. A significant difference in final weight compared to initial weight was assessed for the 3 types of plastic in both cases. Chemical changes were observed by FTIR. The appearance of new functional groups and bond scissions were more evident for polyethylene films. SEM visualized physical changes, such as formation of pits and cracks, and bacterial colonization on the plastic surface in all cases especially for polyethylene films. Biodegradation experiments demonstrated the best results for *Paenibacillus* sp. S5 for the three plastics tested. *Paenibacillus* sp. S5 showed susceptibility to all antibiotics tested except to amikacin and *B. cereus* A1 was resistance to seven from 12 antibiotics tested. Hence these bacteria, especially *Paenibacillus* sp. S5 can be used for biodegradation process as a promising tool for the elimination of plastic from the environment.

Keywords: Plastic contamination, biodegradation, weight loss, FTIR, SEM, antimicrobial susceptibility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da polimerização do polietileno …...…..…. 3

Figura 2 - Etapas da biodegradação dos polímeros ……..…...……. 10

Figura 3 - Fórmula geral dos PURs ……...……..……. 12

Figura 4 - Representação da polimerização do PVC ....……...……..…….. 15

Figura 5 - Foto aérea do Aterro Sanitário e do Incinerador de Ribeirão Preto e das áreas circunvizinhas ...……... 24

Figura 6 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PEBD com tratamento químico ...……. 37

Figura 7 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PEBD sem tratamento ....…….. 38

Figura 8 - Mecanismo de degradação do polietileno ....…….…….. 40

Figura 9 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PUR com tratamento químico……. 41

Figura 10 - Via de degradação do poliuretano .....…… 42

Figura 11 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PVC com tratamento químico ...……. 44

Figura 12 - MEV de filmes dos plásticos não-tratados ....…….....…… 45

Figura 13 - MEV de filmes dos plásticos tratados quimicamente ….....…..…..... 46

Figura 14 - MEV de filmes de PEBD após 3 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS ....…….. 46

Figura 15 - MEV de filmes de PEBD após 6 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS …….. 47

Figura 16 - MEV de filmes de PEBD após 3 meses de incubação com *B. cereus* A1 em MMS ……. 47

Figura 17 - MEV de filmes de PEBD após 6 meses de incubação com *B. cereus* A1 em MMS ……. 48

Figura 18 - MEV de filmes de PUR após 3 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS ……....…...…….. 48

Figura 19 - MEV de filmes de PUR após 6 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS …….....……. 49

Figura 20 - MEV de filmes de PUR após 6 meses de incubação com *B. cereus* A1 em MMS ...……. 49

Figura 21 - MEV de filmes de PVC após a incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS ……... 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micro-organismos mais frequentemente associados à biodegradação do polietileno …….. 7

Tabela 2 - Identificação e detecção do gene *alk*B nos isolados obtidos 32

Tabela 3 - Valores da perda de peso dos filmes de PEBD 34

Tabela 4 - Valores de perda de peso dos filmes de PUR …… 34

Tabela 5 - Valores de perda de peso dos filmes de PVC ……..... 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*alk*B	Gene que codifica a enzima alcano monooxigenase
BLAST	Do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*
BHI	do inglês *Brain Heart Infusion*
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
DNA	Do inglês, *Deoxyribonucleicacid*
dNTP	Desoxirribonucleotídeofosfatato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIVTF	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
F	Do inglês, *Forward*
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
pb	Pares de bases
PCR	Do inglês, *Polymerase Chain Reaction*
PE	Polietileno
PEAD	Polietileno de alta densidade
PEBD	Polietileno de baixa densidade
PELBD	Polietileno linear de baixa densidade
PUR	Poliuretano
PVC	Cloreto de polivinilo
R	Do inglês, *Reverse*
SDS	Dodecil sulfato de sódio
sp.	Espécie
TAE	Tris Acetato EDTA
pH	Potencial de hidrogênio
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC	Grau Celsius
CO_2	Dióxido de carbono
g	Grama
H_2O	Água
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
µmol	Micromol
µL	Microlitro
L	Litro
mL	Mililitro
%	Porcento

SUMÁRIO

RESUMO …… I

ABSTRACT …… Ii

LISTA DE FIGURAS …… Iv

LISTA DE TABELAS ……... Vi

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS Vii

LISTA DE SÍMBOLOS Ix

1 INTRODUÇÃO 2

1.1 Plásticos 2

1.2 Polietileno 3

1.2.1 Contaminação ambiental por resíduos de plásticos 3

1.2.2 Degradação do polietileno 5

1.2.3 Micro-organismos envolvidos 6

1.2.4 Mecanismos de biodegradação do PEBD 8

1.2.5 Determinação da biodegradação do polietileno 9

1.3 Poliuretanos 11

1.3.1 Estrutura química e física dos poliuretanos 11

1.3.2 Problemas ambientais com resíduos plásticos de poliuretano 13

1.3.3 Degradação dos poliuretanos 13

1.4 Cloreto de polivinil 14

1.4.1 Estrutura química e física do cloreto do polivinil 14

1.4.2 Problemas ambientais com resíduos plásticos de cloreto de polivinil 15

1.4.3 Degradação do cloreto de polivinil 17

2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO 20

3 OBJETIVOS 22

3.1 Objetivo geral 22

3.2 Objetivos específicos 22

4 MATERIAL E MÉTODOS 24

4.1 Amostras de solo 24

4.2 Amostras de água 24

4.3 Isolamento de bactérias do solo e da água 25

4.4 Extração do DNA genômico 25

4.5 Detecção do gene *alk*B 25

4.6 Identificação bacteriana por análise molecular 26

4.7 Eletroforese em gel de agarose 26

4.8 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR 27

4.9 Preparo dos filmes de polietileno 27

4.10 Preparo dos filmes de cloreto de polivinil e poliuretano 27

4.11 Avaliação da perda de peso dos filmes como indicativo da degradação microbiana 28

4.12 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF) 28

4.13 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 28

4.14 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos 29

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 31

5.1 Isolamento, identificação e detecção do gene *alk*B 31

5.2 Testes de degradação 33

5.2.1 Resultados dos testes de perda de peso 33

5.2.2 Resultados da análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIVTF) 36

5.2.3 Resultados da análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 45

5.3 Perfil de resistência 52

6 CONCLUSÕES 54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade e a ocorrência de micro-organismos degradadores de polímeros é variável e depende do local de isolamento (solo, mar, lodo ativado, etc). Usualmente ocorre a aderência e a colonização dos micro-organismos na superfície dos plásticos, sendo a degradação enzimática decorrente da hidrólise do polímero em oligômeros, dímeros e monômeros de baixo peso molecular, os quais são finalmente mineralizados em CO2 e H2O. A degradação microbiana de plásticos tem sido relatada por diferentes gêneros de bactérias e fungos, entre eles, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Ralstonia* e *Bacillus*, para uma ampla gama de polímeros sintéticos (Priyanka & Archana, 2011).

Os Bacillus são bactérias Gram-positivas, aeróbias obrigatórias ou facultativas, catalase positivas, produtoras de endósporos e pertencentes ao filo Firmicutes. Muitas espécies de *Bacillus* podem produzir grandes quantidades de enzimas que são usadas em diferentes indústrias (Sing et al., 2016). *Paenibacillus* é um gênero bacteriano classificado como anaeróbico facultativo, formador de endósporos, originalmente incluído no gênero *Bacillus*. Bactérias pertencentes a esse gênero foram detectadas em uma variedade de ambientes, incluindo solo, água, rizosfera, vegetais e insetos, bem como no ambiente hospitalar. Entre as espécies mais conhecidas destaca-se o *Paenibacillus polymyxa*, que é capaz de fixar nitrogênio, sendo utilizado na agricultura e na horticultura (Natarajan et al., 2013).

1.1 Plásticos

A palavra plástico vem do grego "plastikós", que significa que pode ser moldado em diferentes formas. Os plásticos são polímeros compostos por carbono, silício, oxigênio, hidrogênio, nitrogênio e cloreto (Mukherjee & Chatterjee 2014) e constituídos por um conjunto de monômeros unidos por ligações químicas. São extraídos do carvão, do gás natural e do petróleo (Kale et al., 2015; Trivedi et al., 2016).

Os plásticos podem ser classificados como materiais termofixos ou termoplásticos. Os plásticos termofixos têm estrutura altamente reticuladas, enquanto os termoplásticos são sólidos lineares que podem ser endurecidos e suavizados por processos repetidos de aquecimento e resfriamento. Eles também são considerados como plásticos não biodegradáveis (Raziyafathima et al., 2016; Gnanavel et al., 2012). A produção anual de

plásticos no mundo duplicou nos últimos 15 anos para 245 milhões de toneladas (Plastic Europe, 2015).

1.2 Polietileno

O polietileno (PE) é um dos mais abundantes polímeros sintéticos produzidos comercialmente (Gajendiran et al., 2016) e representa até 64% dos plásticos sintéticos produzidos, sendo utilizado principalmente na fabricação de sacolas plásticas, garrafas e recipientes descartáveis (Byuntae et al., 1991; Balasubramanian et al., 2010). É um polímero termoplástico linear constituído de cadeias longas de monômeros de etileno (Figura 1). A fórmula geral do polietileno é C_nH_{2n}, onde 'n' é o número de átomos de carbono. Existem três tipos principais de PE, o polietileno de baixa densidade (PEBD), o polietileno de alta densidade (PEAD) e o polietileno linear de baixa densidade (PELBD) (Usha et al., 2011).

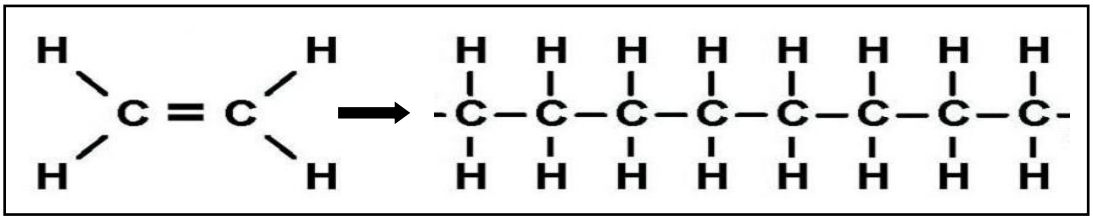

Figura 1 - Representação esquemática da polimerização do polietileno.

O PEAD tem poucas ramificações, proporcionando forças intermoleculares e resistência à trações mais fortes do que o PEBD. Fisicamente o PEAD é mais duro, mais opaco e pode suportar temperaturas maiores (120ºC) (Balasubramanian et al., 2010).

O PEBD é definido por uma faixa de densidade de 0,910-0,940 g/cm^3. Não é reativo à temperatura ambiente, exceto por agentes oxidantes fortes. Pode suportar temperaturas de 80°C continuamente e 95°C por um curto período de tempo. É translúcido ou com variações opacas e é bastante flexível e resistente, mas quebrável. O PEBD tem ramificação em aproximadamente 2% dos átomos de carbono (Pramila & Ramesh 2011).

1.2.1 Contaminação ambiental por resíduos de plásticos

Os resíduos de plástico representam 20-30% do volume total de resíduos sólidos em aterros domésticos devido à grande quantidade de resíduos gerados e também porque os resíduos de plástico são recalcitrantes e permanecem depositados em aterros por longos períodos de tempo (Ishigaki et al., 2004).

O uso de polietileno está crescendo em todo o mundo em uma taxa de 12% ao ano e cerca de 140 milhões de toneladas desses polímeros sintéticos são produzidos em todo o mundo a cada ano. Com uma quantidade tão grande de polietileno acumulada no meio ambiente e gerando problemas ecológicos de resíduos de plástico, milhares de anos são necessários para uma degradação eficiente (Usha et al., 2011).

Os resíduos de plástico no oceano normalmente possuem níveis bastante elevados de poluentes orgânicos. Os produtos químicos tóxicos, como os bifenilos policlorados (PCB), o nonilfenol (NP), os pesticidas orgânicos como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), os éteres difenílicos polibromados (PEBDs) e o bisfenol A (BPA) são frequentemente encontrados em detritos plásticos oceânicos (Mato et al 2001, Rios et al., 2007; Hirai et al., 2011). Estes agentes tóxicos estão associados a muitos problemas de saúde, incluindo comprometimento do desenvolvimento do feto (comprometimento neurológico, anormalidades de crescimento e desequilíbrios hormonais), câncer, distúrbios endócrinos, alterações neurocomportamentais, artrite e hipometilação de DNA (Schecter et al., 2010; Trudel et al., 2011; Chung et al., 2011; Zhou et al., 2011).

As sacolas de plástico de polietileno podem causar bloqueio no intestino de peixes, aves e animais marinhos, uma vez que estas são muitas vezes confundidas com alimentos por mamíferos marinhos (Secchi & Zurzur 1999; Spear et al., 1995). Devido à poluição por plástico no meio marinho, aproximadamente 267 espécies estão sendo afetadas, incluindo todos os mamíferos, tartarugas marinhas e aves marinhas (Coe & Rogers, 1997). A vida selvagem terrestre também pode ser afetada, uma vez que o plástico pode prender-se ao sistema digestivo e bloquear a digestão, especialmente quando é poroso ou em forma de sacolas. Os animais terrestres também são capazes de transportar detritos marinhos para novas áreas (Censky et al., 1998; Barnes & Milner, 2005).

As sacolas de compras após a sua vida útil podem ser encontradas em ruas, calçadas, praias e no sistema de esgoto, podendo servir como um habitat adequado para vetores causadores de doenças, incluindo os mosquitos (Njeru, 2006). Alguns locais proibiram a

distribuição de sacolas plásticas por supermercados e outros estabelecimentos comerciais em decorrência dos diversos problemas ambientais gerados por esses compostos (Gajendiran et al. 2016).

1.2.2 Degradação do polietileno

Existem diferentes métodos para a eliminação de plásticos, tais como incineração, reciclagem e aterros sanitários (Sharma & Sharma, 2004; Deepika & Madhuri 2015), entretanto, cada um tem suas próprias limitações. Os detritos plásticos em aterros também atuam como fonte para vários poluentes ambientais secundários. Os poluentes incluem compostos orgânicos voláteis como benzeno, tolueno, xileno, etilbenzeno e trimetilbenzeno, liberados tanto como gases como contidos em lixiviados (Tsuchida et al., 2011).

Muitas vezes a incineração de plásticos leva à formação de numerosos compostos prejudiciais à saúde humana e à microbiota, sendo a maioria deles liberada para a atmosfera. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), compostos bifenilos policlorados (PCB), metais pesados, radicais livres à base de carbono e oxigênio tóxicos, sem mencionar quantidades significativas de gases de efeito estufa, especialmente dióxido de carbono, são produzidos e liberados quando os plásticos são incinerados (Tsuchida et al., 2011). Os processos de reciclagem surgem como alternativa para contornar as deficiências do aterro e da incineração, entretanto, é um processo relativamente caro e ineficiente. Além disso, a presença de aditivos e impurezas pode complicar o procedimento de reciclagem e diminuir o rendimento e a qualidade do produto recuperado (Webb et al., 2013).

Os plásticos podem ser afetados por degradação química, térmica ou biológica. A degradação de um polímero é afetada por muitos fatores como temperatura, umidade, oxigênio, luz do sol, estresse, organismos vivos e contaminantes (Muthukumar & Shanthi Veerappapillai, 2014).

A biodegradação ou degradação biológica consiste nos processos resultantes do ataque de um determinado composto por um organismo vivo, entre eles, as bactérias e os fungos (Kelen, 1983). Essa tecnologia oferece uma oportunidade para degradação de resíduos sólidos de origem polimérica, sendo considerado um procedimento barato e um processo que não acarreta prejuízo ao meio ambiente (Gautam et al., 2007). A biodegradação é de grande

importância para polímeros imiscíveis em água, visto que eles podem entrar em córregos de água impossibilitando a reciclagem ou a incineração dos mesmos (Shah et al., 2008).

A biodegradação envolve agentes microbianos, não requer calor e o material orgânico pode ser degradado de forma aeróbica ou anaeróbica. Em aterros sanitários e sedimentos, os plásticos são normalmente degradados anaerobicamente, enquanto no solo ocorre a biodegradação aeróbica. A biodegradação aeróbica leva à produção de água e CO_2, enquanto que a biodegradação anaeróbica resulta na formação de água, CO_2 e metano como produtos finais (Gu et al., 2000, Sangale et al., 2012).

A biodegradabilidade depende não só da origem do polímero, mas também de sua estrutura química e das condições ambientais. O plástico degradável é aquele em que a degradação resulta da ação de micro-organismos que ocorrem naturalmente, como bactérias, fungos e algas. As sacolas biodegradáveis são feitas de polímeros que se degradam quando expostos à luz solar, à água ou ao ar (Vroman & Tighzert 2009). Qualquer mudança física (como perda de peso da amostra, resistência à tração) ou química (como a produção de dióxido de carbono) no material, sugere a degradação biológica por micro-organismos (Muthukumar & Shanthi Veerappapillai, 2015).

O polietileno pode ser suscetível à degradação microbiana adicionando amido e pró-oxidantes, os quais são utilizados na fabricação do polietileno biodegradável (Muthukumar & Veerappapillai, 2015). Os bioplásticos contendo amido são os mais utilizados, uma vez que o amido melhora a natureza hidrofílica do polietileno para que este possa ser catalisado pela enzima amilase (Trivedi et al., 2016; Shah et al., 2008).

Recentemente foi desenvolvido o polietileno biodegradável chamado de polietileno oxibiodegradável, o qual é produzido com adição de aditivos sob a forma de metais de transição (Mn-estearato, Cu-estearato, Ni-estearato e Fe-estearato) e exposto à irradiação UV, tendo, por isso, um peso molecular inferior ao polietileno convencional. Os metais de transição são geralmente empregados como aditivos pró-oxidantes e catalisam a cisão de PE através da formação de radicais livres (European Bioplastics 2009; Mohan & Suresh 2015).

1.2.3 Micro-organismos envolvidos

Diferentes tipos de micro-organismo degradam diferentes grupos de plásticos (Raziyafathima et al., 2016) (Tabela 1). O potencial dos micro-organismos degradadores de

polietileno tem sido curiosidade desde 1961, quando Fuhs et al. (1961) relatou que vários micro-organismos podem consumir parafina como fonte de carbono.

Tabela 1 - Micro-organismos mais frequentemente associados à biodegradação do polietileno.

Micro-organismos	Referências
Pseudomonas	Nanda et al., 2010; Sing et al., 2016; Kyaw et al., 2012; Deepika and Jaya, 2015; Balasubramanian et al., 2010; Kathiresan et al., 2003; Priyanka and Archana, 2011, Nanda and Sahu, 2010
Staphylococcus	Sing et al., 2016
Bacillus	Sing et al., 2016
Streptomyces	Deepika and Jaya, 2015
Arthrobacter	Balasubramanian et al., 2010
Moraxella	Kathiresan et al., 2003
Streptococcus	Priyanka and Archana, 2011
Proteus	Priyanka and Archana, 2011
Micrococcus	Priyanka and Archana, 2011
Lysinibacillus	Esmaeili et al., 2013
Rhodococcus	Gilan et al., 2004, Bonhomme et al., 2003, Nanda and Sahu, 2010

A capacidade de degradar polímeros depende das enzimas produzidas pelos micro-organismos, as quais convertem os polímeros em oligômeros e depois em monômeros. Estes produtos solúveis em água, clivados enzimaticamente, são absorvidos pelas células microbianas como fonte de carbono onde são metabolizados (Vasile 1993). Até o presente momento são descritos 19 gêneros de bactérias e 12 gêneros de fungos capazes de degradar o PEBD. Esses micro-organismos são normalmente isolados de uma variedade de fontes, como o solo de rizosfera de manguezais, água marinha e de resíduos plásticos de locais de despejo (Rutkowska et al., 2002, Kale et al., 2015).

Para elucidar os mecanismos de degradação, duas estratégias diferentes são descritas na literatura. Na primeira abordagem, estudos de degradação foram realizados usando linhagens puras capazes de degradar o polietileno, sendo uma maneira conveniente de investigar rotas

metabólicas ou avaliar o efeito de diferentes condições ambientais na degradação desse polímero. Uma desvantagem desta abordagem é que ela ignora a possibilidade de que a biodegradação do polietileno possa ser resultado de um processo cooperativo entre diferentes espécies. Essas limitações são evitadas pela segunda abordagem, na qual são utilizados ambientes complexos e comunidades microbianas (Restrepo-Flórez et al., 2014).

As comunidades microbianas ou consórcios microbianos são definidos como conjuntos multiespecíficos que coexistem em um nicho ecológico. Os micro-organismos do consórcio microbiano trabalham em um substrato complexo até degradá-lo em diferentes monômeros simples (Sowmya et al., 2015). O crescimento dos micro-organismos é influenciado por vários fatores, incluindo a disponibilidade de água, potencial redox, temperatura, fonte de carbono e fonte de energia (Sand 2003).

A ação de micro-organismos em materiais poliméricos pode ocorrer de três formas diferentes: a) Um efeito biofísico em que o crescimento celular pode ser causado pela perda de resistência mecânica em polímeros; b) Um efeito bioquímico onde as substâncias produzidas por micro-organismos podem atuar sobre os polímeros; e c) A ação enzimática direta, em que as enzimas microbianas atacam os componentes de produtos do plástico, promovendo rupturas oxidativas na cadeia polimérica (Maddever & Chapman, 1989).

Os genes envolvidos na degradação do polietileno têm sido pouco relatados na literatura. Yoon et al. (2012) investigaram a degradação de polietileno utilizando hexadecano como composto modelo e o gene *alk*B foi investigado. Esse gene codifica para a enzima alcano hidroxilase, a qual catalisa o primeiro passo do processo de degradação dos alcanos. Na tabela 1 estão descritos os principais micro-organismos associados à biodegradação do polietileno.

1.2.4 Mecanismos de biodegradação do PEBD

A biodegradação é influenciada por diferentes fatores que incluem características do PEBD, tipo de organismo e natureza do pré-tratamento (Sen & Raut 2015). Quanto à natureza do pré-tratamento, Somyia et al. (2014) relataram que a eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Chaetomium globosum* para usar o polietileno como única fonte de carbono tratado com UV era mais eficiente do que o tratamento de autoclavação ou esterilização.

Os mesmos resultados foram obtidos anos antes por Albertsson et al. (1987). Os autores concluíram que os grupos carbonila são produzidos por radiação UV ou por agentes oxidantes e que esses grupos são os principais fatores para o início da biodegradação. Os grupos carbonila facilitam a ação enzimática, que, na presença de água, forma segmentos mais curtos de cadeias de polietileno que são atacadas por micro-organismos, resultando em H_2O e CO_2 como produtos finais.

A biodegradação de polímeros envolve as seguintes etapas: ligação do micro-organismo à superfície do polímero, crescimento dos micro-organismos utilizando o polímero como fonte de carbono, degradação primária do polímero e degradação final (Figura 2) (Gnanavel et al., 2012). Estudos sobre a ligação do micro-organismo ao polietileno identificaram que a principal limitação do processo de colonização é a hidrofobicidade relativamente alta do polímero em contraste com as superfícies regularmente hidrófilas da maioria dos micro-organismos (Gilan et al. 2004). Teoricamente, o polietileno pode ser usado como fonte de carbono para micro-organismos, semelhante a muitos outros hidrocarbonetos. No entanto, seu alto peso molecular limita seu uso como substrato para iniciar reações enzimáticas (Yoon et al., 2012).

Os PEBDs são muito grandes para atravessarem as membranas celulares, então, devem primeiro ser despolimerizados em pequenos monômeros antes que possam ser absorvidos e biodegradados pelas células microbianas (Swift, 1997). Os subprodutos do polietileno variam de acordo com as condições de degradação. Em presença de condições aeróbicas, CO_2, água e biomassa microbiana são os produtos finais de degradação, enquanto que em condição anaeróbica, CO_2, água, metano e biomassa microbiana são os produtos finais. Sob condição sulfidogênica, H_2S, CO_2, H_2O e biomassa microbiana são os produtos finais (Arutchelvi et al., 2008).

1.2.5 Determinação da biodegradação do polietileno

A avaliação das mudanças visíveis nos plásticos pode ser realizada em quase todos os testes. Os fatores analisados para descrever a degradação incluem a rugosidade da superfície, a formação de furos ou fissuras, a fragmentação, as mudanças de cor ou a formação de biofilmes na superfície. Essas mudanças não comprovam a presença de um processo de biodegradação em termos metabólicos, mas o parâmetro de mudanças visuais pode ser usado como uma primeira indicação de qualquer ataque microbiano (Gnanavel et al., 2012).

O nível de degradação de polietileno pode ser determinado por vários métodos. No nível topográfico, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é utilizada para ver o nível de cisão e aderência dos micro-organismos na superfície do polietileno antes e depois do ataque microbiano. A micro destruição das pequenas amostras é amplamente analisada por uma ferramenta importante, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF) e, devido à recente gradação deste instrumento, o mapa dos compostos identificados na superfície da amostra pode ser documentado através da coleta de um grande número de espectros EIVTF (Sangale et al., 2012).

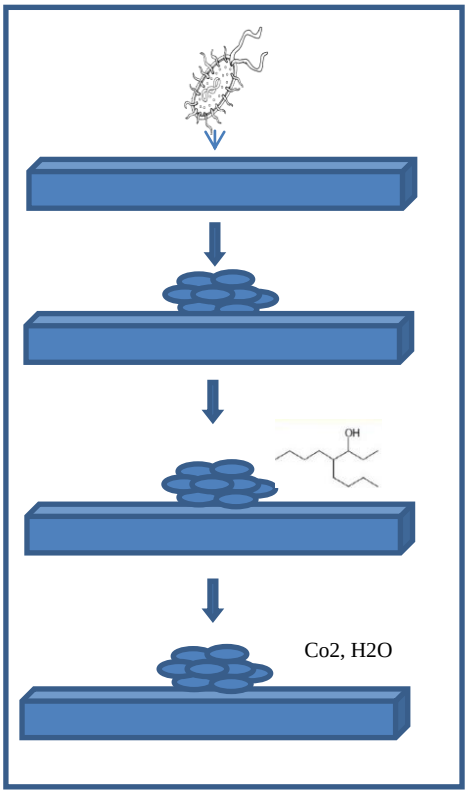

Figura 2 - Etapas da biodegradação dos polímeros (Fonte: autor)

A biodegradabilidade do polímero pode ser também caracterizada pela monitoração da taxa de evolução de CO_2, absorção de O_2 e taxa de crescimento dos organismos. Devem ser seguidos vários testes na avaliação da degradação do plástico devido às seguintes razões (Kale et al., 2015): 1. A perda de peso pode ser devida à lixiviação de aditivos, incluindo plastificantes; 2. A produção de dióxido de carbono pode resultar da degradação da fração de baixo peso molecular do polímero, sem degradação de cadeias mais longas; 3. A perda de aditivos ou mudanças muito pequenas no plástico podem afetar a força do plástico.

1.3 Poliuretanos

O poliuretano (PUR) é um polímero utilizado com grande frequência em diversos tipos de indústrias. Os PURs foram desenvolvidos por Otto Bayer em 1937 e a produção desses compostos tornou-se um sucesso, sendo um negócio de bilhões de dólares. O consumo global de PUR foi de cerca de 8 milhões de toneladas no ano 2000 e o mercado de PUR global é dominado pelas espumas rígidas e flexíveis, que em conjunto representaram mais de 65% da demanda total de PUR em 2011 (Reisch, 1990).

Os PURs estão presentes em muitos aspectos da vida moderna e representam uma classe de polímeros que tem encontrado um uso generalizado na fabricação de dispositivos médicos, tais como enxertos vasculares, diafragmas cardíacos artificiais e cateteres, e também na área automotiva. Os PURs também podem ser encontrados em produtos tais como revestimentos, adesivos, tintas, preenchimentos, elastômeros e peles sintéticas (Reisch, 1990).

Por várias razões, os PURs estão substituindo os polímeros mais antigos. O governo dos Estados Unidos tem eliminado progressivamente a borracha clorada em fuzileiros navais, aeronaves e revestimentos devido à presença de compostos orgânicos voláteis perigosos para o ambiente (Reisch, 1990). Os fabricantes de automóveis estão substituindo as borrachas de látex em assentos de carro e estofamento no interior por espuma de PUR devido à sua menor densidade e maior flexibilidade (Ulrich, 1983).

Outra vantagem dos PURs se deve ao fato destes compostos possuírem maior resistência à tração e pontos de fusão, tornando-os mais duráveis. A sua resistência à degradação pela água, óleos e solventes os tornam uma excelente escolha para a substituição de outros materiais plásticos. Como revestimentos, exibem excelente aderência para muitas substâncias, resistência à abrasão, propriedades elétricas e resistência às condições atmosféricas para fins industriais (Ulrich, 1983).

1.3.1 Estrutura química e física dos poliuretanos

O PUR é um polímero em que a unidade de repetição contém um radical uretano. Além disso, outros grupos tais como ureia, éster, éter ou um radical aromático também podem ser incluídos (Bayer, 1947), entretanto, a adição destes grupos funcionais pode resultar na diminuição de grupos de uretano no polímero. O átomo de hidrogênio do grupo hidroxila é

transferido para o átomo de nitrogênio do isocianato. A grande vantagem do PUR é que a cadeia não é composta exclusivamente por átomos de carbono, mas inclui também heteroátomos como oxigênio e nitrogênio. A fórmula mais simples para o PUR é a linear, representada na figura 3.

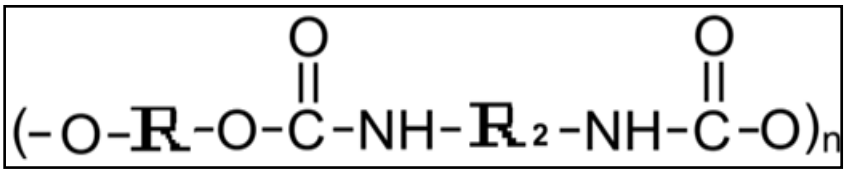

Figura 3 - Fórmula geral dos PURs. R1 representa um grupo hidrocarboneto que contém o álcool, o símbolo R2 representa uma cadeia de hidrocarboneto e "n" é o número de repetições.

O termo poliol é a abreviação para os álcoois polifuncionais. São compostos oligoméricos (di ou polihidroxilados), os quais, juntamente com os isocianatos, são componentes essenciais para a formação dos poliuretanos. Um iniciador polifuncional para a síntese de polióis para poliuretanos elásticos é o glicerol, composto que apresenta três grupos hidroxilas por Mol (92g/Mol) (Oppe &

Salvagnini, 2007).

As variações no número de substituições e o espaçamento entre e dentro das cadeias ramificadas produzem PURs que vão desde a forma linear a ramificada, flexível a rígida. Os PURs lineares são usados para a fabricação de fibras e moldagem (Urbanski et al. 1977) e os PURs flexíveis são utilizados na produção de ligantes e revestimentos (Saunders e Frisch, 1964). Espumas de plásticos rígidos e flexíveis, as quais constituem a maioria dos PURs produzidos, podem ser encontradas em várias formas na indústria (Fried, 1995). Utilizando pré-polímeros de baixa massa molecular, vários co-polímeros em bloco podem ser produzidos. O grupo hidroxila terminal permite que blocos alternativos, chamados segmentos, possam ser inseridos na cadeia de PUR. Uma variação nestes segmentos resulta em diferentes graus de resistência à tração e elasticidade. Os blocos que fornecem a fase rígida cristalina e contêm o extensor de cadeia são referidos como segmentos rígidos (Fried 1995). Aqueles que originam uma fase amorfa e de borracha contendo o poliéster/poliéter são chamados segmentos macios. Comercialmente, esses polímeros em bloco são conhecidos como PURs segmentados (Young & Lovell, 1994).

1.3.2 Problemas ambientais com resíduos plásticos de poliuretano

Os problemas ecológicos relacionados à poluição ambiental por polímeros sintéticos como o plástico são preocupações atuais; especialmente porque são de difícil degradação. Os resíduos de poliuretano são atualmente depositados em aterro e reciclados. Nos países desenvolvidos, a maior parte do PUR acaba na deposição em aterros (Shah, 2012). A reciclagem de PUR é feita mecanicamente por retificação, colagem de espuma flexível, pressão adesiva e moldagem por compressão dos resíduos de PU ou, quimicamente, por recuperação da unidade de alimentação (recuperação dos monômeros) utilizando técnicas como a glicólise, hidrólise, pirólise e hidrogenação (www.polyurethane. org, 2007).

O PUR é um dos principais resíduos plásticos descartados a cada ano. Os isocianatos que fazem parte da composição química dos PURs são altamente tóxicos e afetam não só o trabalhador durante a fabricação, mas também as pessoas que vivem nas áreas que circundam as instalações de fabricação do PUR. Além de isocianatos, catalisadores de metais tóxicos são utilizados durante a fabricação de PUR, os quais contaminam o meio ambiente. O processo hormonal pode ser interrompido em animais expostos a esses produtos químicos (http: //www.environmentalhealth news.org).

1.3.3 Degradação dos poliuretanos

As reações que levam à quebra de ligações químicas e as alterações na estrutura química do polímero podem ser realizadas por agentes físicos, químicos ou biológicos. Baseando-se na natureza do agente causador da degradação do polímero, essas reações podem ser classificadas como degradação térmica, degradação foto-oxidativa, degradação catalítica, degradação química e biodegradação (Pospisil & Nespurek, 1997).

A degradação ambiental de PUR depende da sua natureza química e da sua composição estrutural. Vários parâmetros como condições durante o processamento, adição de aditivos, grau de cristalinidade e proporção do segmento macio para o segmento duro, são responsáveis pela variação na degradabilidade do PUR (Marten et al., 2000).

A biodegradação de PUR ocorre por dois mecanismos diferentes: (a) oxidação biológica e (b) hidrólise biológica. Em geral, os poliéster-uretanos são susceptíveis à degradação hidrolítica devido aos grupos ésteres nos segmentos macios enquanto os poliéter-uretanos são susceptíveis a degradação oxidativa (Darby & Kaplan, 1968).

O mecanismo de hidrólise biológica de PUR, na presença de enzimas de tipo hidrolase, inclui três passos: em primeiro lugar, a dissolução química de ligações éster e amida da cadeia do polímero; em segundo lugar, a diminuição do peso molecular e da viscosidade; e, finalmente, clivagem de todas as redes de polímeros (Shah et al., 2008).

A degradação oxidativa tem sido geralmente associada com poliéter-uretanos, uma vez que muitos estudos determinaram que estes polímeros se degradam por captação do hidrogênio-alfa adjacente ao oxigênio em poliéteres e policarbonatos (Xie et al., 2009).

1.4 Cloreto de polivinil

O Cloreto de Polivinil, comumente chamado pela sigla PVC, é um polímero termoplástico e um dos materiais mais utilizados. Descoberto em 1835, o PVC começou a ser produzido comercialmente em 1927 (Folarin & Sadiku, 2011). Devido às suas características físicas (simples moldagem e firmeza), seu preço baixo e processo de obtenção fácil tornou-se um dos plásticos mais utilizados no mundo, sendo utilizado em uma ampla variedade de aplicações.

O PVC pode ser considerado um polímero polivalente, pois pode se apresentar com formatos muito rígidos (como tubos e conexões) ou altamente flexíveis (como bolsas de sangue, fios e cabos). É um material muito importante no setor de construção, sendo encontrado em materiais de construção, tubos e condutos, pavimentos, revestimentos de janelas e revestimentos de parede. Na União Européia, 60% do vinil é usado em aplicações de construção. São utilizados 25% adicionais em eletrodomésticos e móveis (Appiaha et al., 2017).

O cloreto de polivinil é um material de resina sólida sintética, comumente conhecido como vinil. A composição molecular comum dos plásticos é carbono e hidrogênio, mas algumas características podem ser desenvolvidas se o oxigênio, cloro, flúor e/ou nitrogênio forem adicionados à mistura (ECMSIG, 2004).

1.4.1 Estrutura química e física do cloreto do polivinil

O PVC é composto de duas matérias-primas básicas: etileno e cloro. O cloro representa 57% do peso, sendo obtido do sal comum (NaCl) pelo processo de eletrólise, e o etileno com

43%, vindo do craqueamento do petróleo. Da reação dos dois produtos resulta o dicloroetano, da onde se obtém o gás cloreto de vinil, monômero do PVC (Yadav et al., 2014).

O PVC logo é formado a partir de cloreto de vinil em um processo especial de fabricação de plásticos a quente que polimeriza monômeros tóxicos de cloreto de vinil gasoso [C_2H_3Cl] em cadeias de polímero sólido não tóxico [(C_2H_3Cl)n] (Figura 4). Após o processo de polimerização, o PVC pode passar por diversos acabamentos, tais como extrusão, injeção, etc (Suresh et al., 2017).

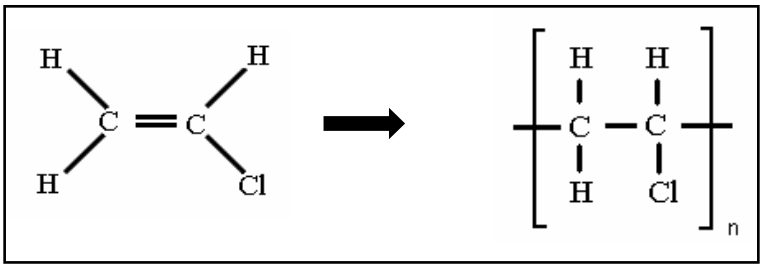

Figura 4 - Representação da polimerização do PVC

A presença do cloro é a responsável pelas inúmeras formas e propriedades do PVC. Como possui as características de anti-chama e auto-extinguível, além de ser bom isolante elétrico, é bastante utilizado na fabricação de cabos elétricos. É quimicamente inerte, ou seja, não é afetado por ácidos, bases, soluções aquosas e mesmo fortes agentes oxidantes têm fraca ação sobre esse material (Folarin & Sadiku, 2011).

Devido à instabilidade da ligação carbono-cloro na cadeia, o polímero pode ser degradado a temperaturas acima de 700º C e à luz ultravioleta. Ele é compatível com diversos aditivos que, dependendo das quantidades empregadas, podem modificar completamente as características dos produtos finais, obtendo-se produtos transparentes ou opacos, rígidos ou flexíveis. Os ftalatos (ou ésteres de ftalato) são ésteres de ácido ftálico e são o tipo mais comum de aditivos em geral (Van et al., 2008).

1.4.2 Problemas ambientais com resíduos plásticos de cloreto de polivinil

A crescente exploração dos termoplásticos, especialmente o PVC, na prática doméstica, na atividade científica e nas funções tecnológicas tornou-se uma grande preocupação ambiental (Anwar et al., 2013). A acumulação de PVC no meio ambiente afeta gravemente a fauna, a flora e a saúde do solo e causa riscos para a saúde humana e animal

(Barnes et al., 2009). Na Índia, os resíduos de PVC, aumentaram até 3,1 milhões de toneladas métricas em 2017.

Grandes quantidades de compostos organoclorados perigosos são formadas acidentalmente e lançados no meio ambiente em vários pontos do ciclo de vida do PVC. A formação de subprodutos organoclorados perigosos começa com a produção do gás cloro (Thornton, 2000). Quantidades extremamente grandes (da ordem de um milhão de toneladas por ano) de resíduos perigosos ricos em cloro são gerados na síntese do dicloreto de etileno (EDC) e do monômero de cloreto de vinilo (VCM), as matérias-primas para PVC (Hansen, 1999).

Os organoclorados tendem a ter várias características, todas derivadas das propriedades químicas fundamentais do átomo de cloro. As mesmas propriedades que tornam o cloro e os organoclorados úteis em aplicações industriais, de fato, são responsáveis por seus riscos ambientais (Thornton, 2000). A propriedade de reatividade faz o gás de cloro ser extremamente reativo e o torna um agente eficaz de lixiviação, desinfetante e matéria-prima química, mas também resulta na geração de uma mistura diversa de subprodutos, geralmente contendo centenas ou milhares de organoclorados, incluindo dioxinas, sempre que o cloro é usado (Henschler, 1994).

Os organoclorados que se quebram geralmente degradam-se em outros organoclorados, que podem ser mais persistentes e tóxicos do que a substância original. A estabilidade torna os organoclorados úteis, como os plásticos e os solventes, mas permite que se acumulem e se distribuam globalmente. A solubilidade no óleo aumenta com cada átomo de cloro adicionado e torna os organoclorados úteis como solventes e fluidos dielétricos, mas é diretamente responsável pela tendência de bioacumulação. A toxicidade geral dos organoclorados aplica-se a todos os tipos de efeitos tóxicos como toxicidade aguda, subcrônica e crônica, toxicidade reprodutiva, mutagenicidade e carcinogenicidade, tornando-os perigosos para os seres humanos e para a vida selvagem, uma vez que entram no meio ambiente (Pinheiro & Monteiro, 1992).

Produtos perigosos também são criados e lançados no ambiente durante a incineração de resíduos perigosos da produção de EDC e VCM, incluindo a incineração de produtos de PVC. Estas misturas químicas incluem poluentes extremamente perigosos como as dioxinas cloradas (dibenzopdioxinas policloradas), furanos clorados (dibenzofuranos policlorados), bifenilos policlorados (PCB), hexaclorobenzeno (HCB) e octaclorotenereno (OCS). Além

disso, grandes porções dessas misturas consistem em produtos químicos que ainda não foram identificados ou testados (Solomon, 1993).

De particular relevância para o ambiente e para a saúde é a liberação de ftalatos a partir de PVC flexível. A indústria de plásticos argumentou que a maioria dos ftalatos tem baixas pressões de vapor; portanto, não se espera que volatilizem muito. Mas essa previsão não é confirmada pela experiência, visto que os dados empíricos deixam claro que os ftalatos provenientes de produtos vinílicos são liberados em quantidades consideráveis para a atmosfera (Hansen, 1999).

Os estabilizadores de metais (particularmente o chumbo, o cádmio e os organoestânicos) também podem ser liberados a partir de produtos de vinil. O chumbo é liberado para a atmosfera a partir de persianas de vinilo e em água a partir de tubos de PVC. Os efeitos toxicológicos destas substâncias incluem danos ao desenvolvimento, neurológicos e reprodutivos (Yadav et al., 2014).

1.4.3 Degradação do cloreto de polivinil

Cerca de 30 a 50 por cento do vinil produzido anualmente acaba no lixo. Embora alguns materiais de construção tenham uma vida útil relativamente longa, grandes quantidades de vinil são descartadas quando a vida útil de um produto termina. Os produtos de construção são considerados como um setor de longo prazo de uso de PVC, mas os produtos de vinil em interiores comerciais são muitas vezes renovados bem antes de seus componentes serem fisicamente gastos e, portanto, têm vida relativamente curta (APR, 1998).

Através do processo mecânico, químico ou energético, o PVC proveniente do lixo doméstico, da coleta seletiva ou da indústria, pode ser reciclado, mas as taxas atuais de reciclagem das embalagens de PVC, na União Europeia, são inferiores a 3%. Essa reciclagem é feita por um processo parcial denominado “down-cycling”, que resulta em produtos com uma qualidade inferior, sem vantagens ambientais ou econômicas (European Commission, 2000).

Uma porção significativa de PVC descartado termina em aterros, e quase todo o resto é queimado, as proporções exatas variam de um país para outro. Em aterros sanitários, existem três preocupações sobre a eliminação de PVC (Socha, 1997). Primeiro, a persistência do PVC, que geralmente dura séculos em um aterro sanitário, apresenta um fardo significativo em termos da demanda por aterros sanitários. Em segundo lugar, a liberação de aditivos no

plástico pode contaminar as águas subterrâneas. Como os ftalatos e os metais não estão ligados quimicamente ao polímero, eles podem lixiviar os produtos descartados em lixiviados de aterro, eventualmente contaminando as águas subterrâneas. Em terceiro lugar, os incêndios podem ocorrer durante ou após o processo de eliminação, liberando substâncias perigosas para o ar, incluindo dioxinas e metais (EPA, 1998).

Incineradores de lixo e outras fontes de combustão são responsáveis pela maioria das emissões de dioxina identificados no ambiente, e o PVC é a fonte predominante de geração de dioxina nestas instalações. Nos incineradores de resíduos municipais, o PVC contribui com pelo menos 80% do cloro orgânico e 50 a 67% do cloro total na corrente de resíduos, embora represente apenas cerca de 0,5 por cento do peso da corrente de lixo (Socha, 1997).

A biodegradação oferece uma alternativa para a eliminação do PVC com a vantagem de um maior controle sobre o grau de degradação. Alguns micro-rganismos têm sido associados à biodegradação do PVC como *P. aeruginosa*, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula aurantiaca* e *Kluyveromyces* sp. (Webb et al. 2000; Kawai 2010). *Curvularia* sp. *Trogia buccinalis* e *Phanerochaete chrysosporium* foram testados com bons resultados na degradação da mistura PVC/policaprolactona (Martins-Franchetti et al., 2010).

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A contaminação de solos e mananciais por diferentes agentes químicos provoca desgaste e consequente diminuição da produtividade do solo, causando danos graves à saúde da população em geral. Por este motivo, há um grande interesse em se desenvolver biotecnologias para a descontaminação de ambientes poluídos por xenobióticos. A nível mundial, várias pesquisas têm focado no estudo da biorremediação de pesticidas, derivados de petróleo e também na biodegradação de plásticos e outros contaminantes ambientais.

Os plásticos são materiais baratos, leves, resistentes, duráveis e resistentes à corrosão, com altas propriedades de isolamento térmico e elétrico. A diversidade de polímeros e a versatilidade de suas propriedades são usadas para fazer uma vasta gama de produtos que trazem avanços médicos e tecnológicos, economia de energia e inúmeros outros benefícios sociais. Como consequência, a produção de plásticos aumentou substancialmente nos últimos 60 anos.

Quantidades substanciais de plástico se acumulam no ambiente natural e em aterros sanitários. Cerca de 10% do peso do fluxo municipal de resíduos é de plástico. O plástico descartado também contamina uma ampla variedade de *habitats* naturais terrestres, de água doce e marinha. Esses ambientes normalmente abrigam ainda bactérias resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, favorecendo a dispersão de genes de resistência.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo isolar bactérias com baixo nível de resistência a antimicrobianos, mas com potencial para degradação de polietileno, o plástico mais amplamente utilizado no mundo, e outros plásticos como polivinil e poliuretano.

Como o estado de São Paulo é uma região de grande diversidade industrial e, em função do descarte de diversos resíduos plásticos na natureza, a obtenção de micro-organismos com capacidade degradativa frente a esses contaminantes tem grande importância.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente projeto de pesquisa tem como objetivo obter isolados bacterianos com capacidade para degradar o polietileno (PEBD) e outros plásticos como o polivinil (PVC) e o poliuretano (PUR).

3.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias de amostras de solo e de água obtidas de um aterro sanitário e de um córrego contaminado com diesel, com potencial para degradar o polietileno de baixa densidade (PEBD);
- Identificar bactérias portadoras do gene *alk*B.
- Estudar a biodegradação do PEBD, PUR e PVC pelas bactérias que possuem o gene *alk*B
- Analisar o perfil de resistência das bactérias utilizadas nos testes de biodegradação.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de solo

Para o isolamento de bactérias com potencial de biodegradação do polietileno, poliuretano e polivinil, foram coletadas amostras de solo de uma região de descarte de lixo. Foram selecionados quatro pontos de coleta de amostras no Aterro Sanitário e no Incinerador de Resíduos Sólidos de Ribeirão Preto, localizado nas margens da Rodovia Mário Donegá, situado entre as coordenadas 21°10' a 21°15' de latitude Sul e 47°50' a 47°51' de longitude Oeste.

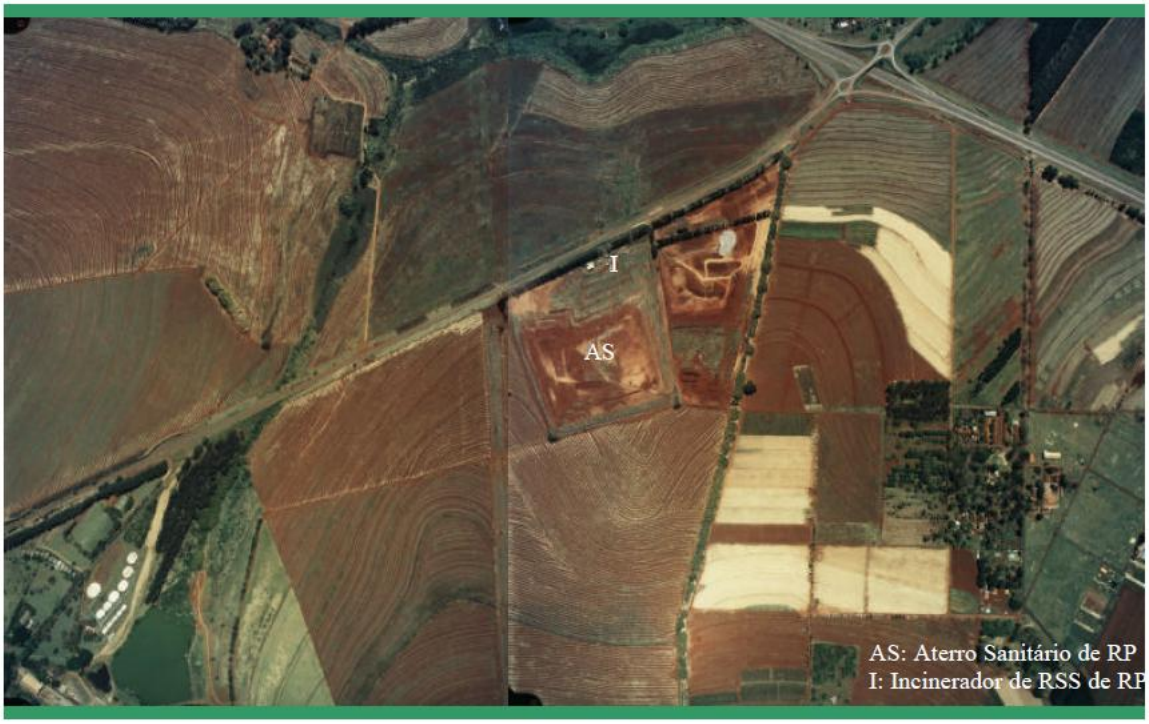

Figura 5 - Foto aérea do Aterro Sanitário e do Incinerador de Ribeirão Preto e das áreas circunvizinhas (Fonte: Secretaria Municipal de Planejamento, 2002).

4.2 Amostras de água

As amostras de água utilizadas no presente estudo foram coletadas de locais contaminados com resíduos tinta e óleo diesel pela empresa AgroControl.

A empresa coletou e forneceu 2 litros de água de cada ponto. Os frascos para coleta foram esterilizados previamente sem adição de conservantes e posteriormente acondicionados

em caixas térmicas. A coleta da água seguiu o protocolo do manual de procedimentos disponibilizado pela CETESB.

4.3 Isolamento de bactérias do solo e da água

O isolamento das bactérias do solo e da água foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Yoon et al. (2012), com algumas modificações. O meio de enriquecimento, Meio Mínimo de Sais (MMS), utilizado para o isolamento de bactérias com capacidade para degradar polietileno de baixa densidade (sacolinhas) tem a seguinte composição: K_2HPO_4 0,5 g/L; KH_2PO_4 0,04 g/L; NaCl 0,1 g/L; $CaCl_2$ x $2H_2O$ 0,002 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 g/L; $MgSO_4$ x $7H_2O$ 0,02g/L; $FeSO_4$ 0,001 g/L.

De cada amostra coletada, 1 g de solo ou 1 mL de água foi adicionado a um tubo contendo 10 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Reino Unido). Após 24 horas de incubação a 37° C, 10 mL da cultura foram inoculados em erlenmeyer com 90 ml de MMS contendo filmes de polietileno, cortados em pequenos discos de 5 cm de diâmetro. A cada sete dias 200 µL foram retirados e inoculados em placas com meio BHI para isolamento das bactérias com capacidade de degradar polietileno e os filmes foram transferidos para um novo meio de cultura MMS com novo inóculo bacteriano. Este procedimento foi repetido por quatro semanas.

4.4 Extração do DNA genômico

A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA foi utilizado como molde nas reações de PCR.

A concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas em DS-11 + Spectrophotometer (DeNovix, USA) utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As extrações com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas.

4.5 Detecção do gene *alk*B

A detecção do gene *alk*B foi realizada com descrito por Yoon et al. (2012) utilizando as seguintes condições: 5 minutos a 94°C para desnaturação inicial, um total de 35 ciclos, desnaturação a 94° C durante 1 min, anelamento a 57° C durante 1 min, extensão a 72° C

durante 1 min e extensão final a 72° C durante 10 min. A técnica de PCR foi realizada no termociclador ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems). Foram utilizados os iniciadores 5'-TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-3'e 5'-CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-3' para amplificação de um fragmento de 300 pb.

Cada reação de PCR foi realizada com um volume final de 50µL, sendo 28 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão 10x para PCR (PCR buffer minus Mg-10X); 3,5 µL de MgCl 2 (25 mM); 1 µL de solução contendo 10 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 4 µ de cada iniciador (12,5 pmol); 2 µL de DNA e 2,5 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase).

4.6 Identificação bacteriana por análise molecular

Os isolados bacterianos que apresentaram o gene *alk*B foram identificados molecularmente através da amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando os iniciadores 16F27 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`) e 23R 458 (5'-CCCCTTTCCCTCACGGTAC-3 ') (Hauben et al., 1997) para amplificação de um fragmento de 1.461 pb. Para cada reação de PCR foram utilizados 29,5 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 3,5 µL de $MgCl_2$ (25 mM), 1 µL de solução contendo 10 $mmol.L^{-1}$ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 µL de cada iniciador (25 µM) (*forward* e *reverse*), 5 µL de DNA genômico (100 ng) e 2 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (JumpStart™ Taq DNA Polimerase), obtendo um volume final de 50 µL. As condições utilizadas foram: 3 minutos a 94°C para desnaturação inicial, um total de 30 ciclos: 1 minuto a 94°C para desnaturação; 1 minuto a 57°C para anelamento; 2 minutos a 72°C para extensão e 5 minutos a 72°C para extensão final.

4.7 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% horizontal utilizando o tampão TAE 1X (solução estoque 50X – Tris 2 $mol.L^{-1}$, ácido acético 1 $mol.L^{-1}$ e EDTA 0,5 $mol.L^{-1}$ pH 8,0), e o mesmo utilizado para as corridas eletroforéticas. Ao término da corrida, as bandas foram visualizadas após coloração em brometo de etídio (0,5 $\mu g/mL^{-1}$) no transluminador E-Gel Imager (LIFE Technologies, Israel). Os fragmentos de DNA amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder para determinação do tamanho dos mesmos.

4.8 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o *Kit* Illustra™ GFX™ PCR (GE Health Care, Reino Unido) e, posteriormente, foram sequenciados. Os produtos foram sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados na reação de amplificação do respectivo produto gênico. As reações de sequenciamento foram realizadas no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP) (http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/), no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram analisadas utilizando o *software* ChromasPro versão 1.7.6 e, em seguida, utilizando o programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para pesquisa da identidade com outras sequências disponíveis no Genbank. Posteriormente, as sequências foram alinhadas utilizando o Clustal Omega EMBL-EMI Multiple Sequence Alignment (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

4.9 Preparo dos filmes de polietileno

Sacolas de polietileno foram coletadas de supermercados e cortadas em pequenos pedaços de 5 cm de diâmetro. Todas as peças foram limpas com água da torneira (para remover partículas de poeira), desinfetadas com etanol 70% e novamente lavadas com água destilada. Metade dos filmes foram submetidos a um tratamento químico, sendo transferidos para uma solução contendo 70 ml de Tween 80, 10 ml de hipoclorito de sódio e 983 ml de água destilada, sendo mantidos em agitação durante 30 a 60 minutos (El-Shafei et al., 1998). Os filmes foram transferidos para um erlenmeyer contendo água destilada sob agitação durante 1 hora. Em seguida, os filmes foram assepticamente transferidos para uma solução de etanol a 70% v/v durante 30 min. Finalmente, os filmes de polietileno foram transferidos para uma placa de Petri e incubados a 45 a 50°C durante a noite. Foram também utilizados filmes de polietileno lavados apenas com água e etanol, como explicado no início do parágrafo.

4.10 Preparo dos filmes de cloreto de polivinil e poliuretano

As bactérias isoladas com capacidade de degradar polietileno foram testadas também quanto ao potencial de degradação dos plásticos cloreto de polivinil e poliuretano. Para isso, foram preparados filmes dos plásticos diluídos em tetrahidrofurano numa concentração de

1% utilizando os plásticos PVC e PUR (Sigma). Uma vez diluídos foram distribuídos uniformemente em placas de petri de vidro e deixados na estufa por 24 horas. Os mesmos tratamentos utilizados nos filmes de PEBD foram empregados nas películas de PVC e PUR.

4.11 Avaliação da perda de peso dos filmes como indicativo da degradação microbiana

O mesmo procedimento de isolamento microbiano foi utilizado para avaliar a degradação microbiana nos filmes de PEBD, PUR e PVC. Os filmes tratados quimicamente e também aqueles que foram submetidos apenas à desinfecção inicial foram pesados (peso inicial) e inseridos assepticamente em diferentes erlenmeyers contendo 90 ml de MMS. Em seguida, os isolados bacterianos foram inoculados e incubados a 37° C, sob agitação, durante 3 meses. Após a incubação dos filmes com os isolados bacterianos, eles foram lavados com água destilada esterilizada e secos à temperatura ambiente, para finalmente serem pesados (peso final). A percentagem de degradação dos plásticos foi determinada por:

$$\text{Porcentagem (\%) de degradação} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

4.12 Análise de Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF)

As alterações químicas, como o desaparecimento ou a aparição de novos grupos funcionais e a ruptura de ligações químicas na superfície dos plásticos foram analisadas pela técnica de EIVTF. A mudança estrutural foi investigada usando o espectrômetro EQUINOX 55 FT-IR. Para cada filme de PEBD, um espectro foi retirado, de 400 a 4000 longitude de onda/cm-1.

4.13 Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As propriedades físicas, como mudanças na superfície, micro rachaduras e furos nos filmes provocados pelas bactérias foram analisadas por MEV. Para este fim, as amostras foram metalizadas com partículas de ouro (três descargas de 40 mA / 50s em atmosfera de árgon) em um metalizador de alto vácuo (Bal-Tec SCD 005) e analisadas por microscopia

eletrônica de varredura (MEV) (Leo, 435VF, UK) a 15,00 kV EHT sob três ampliações sucessivas (2,0, 5,0 e 10,0 KX).

4.14 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

A susceptibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos em estudo foi determinada pelo método de diluição em placa para obter a concentração inibitória mínima (CIM), conforme recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Os isolados bacterianos foram ressuspendidos em solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) até se obter uma turbidez compatível com a escala Mac Farland 0,5 ($1x10^6$ CFU mL-1). Posteriormente, foram adicionados 5 µL da suspensão em placas Mueller Hinton contendo diferentes concentrações de antimicrobianos, ampicilina, 25 µg mL^{-1}, cefotaxima 30 µg mL^{-1}, ceftazidima 30 µg mL-1, cefotaxina 200 µg mL-1, ceftriaxona 200 µg mL-1, imipenem 10 µg mL^{-1}, amicacina 30 µg mL^{-1}, gentamicina 10 µg mL^{-1}, tetraciclina 30 µg mL^{-1}, ciprofloxacina 2 µg mL^{-1}, levofloxacina 5 µg mL^{-1} e cloranfenicol 50 µg mL $^{-1}$. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 18-24 horas. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizados como cepas de controle de qualidade. Os resultados foram avaliados de acordo com os critérios CLSI (2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento, identificação e detecção do gene *alk*B

Os plásticos são polímeros orgânicos sintéticos derivados da polimerização de monômeros extraídos de óleo ou gás natural (Derraik, 2002, Rios et al., 2007, Thompson et al., 2009b). Desde o desenvolvimento do primeiro plástico sintético denominado baquelite, em 1907, várias técnicas de fabricação de baixo custo de diferentes tipos de plásticos foram otimizadas, resultando na produção em larga escala de plásticos leves, duráveis, inertes e resistentes à corrosão (Plastics Europe, 2010). Esses atributos levaram ao uso extensivo de plásticos em aplicações quase inesgotáveis (Andrady, 2011).

Embora os benefícios sociais do plástico sejam de grande alcance (Andrady e Neal, 2009), esse produto tem sido objeto de crescente preocupação ambiental, principalmente devido à durabilidade do mesmo, o que o torna altamente resistente à degradação (Barnes et al., 2009; Sivan, 2011). A grande maioria dos plásticos usados em diferentes aplicações tem como destino final os aterros sanitários, onde podem permanecer por muitos anos até serem decompostos (Barnes et al., 2009; Moore, 2008).

Para o isolamento de bactérias capazes de degradar o polietileno foram coletadas amostras de solo de um aterro sanitário e amostras de água contaminadas com diesel. Do aterro sanitário foram obtidos cinco isolados bacterianos e da água apenas um isolado, os quais apresentaram a capacidade de crescer em meio de cultura contendo polietileno como única fonte de carbono.

Em seguida foi feita a pesquisa do gene *alk*B nos seis isolados, entretanto, como apenas dois isolados (S5 e A1) foram positivos para a detecção desse gene, eles foram identificados e selecionados para os ensaios de degradação posteriores. Esses isolados foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como *Paenibacillus* sp. e *Bacillus cereus*, respectivamente (GenBank MK053775 e MH648616) (tabela 2).

Tabela 2 - Identificação e detecção do gene *alk*B nos isolados obtidos

Isolados	Identificação	Fonte	Gene *alk*B
S1	-	Solo	-
S2	-	Solo	-
S3	-	Solo	-
S4	-	Solo	-
S5	*Paenibacillus* sp.	Solo	+
A1	*Bacillus cereus*	Água	+

Heiss-Blanquet et al. (2005) quantificaram o gene *alk*B por qPCR em amostras de solo para avaliar a importância ecológica das bactérias portadoras desse gene na degradação de alcanos de cadeia curta. Eles observaram que a quantidade de *alk*B era dependente do ecossistema e das condições ambientais, sendo maior em solos contaminados com hidrocarbonetos. Muitos outros trabalhos concluíram que micro-organismos do solo podem degradar o polietileno (Gajendiran et al., 2016; Kathiresan et al., 2003; Gnanavel et al., 2016; Deepika e Jaya, 2015; Usha et al., 2011; Sowmya et al., 2014; Singh et al., 2016; Nanda et al., 2003; Peixoto et al., 2017).

Entre todos os gêneros bacterianos estudados, as *Pseudomonas* tem sido melhor investigadas quanto ao potencial para degradação do polietileno (Nanda et al., 2010; Sing et al., 2016; Kyaw et al., 2012; Deepika e Jaya, 2015; Balasubramanian et al., 2010; Kathiresan et al., 2003; Priyanka e Archana, 2011, Nanda e Sahu, 2010), entretanto, muitos outros estudos relataram a biodegradação do PEBD em *Staphylococcus*, *Bacillus* (Sing et al., 2016), *Streptomyces* (Deepika e Jaya, 2015), *Arthrobacter* (Balasubramanian et al ., 2010), *Moraxella* (Kathiresan et al., 2003), *Streptococcus*, *Proteus*, *Micrococcus* (Priyanka e Archana, 2011), *Lysinibacillus* (Esmaeili et al., 2013) e *Rhodococcus* (Gilan et al., 2004, Bonhomme et al., 2003, Nanda & Sahu, 2010).

Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro relato de uma bactéria do gênero *Paenibacillus* com potencial de degradação do polietileno em monocultura, visto que um estudo descreve um isolado de *Paenibacillus macerans* como membro de um consórcio

bacteriano capaz de colonizar a superfície do polietileno no início do processo de biodegradação (Nowak, 2011).

Por outro lado, o gênero *Paenibacillus* já foi investigado no processo de biodegradação de diferentes compostos. Singh (2009) investigou a biodegradação do fenol em cultura pura e mistas de *Paenibacillus* sp. e *Bacillus cereus* e Chandra (2011) também investigou a degradação de fenol por *Paenibacillus thiaminolyticus* e *Bacillus cereus* em condições axênicas e mistas. Espécies de *Paenibacillus* também foram investigadas na biodegradação co-metabólica do di-n-butil ftalato (Jin et al., 2014) e na biodegradação de sódio isopropilxantato (Natarajan et al., 2013).

Alguns estudos também relataram a degradação do polietileno por bactérias da espécie *B. cereus.* Sowmya et al. (2014b) isolou um *B. cereus* de um aterro local no distrito de Shivamogga, na Índia, para uso na biodegradação do polietileno. Neste caso, a degradação foi monitorada observando-se a perda de peso e as alterações na estrutura física das películas de polietileno por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (EIVTF).

No estudo conduzido por Suresh et al. (2011), um isolado *B. cereus* obtido de uma amostra de solo de compostagem se mostrou capaz de utilizar o polietileno como fonte de carbono e, através de experimentos de perda de peso e EIVTF. Auta et al. (2017) também investigaram a capacidade de degradação de microplásticos de polietileno tratados com ultravioleta em bactérias do gênero *Bacillus*, sendo utilizadas diferentes espécies do gênero, inclusive o *B. cereus*.

5.2 Testes de biodegradação

5.2.1 Testes de perda de peso

Após seis meses de incubação, os filmes foram avaliados para determinar se houve diferença no peso final dos mesmos. De forma geral, os filmes incubados em meio de cultura MSM com o isolado S5 (*Paenibacillus* sp.) apresentaram uma maior perda de peso do que os filmes incubados com o isolado A1 (*B. cereus*). Além disso, também foi observado que os filmes submetidos à desinfecção com tween 80, álcool e hipoclorito de sódio apresentaram uma perda de peso maior ao final do período de incubação do que os filmes que foram tratados apenas com uma desinfecção simples.

Na tabela 3 podem ser observados os valores da perda de peso dos filmes de PEBD. É possível observar que o filme de PEBD tratado quimicamente e incubado com o *Paenibacillus* sp. S5 apresentou uma diferença acentuada em relação à perda de peso do filme incubado com o isolado *B. cereus* A1 (30.8/17.8). A porcentagem de perda de peso dos controles variou entre 0,01 e 0,02%.

Tabela 3 - Valores da perda de peso dos filmes de PEBD.

Tratamento	Peso inicial (g) S5/A1	Peso final (g) S5/A1	Perda de peso (g) S5/A1	Perda de peso (%) S5/A1
Sem tratamento	0,0147/0,0146	0,0130/0,0131	0,0017 ± 0,0001/ 0,0015± 0,0001	11,6/10,3
Tratamento químico	0,0146/0,0146	0,0101/0,0120	0,0045 ± 0,0001/ 0,0026 ± 0,0001	30,8/17,8
Controle negativo sem tratamento	0,0145/0,0147	0,0142/0,0145	0,0003 ± 0,0001/ 0,0002 ± 0,0001	0,02/0,01
Controle negativo com tratamento químico	0,0145/0,0146	0,0143/0,0143	0,0002 ± 0,0001 /0,0003 ± 0,0001	0,01/0,02

S5: *Paenibacillus* sp., A1: *B. cereus*

Na avaliação da perda de peso nos filmes de PUR foi observada uma redução de peso moderada para as duas bactérias testadas (tabela 4). Contudo, a maior porcentagem de perda de peso foi observada no filme tratado quimicamente e incubado com *Paenibacillus* sp. (9,1%). Todos os controles tiveram uma perda de peso de 0,01% (tabela 4).

Tabela 4 - Valores de perda de peso dos filmes de PUR.

Tratamento	Peso inicial (g) S5/A1	Peso final (g) S5/A1	Perda de peso (g) S5/A1	Perda de peso (%) S5/A1
Sem tratamento	0,0154/0,0153	0,0143/0,0145	0,0011 ± 0,0001/ 0,0008± 0,0001	7,1/5,2
Tratamento químico	0,0153/0,0152	0,0139/0,0141	0,0014 ± 0,0001/ 0,0011 ± 0,0001	9,1/7,2
Controle negativo sem tratamento	0,0155/0,0153	0,0153/0,0152	0,0002 ± 0,0001/ 0,0001 ± 0,0001	0,01/0,01
Controle negativo com tratamento químico	0,0154/0,0154	0,0152/0,0153	0,0002±0,0001/ 0,0001 ± 0,0001	0,01/0,01

Legenda: S5: *Paenibacillus* sp., A1: *B. cereus*

Na tabela 5 pode ser observado o comportamento da perda de peso dos filmes de PVC. Os filmes apresentaram os menores valores de perda de peso antes e depois da incubação com as bactérias, com porcentagens entre 2 e 6,7%. O maior valor foi novamente obtido para o filme tratado quimicamente e incubado com *Paenibacillus* sp S5. Os controles tiveram uma perda de peso entre 0 e 0,01%.

Tabela 5 - Valores de perda de peso dos filmes de PVC.

Tratamento	Peso inicial (g) S5/A1	Peso final (g) S5/A1	Perda de peso (g) S5/A1	Perda de peso (%) S5/A1
Sem tratamento	0,0149/0,0149	0,0142/0,0146	0,0010 ± 0,0001/ 0,0005± 0,0001	4,7/2,0
Tratamento químico	0,0150/0,0149	0,0140/0,0144	0,0007 ± 0,0001/ 0,0003 ± 0,0001	6,7/3,3
Controle negativo sem tratamento	0,0151/0,0150	0,0150/0,0148	0,0001 ± 0,0001/ 0,0002 ± 0,0001	0,01/0,01
Controle negativo com tratamento químico	0,0150/0,0149	0,0150/0,0148	0,0000 ± 0,0001/ 0,0001 ± 0,0001	0,00/0,01

S5: *Paenibacillus* sp., A1: *Bacillus* sp.

Uma maneira simples e rápida de avaliar a biodegradação de polímeros é determinando a perda de peso. Os micro-organismos que crescem utilizando esses polímeros levam a um aumento do peso devido à aderência dos mesmos, enquanto a perda da

integridade do polímero leva à perda de peso, a qual é proporcional a área de superfície afetada (Gajendiran et al., 2016).

A perda de peso do polietileno também tem sido descrita por outros autores com as espécies isoladas neste trabalho, obtendo resultados inferiores aos achados neste estudo. Nowak (2011) relatou um máximo de 0,62% de degradação após a incubação de filmes de polietileno tratados quimicamente com um consórcio bacteriano contendo um *Paenibacillus* sp. Sowmya (2014b) conseguiu uma degradação máxima de 14% de polietileno tratado com UV medida pela perda de peso com *B. cereus* e Ibiene (2013) alcançou uma degradação de polietileno de baixa densidade de até 23,15% com espécies de *Bacillus*. Auta et al. (2017), após 40 dias de incubação de microplásticos de polietileno com *B. cereus*, obtiveram uma diminuição de peso de 1,6%. A perda de peso dos filmes de polietileno pode ser atribuída à quebra da estrutura de carbono devido à degradação enzimática pelas bactérias estudadas (Kyaw et al., 2012).

Por outro lado, outros autores têm obtido melhores resultados com outros gêneros bacterianos quanto a perda de peso. Singh et al. (2016) obtiveram máxima degradação com espécies de *Staphylococcus* (52%) e degradação mínima com espécies de *Pseudomonas* (11%) após 40 dias de incubação, um período menor do que aquele realizado nesse estudo. Após 120 dias de incubação, Kyaw et al. (2012) obtiveram a porcentagem máxima de redução de peso (20%) com *P. aeruginosa*. Deepika & Jaya (2015) relataram 24,22% de perda de peso após 6 meses de incubação com *Pseudomonas* sp. Estes últimos resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho. Não existem relatos de estudos avaliando a perda de peso de filmes de PU e PVC.

5.2.2 Análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (EIVTF)

O potencial dos isolados bacterianos S5 e A1 para biodegradação dos plásticos estudados também foi analisada por EIVTF (Fig. 6, 7, 9 e 12). Nos espectros obtidos da análise dos filmes de PEBD tratados e não tratados pode ser observado que houve uma variação na intensidade dos picos em diferentes regiões após a incubação com as bactérias (figuras 6 e 7). Para o espectro de controle, os picos de absorção característicos foram atribuídos a 719 cm^{-1}, 730 cm^{-1} (CH), 1462 cm^{-1}, 1472 cm^{-1} (C = C) e 2920, 2850 cm^{-1} (CH).

Os filmes com tratamento químico incubados com o isolado *Paenibacillus* sp. S5 apresentaram novos picos de absorção, evidentes após três meses e mais acentuados após seis meses de incubação, entre 1000 e 1700 cm^{-1}. Também foram formados ácidos carboxílicos (3300-2500 cm^{-1}), ésteres (1210-1163 cm^{-1}) e éteres (1075-1020 cm^{-1}) em diferentes frequências. A formação de ligações duplas terminais (1650 cm^{-1}) também foram observadas (figura 6).

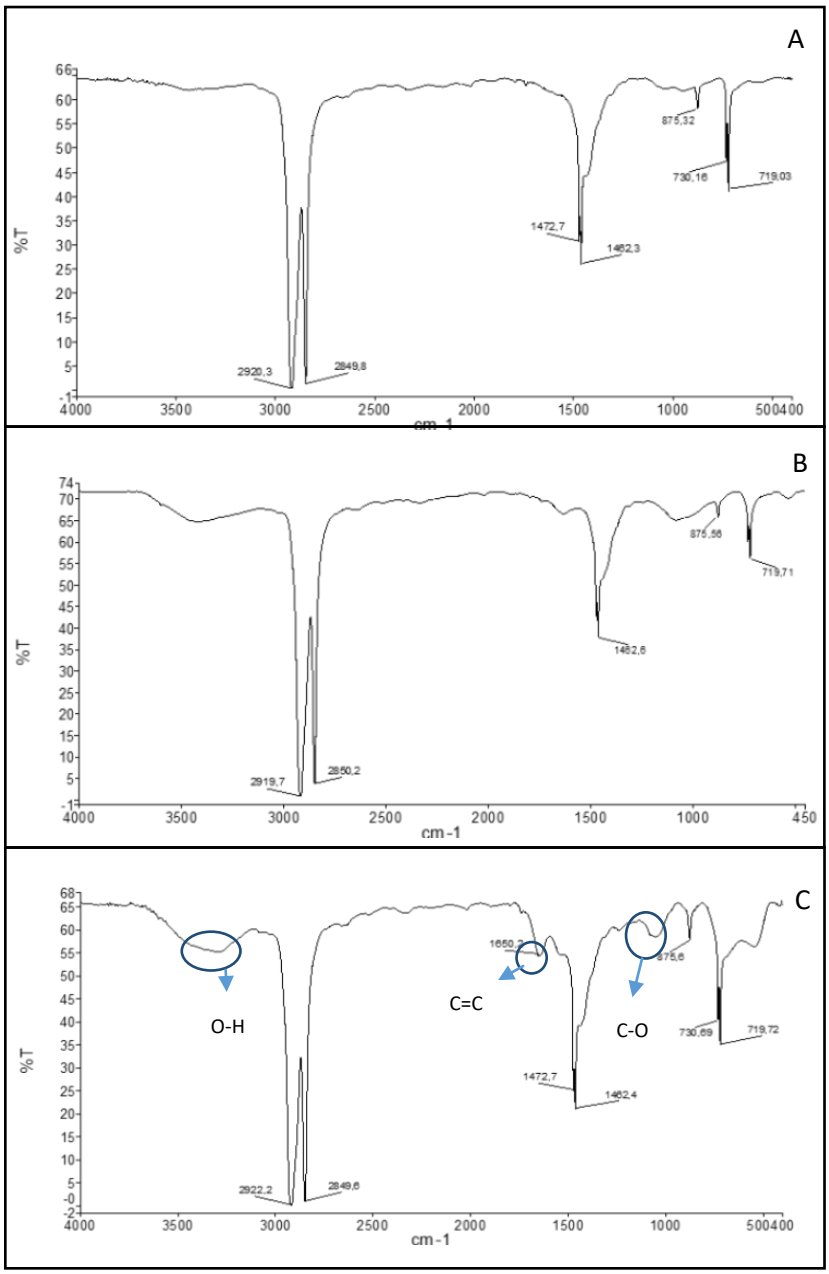

Figura 6 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PEBD com tratamento químico. A: MMS após 180 dias, B: *Paenibacillus* sp. após 90 dias, C: *Paenibacillus* sp. após 180 dias.

Os filmes com tratamento químico e incubados com o *B. cereus* A1 apresentaram mudanças menos evidentes do que aqueles incubados com o *Paenibacillus* sp. S5. Após três meses de incubação não foram detectados picos, entretanto, após seis meses foi detectada a formação inicial de picos relacionados aos ácidos carboxílicos e ésteres.

Além disso, foi ainda observada a formação de um pico a 970 cm^{-1} (menos evidente aos três meses e mais acentuado após seis meses de incubação) no filme não tratado e incubado com o *Paenibacillus* sp. S5, indicando a ocorrência de ligações duplas internas (Figura 7).

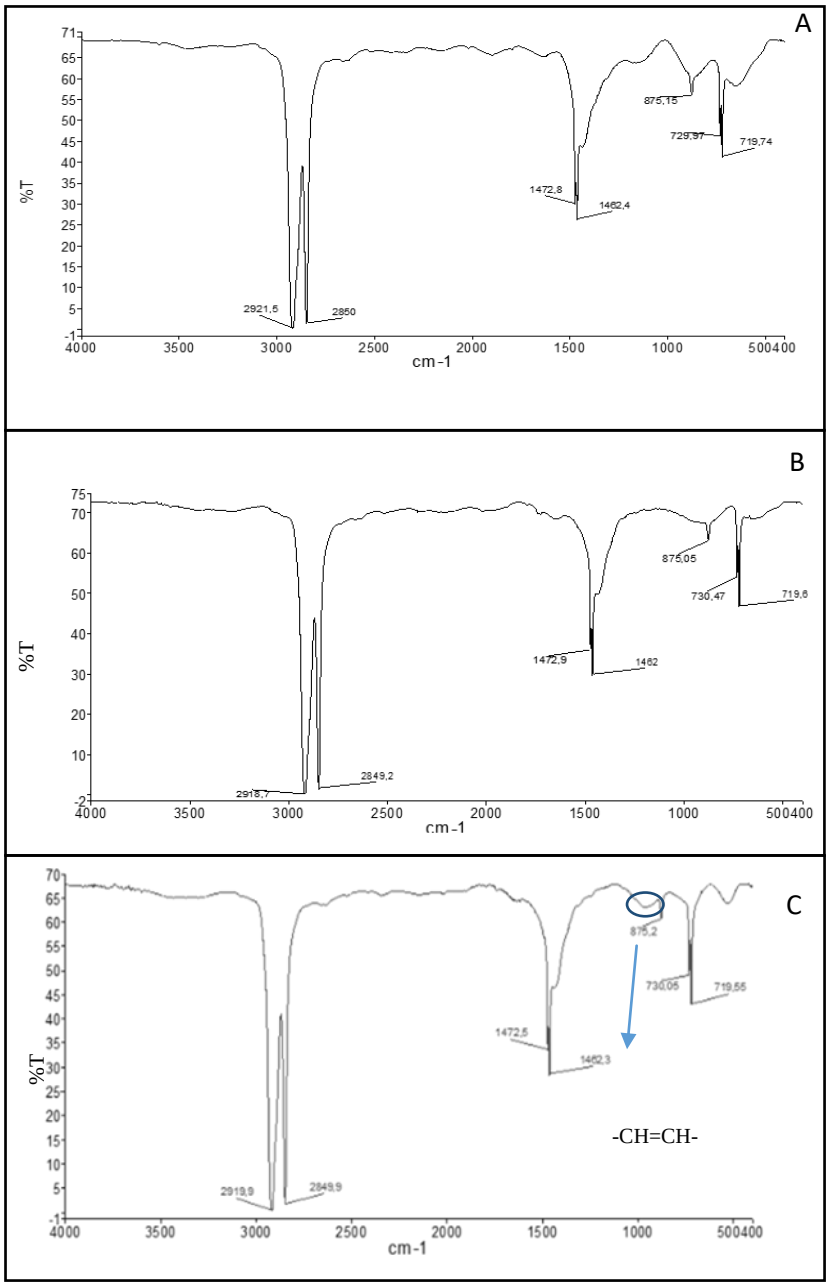

Figura 7 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PEBD sem tratamento. A: MMS após 180 dias, B: *Paenibacillus* sp. após 90 dias C: *Paenibacillus* sp. após 180 dias.

O filme não tratado incubado com *B. cereus* A1 apresentou bandas correspondentes a formação de ácidos carboxílicos semelhantes às observadas nos espectros dos filmes tratados quimicamente após 6 meses de incubação.

A espectroscopia de infravermelho também pode ser usada para avaliar a biodegradação de materiais poliméricos por monitoramento da variação de bandas características. Em geral, as mudanças estruturais são mínimas e uma interpretação confiável depende de uma análise correta de um conjunto de dados espectrais (Kloss et al., 2009). Nos resultados do presente estudo os espectros obtidos na avaliação dos filmes de polietileno incubados com os isolados de solo e de água apresentaram várias bandas características do processo de degradação (Gajendiran et al., 2016, Divyalakshmi & Subhashini, 2016, Esmaeili et al., 2013).

As novas bandas entre 1000 e 1700 cm^{-1} dos espectros dos filmes de PEBD com tratamento químico são possivelmente devidas às frações oxidadas, como também, banda na região de 3500 cm^{-1} características de porções contendo grupos –OH resultantes da biodegradação pelos micro-organismos (Corti et al., 2010). A formação de ligações duplas terminais foram observadas por outros autores, os quais relataram essa formação em amostras expostas a um ambiente biótico (Albertsson et al.,1987). Estudos conduzidos com *Chaetomium globosium* mostram também a formação de ácidos carboxílicos, ésteres e éteres indicativos da degradação pelo micro-organismo (Somyia et al., 2014).

A degradação do polietileno inclui a formação de radicais seguido pela absorção de oxigênio, resultando em produtos finais com grupos carbonila. Em seguida esses grupos são degradados, o que leva a ruptura da ligação C-C formando fragmentos oxidados de baixo peso molecular, aumentando a hidrofilicidade do polímero. Os ácidos carboxílicos entram no processo de β-oxidação e os dois carbonos do Acetil-CoA entram no ciclo de Krebs (TCA) e são completamente convertidos em dióxido de carbono e água (figura 8) (Arutchelvi et al., 2008).

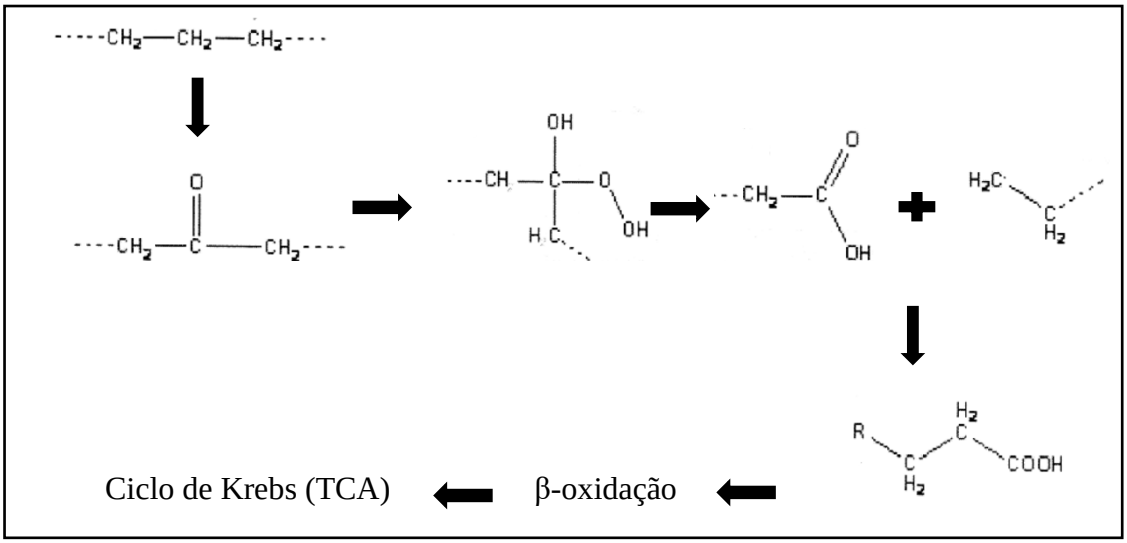

Figura 8 - Mecanismo de degradação do polietileno.

Os filmes de PUR apresentaram picos de absorção caraterísticos a 3321,4 cm^{-1} atribuído aos grupos OH e NH livres e os picos na região de 2854-3000 cm^{-1} (poliol). O pico a 1705,6 cm^{-1} corresponde aos grupos ésteres. O pico a 1533,6 cm^{-1} e a banda a 1237,4 cm^{-1} são atribuídos às amidas. O estiramento a 1103,8 cm^{-1} refere-se ao grupamento C–O–C dos éteres.

Nos filmes incubados com *Paenibacillus* sp., após 6 meses de incubação, foram observadas diferenças visíveis com picos mais amplos na região do 3300-3500 cm^{-1}, maior no caso dos filmes tratados quimicamente (figura 9) do que nos filmes não tratados. A região entre 500 e 800 cm^{-1} também teve mudanças em todos os casos, ou seja, nos filmes tratados e não tratados e incubados com *Paenibacillus* sp. e *B. cereus*. Os filmes incubados com o *Bacillus* não mostraram outras diferenças em relação ao controle incubado com o meio de cultura MMS.

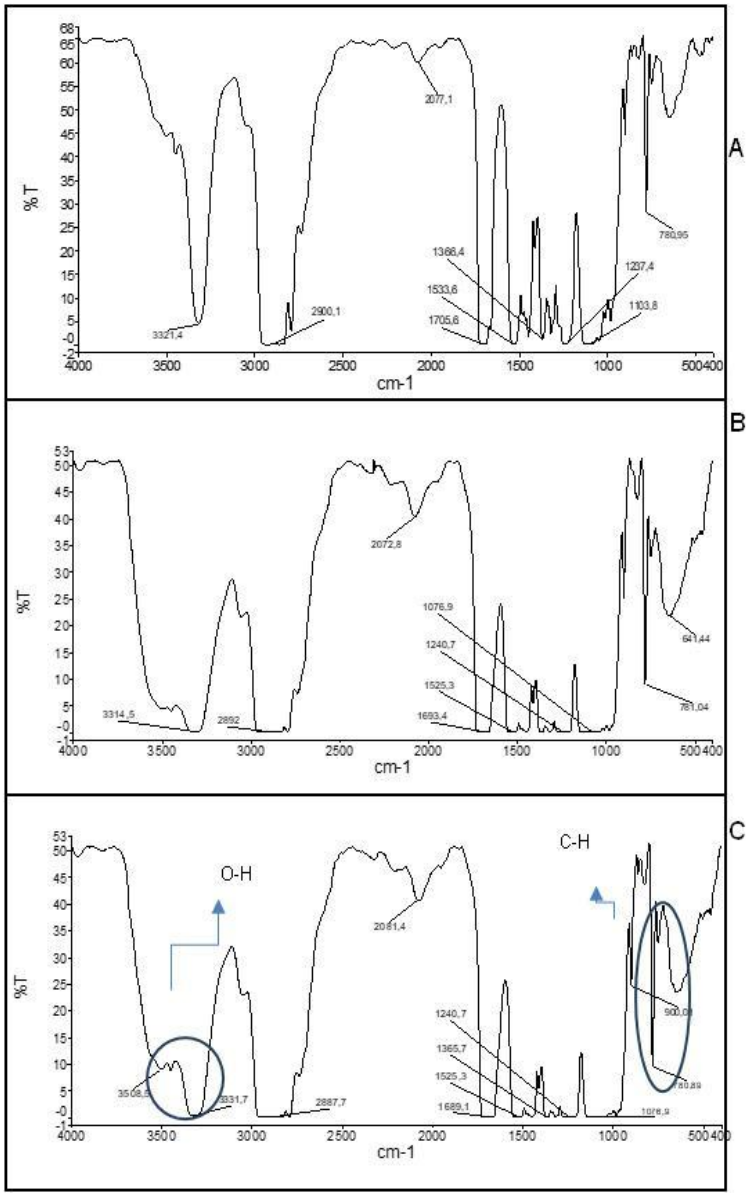

Figura 9 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PUR com tratamento químico. A: MMS após 180 dias, B: *Paenibacillus* sp. após 90 dias C: *Paenibacillus* sp. após 180 dias.

Os espectros de EIVTF dos filmes de PUR mostraram uma degradação inferior àquela obtida com os filmes de PEBD. Shah et al., (2012) também relataram mudanças notáveis no espectro de EIVTF de filmes de PUR tratados com *Aspergillus tubingensis* em relação à região entre 500 e 800 cm^{-1}, entre o espectro do controle e o tratado, mostrando que a porção de hidrocarbonetos do polímero está sujeita à degradação por micro-organismos.

Shah et al., (2012) também obtiveram espectros de EIVTF de filmes de PUR incubados com as bactérias *P. aeruginosa* MZA-85 e *B. subtilis* MZA-75. Nesses espectros foi observado um pico a 3325 cm^{-1}, ampliado em relação ao controle, devido ao aparecimento de grupos OH. Oprea et al., (2010) também atribuíram o alargamento do pico em 3270-3335 cm^{-1} à sobreposição do pico NH por OH.

Metabólitos contendo o grupo OH são descritos como produtos da degradação do PUR, entre eles o ácido adípico, dietileno e trimetilol propano. Uma possível via de degradação foi proposta por Nakajima-Kambe (1997) (figura 10).

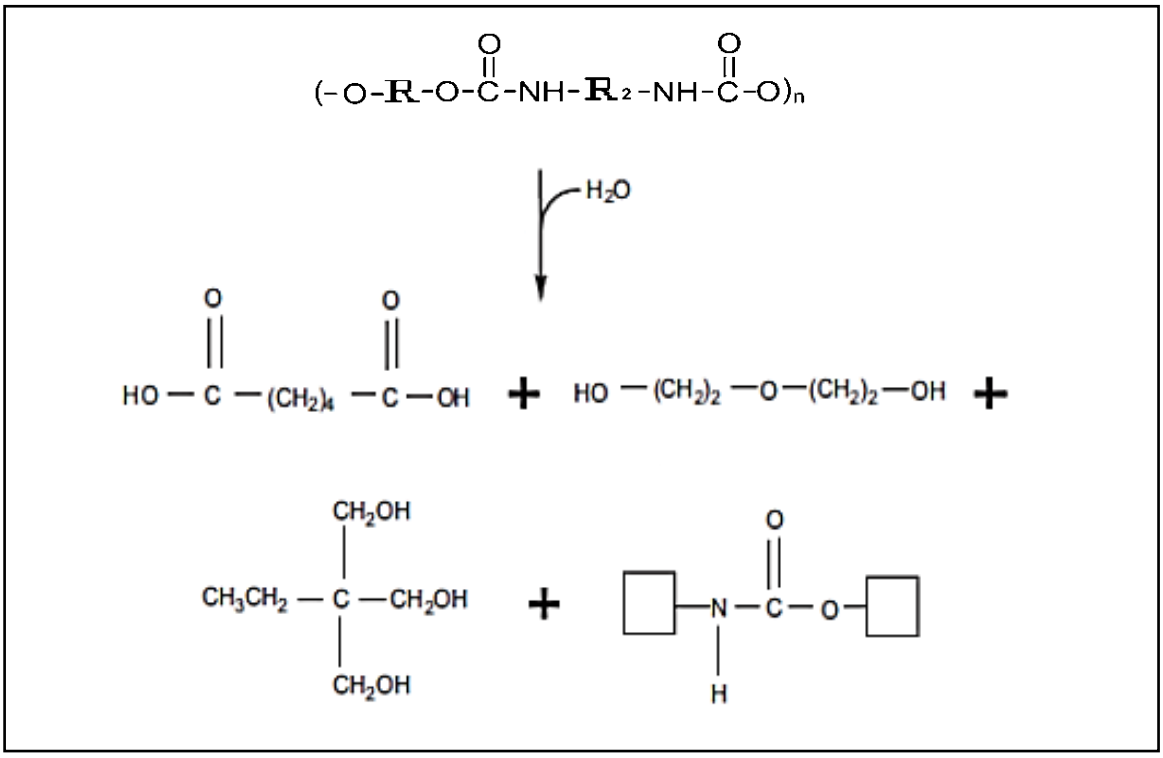

Figura 10 - Via de degradação do poliuretano (adaptação de Nakajima-Kambe, 1997)

Uma análise da degradação do PUR por *Bacillus* sp. foi realizada utilizando técnicas como mobilidade eletroforética, impedância elétrica e medidas da difração dinâmica da luz. Os resultados obtidos demonstram que as células bacterianas se unem ao PUR formando flocos e, em seguida, ocorre a degradação das partículas de PUR expostas. Foi proposto que no sistema de degradação de PUR pelo *Bacillus* existem duas populações de células, uma que permanece ligada ao PUR e outra livre. As células aderidas ao PUR o degradam em

metabólitos solúveis que são consumidos pelas células livres como fontes de nutrientes (Blake & Howard, 1998; Rowe & Howard, 2002).

O espetro EIVTF obtido da análise dos filmes de PVC apresentou picos característicos a 2969,9 cm^{-1} (CH_2 e CH); 2910,3 cm^{-1} (CH_2 e CH); 1426 cm^{-1} (CH_2); 1331,9 cm^{-1} (CH em CH-Cl); 1252,9 cm^{-1} (CH em CH-Cl); 959,11 cm^{-1} (CH_2) e 694,45 cm^{-1} (C-Cl). Após seis meses não foram visualizadas diferenças significativas entre os filmes incubados apenas com o meio MMS e aqueles contendo as bactérias, embora possam ser observadas mudanças na intensidade dos picos e na região do 3300 cm^{-1}, correspondente aos alcinos, principalmente nos filmes tratados quimicamente e incubados com o *Paenibacillus* sp. (Figura 11).

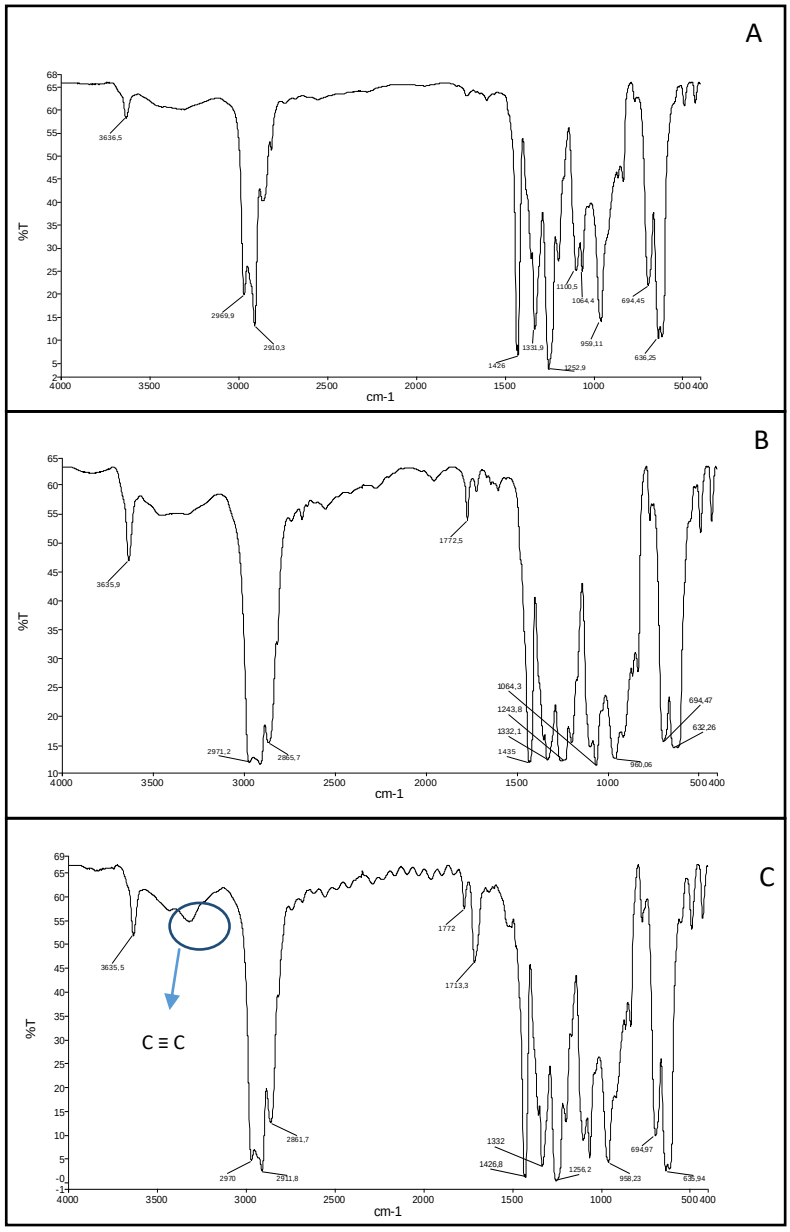

Figura 11 - Espetro de EIVTF após seis meses de incubação com filmes de PVC com tratamento químico. A: MMS após 180 dias, B: *Paenibacillus* sp. após 90 dias, C: *Paenibacillus* sp. após 180 dias.

O PVC é um plástico resistente a diferentes produtos químicos e tem baixa absorção de umidade. Existem muitos estudos sobre a degradação térmica e a fotodegradação do PVC, mas apenas alguns relatos sobre sua biodegradação. Segundo Kirbas et al. (1999), o PVC de baixo peso molecular pode ser exposto à biodegradação por fungos causadores da podridão branca. Nesse estudo foram observadas alterações nos espectros dos filmes de PVC obtidos por EIVTF antes e depois da incubação com o fungo.

A formação de picos correspondente aos alcinos nos espectros EIVTF dos filmes de PVC incubados com as bactérias pode ser explicado devido ao uso em grande escala de acetileno (que pertence à classe dos alcinos) na fabricação do PVC.

De forma geral, os resultados obtidos nos experimentos de EIVTF são coincidentes com a perda de peso dos filmes. Os filmes de PEBD mostraram sinais mais indicativos de degradação que os filmes de PUR e PVC. Os filmes tratados quimicamente foram também mais suscetíveis à degradação. O *Paenibacillus* sp. foi a bactéria que apresentou maior diminuição do peso dos filmes e que alterou mais significativamente os espectros de EIVTF após o período de incubação, em relação ao controle incubado apenas com o meio MMS.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As mudanças morfológicas na superfície dos filmes dos plásticos antes e após a exposição às bactérias do estudo foram investigadas usando a técnica de MEV. A película controle dos plásticos sem tratamento revelou morfologia homogênea e lisa (Figura 12).

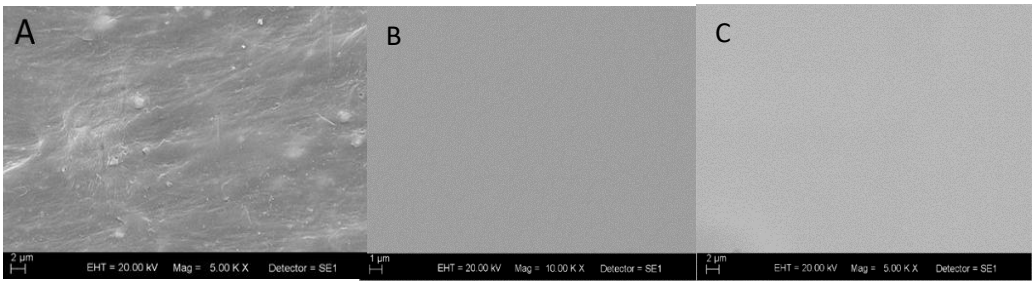

Figura 12 - MEV de filmes dos plásticos estudados. A: filmes não-tratados de PEBD, B: filmes não-tratados de PUR, C: filmes não-tratados de PVC.

Além disso, nenhuma característica especial foi detectada na micrografia dos filmes após o tratamento químico (Figura 13). Após a incubação dos filmes apenas com o meio MMS não houve nenhuma mudança observada nas micrografias, as quais também apresentaram uma morfologia lisa.

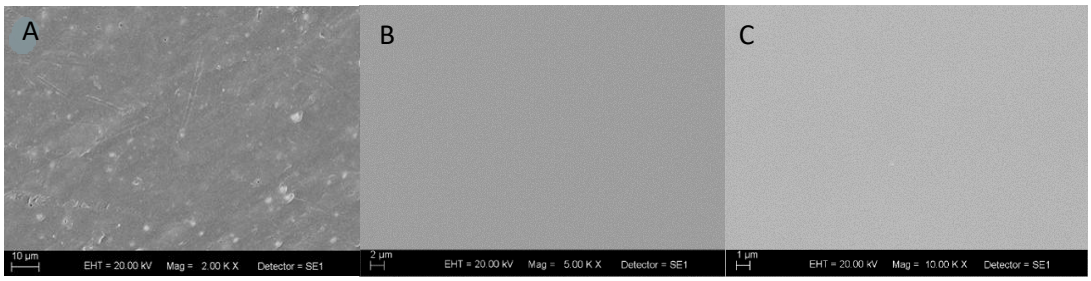

Figura 13 - MEV de filmes dos plásticos após tratamento químico. A: filmes tratados de PEBD, B: filmes tratados de PUR, C: filmes tratados de PVC.

No filme de PEBD incubado com a bactéria *Paenibacillus* sp. S5 foram observados sinais de deformação superficial, as quais surgiram após 90 dias de incubação em ambos os casos, ou seja, nos filmes sem tratamento (Fig.14 A, B) e nos filmes com tratamento químico (Fig. 14 C, D).

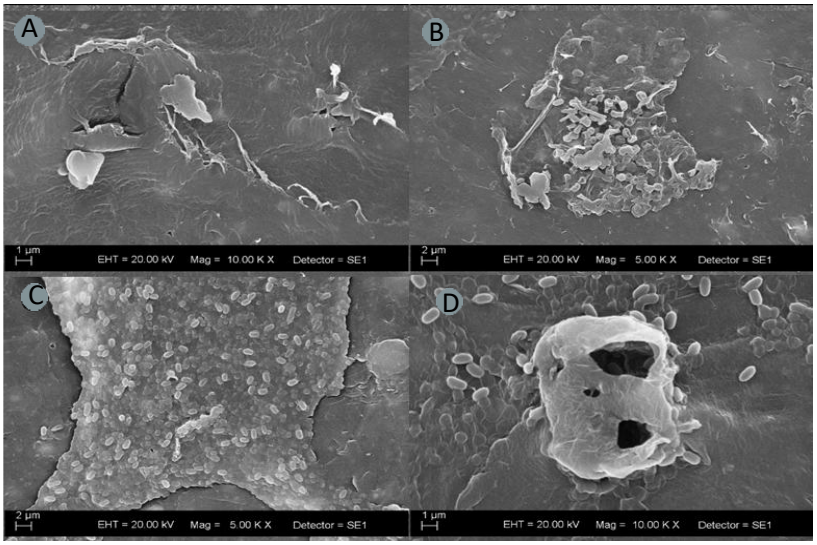

Figura 14 - MEV de filmes de PEBD após 3 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS. A, B: filmes não tratados de PEBD, C, D: filmes tratados de PEBD.

Essas deformações se mantiveram depois dos seis meses de incubação (Figuras 15 A e B). Algumas bactérias também podem ser observadas na superfície do filme, indicando a capacidade de aderência das mesmas, bem como a capacidade de utilização do PEBD (Figuras 14 e 15). Nos filmes tratados quimicamente, as bactérias aderidas ao filme de polietileno foram vistas em maior quantidade, quando comparados aos filmes sem

tratamento, e um maior número de orifícios e rupturas foram também detectados. Um indicativo de degradação pode ser visto nos filmes com tratamento químico em locais onde as bactérias se encontram aderidas formando orifícios nos filmes (Figuras 14 D, 15 B).

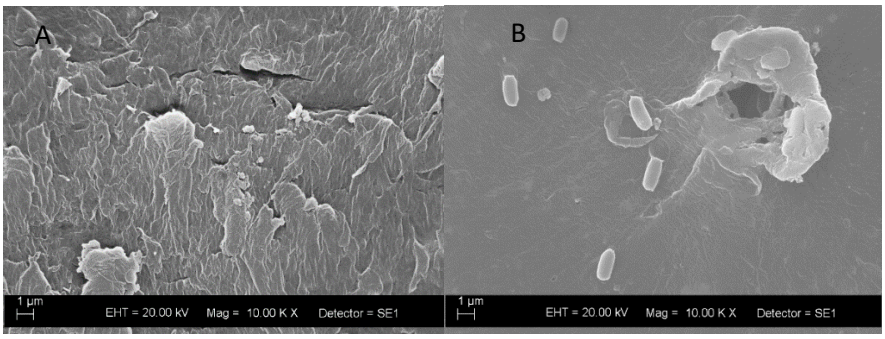

Figura 15 - MEV de filmes de PEBD após 6 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS. A: filme não tratado de PEBD, B: filme tratado de PEBD.

As micrografias dos filmes com e sem tratamento de PEBD incubados com o isolado de *B. cereus* mostraram características similares aos incubados com *Paenibacillus* sp., contudo, a formação de biofilme e a descamação foi menos acentuada (figura 16).

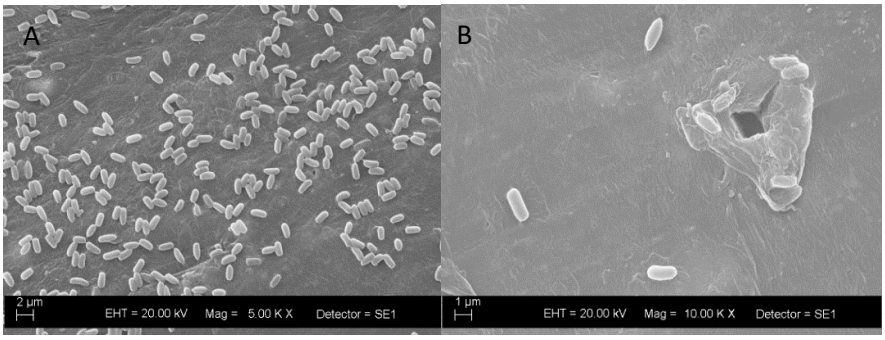

Figura 16 - MEV de filmes de PEBD após 3 meses de incubação com *B. cereus* A1 em MMS. A: filme não tratado de PEBD, B: filme tratado de PEBD.

Após o tempo final de incubação do ensaio, as micrografias dos filmes de PEBD incubados em MMS com *B. cereus* apresentaram os mesmos sinais de degradação das micrografias dos filmes de 3 meses, apenas com orifícios mais acentuados (figura 17).

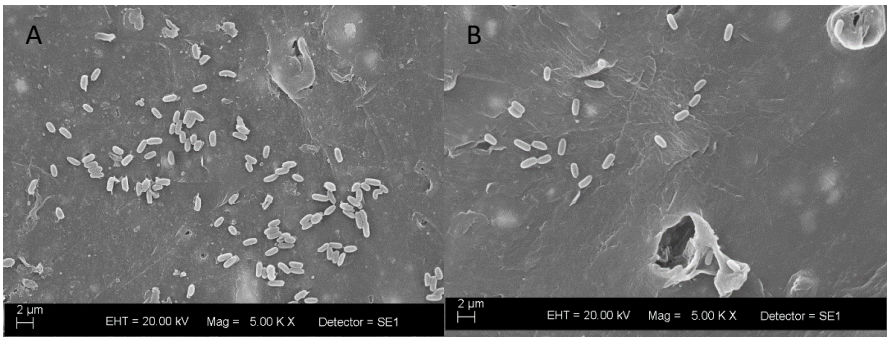

Figura 17 - MEV de filmes de PEBD após 6 meses de incubação com *B. cereus* A1 em MMS. A: filme não tratado de PEBD, B: filme tratado de PEBD.

As micrografias dos filmes de PUR após incubação com as bactérias em estudo são apresentadas nas figuras 18 a 20. A Figura 18 mostra as células do *Paenibacillus* sp. S5 formando aglomerados na superfície dos filmes tratados e não tratados de PUR após 3 meses de incubação.

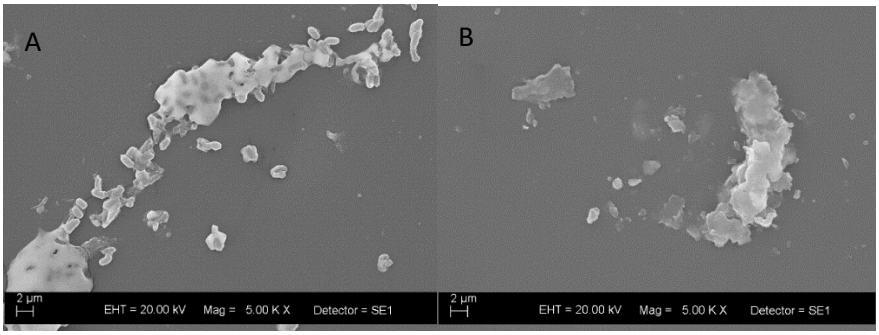

Figura 18 - MEV de filmes de PUR após 3 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS. A: filme não tratado de PUR, B: filme tratado de PUR.

Após 6 meses, entretanto, a formação de biofilme aparece mais evidente com maior quantidade de células na superfície (figura 19).

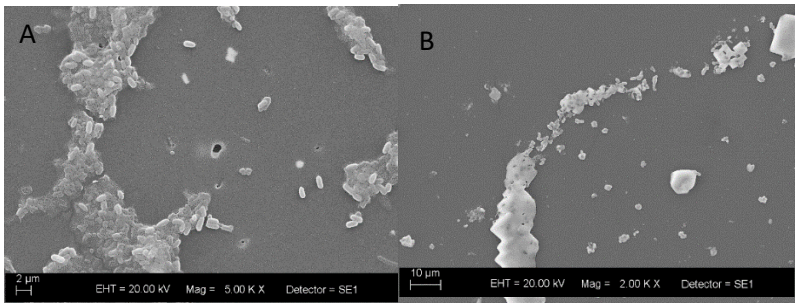

Figura 19 - MEV de filmes de PUR após 6 meses de incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS. A: filme não tratado de PUR, B: filme tratado de PUR.

Nenhuma mudança em relação ao controle foi observada nos filmes de PUR incubados com o *B. cereus* após três meses de incubação. Após seis meses de incubação podem ser observadas algumas bactérias aderidas à superfície dos filmes tratados e não tratados quimicamente (Figura 20).

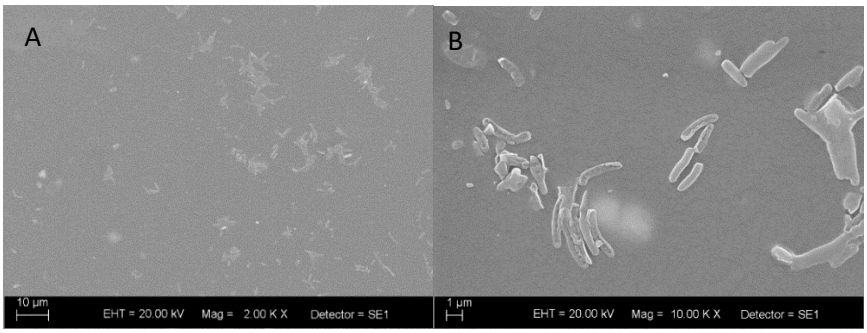

Figura 20 - MEV de filmes de PUR após 6 meses de incubação com *B. cereus* A1 em MMS. A: filme não tratado de PUR, B: filme tratado de PUR.

Após três meses de incubação dos filmes de PVC com o isolado S5 no meio MMS podem ser observadas bactérias aderidas à superfície, em maior quantidade no filme tratado quimicamente (figura 21 A) que no filme não tratado (figura 21B). Aos seis meses de incubação a quantidade de bactérias aderidas é maior, entretanto, não foram encontradas rachaduras nem furos (figuras 21 C e D). Os filmes de PVC incubados com *B. cereus* em MMS não apresentaram diferenças em relação aos controles, nem a presença de bactérias na superfície dos filmes após 3 e 6 meses de incubação.

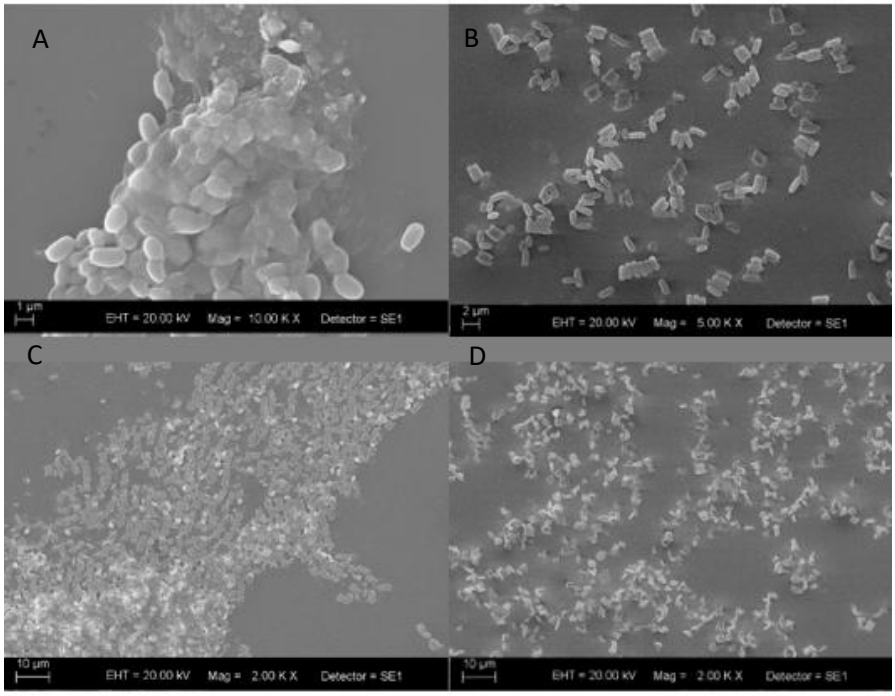

Figura 21 - MEV de filmes de PVC após a incubação com *Paenibacillus* sp. S5 em MMS. A: filme não tratado de PVC após 3 meses de incubação, B: filme tratado de PVC após 3 meses de incubação, C: filme não tratado de PVC após 6 meses de incubação, D: filme tratado de PVC após 6 meses de incubação.

A avaliação das modificações macroscópicas em materiais plásticos, como rugosidade da superfície, formação de poros, rachaduras e mudanças de cor, é um método usado para estimar a biodegradação de polímeros (Lucas et al., 2008). Os resultados alcançados após a análise dos filmes por MEV são consistentes com os experimentos de EIVTF e com a perda de peso e também com outros estudos que relataram a formação de cavidades e a presença de biofilme nas películas analisadas (Bonhomme et al., 2003, Kyaw et al., 2012).

As micrografias mostraram sinais mais evidentes de degradação nos filmes de PEBD, principalmente nos filmes tratados quimicamente, com o aparecimento de poros e grande quantidade de células associadas à superfície.

A hidrofobicidade dos polímeros geralmente interfere na adesão bacteriana à superfície, já que a maioria das superfícies bacterianas são hidrofílicas (Gilan, 2004). Albertsson et al. (1993) mostraram que o Tween 80 aumentou a adesão e a biodegradação do polietileno por *P. aeruginosa*.

A degradação microbiana de um polímero sólido requer a formação de um biofilme na superfície do mesmo para permitir que o micro-organismo utilize eficientemente o substrato não solúvel (Gilan, 2004). Isso pode explicar a biodegradação relativamente melhor dos plásticos no caso de filme com tratamento químico. Em contraste, o filme sem tratamento não produziu um biofilme significativo e foi menos biodegradável, por ser menos hidrofóbico. É bem conhecido que a síntese de biofilmes por bactérias favorece a sua adesão a superfícies, contribuindo para a sobrevivência das mesmas em ambientes pouco nutritivos, fazendo com que as bactérias possam utilizar substratos sólidos (Linos et al., 2000).

Nos filmes de PUR e PVC observou-se uma menor quantidade de células associadas a superfície e poucos sinais de degradação, contudo, os resultados mais significativos foram também encontrados nos filmes tratados quimicamente.

Os filmes incubados com a bactéria isolada do solo, *Paenibacillus* sp. S5, apresentaram micrografias com maior evidência de degradação do que aqueles incubados com o *B. cereus* A1, confirmando os resultados obtidos pelos experimentos de perda de peso e EIVTF. O ambiente do aterro sanitário, do qual foi isolada a bactéria S5, pode ter favorecido o potencial de degradação dos plásticos por este isolado bacteriano.

Nos trabalhos conduzidos por Sowmya et al. (2014) e Suresh et al. (2011), os autores investigaram a degradação do polietileno com isolados de *B. cereus* e os resultados da MEV mostraram a formação de cavidades, bem como a adesão bacteriana e a formação de biofilme nas películas superficiais do polímero expostos ao meio biótico, resultados similares aos obtidos no presente estudo.

Shah et al. (2008) analisaram filmes de PUR por MEV após um mês de tratamento com um consórcio de isolados bacterianos no teste de Sturm e observaram modificações como a aparência de fissuras e manchas pretas na superfície do PUR após o tratamento. Sarkar e Adhikari (2007) usaram a MEV para observar modificações da superfície de filmes de PUR incubados com *P. aeruginosa* e relataram um aumento gradual no aparecimento de sulcos e fissuras na superfície dos filmes tratados do dia 15 ao dia 180. Nakkabi et al. (2014) também estudaram a degradação de PUR e observaram que após o contato com a bactéria *Bacillus safensi*, a superfície apresentava rachaduras com um claro crescimento das bactérias na superfície.

5.3 Perfil de resistência

O perfil de suscetibilidade dos isolados foi realizado com o objetivo de avaliar se os isolados bacterianos também possuíam genes de resistência, o que seria indesejável para o uso dos mesmos como instrumento de biorremediação. O isolado de *Paenibacillus* sp. apresentou suscetibilidade a todos os antibióticos testados, exceto a amicacina. O *B. cereus* mostrou-se mais resistente, com suscetibilidade a 7 dos 11 antibióticos testados mostrando resistência aos antibióticos ampicilina 25 μg mL^{-1}, cefotaxima 30 μg mL^{-1}, ceftazidima 30 μg mL^{-1} e amicacina 30 μg mL^{-1}.

Ao longo dos últimos anos, o papel do meio ambiente como importante fonte e via de disseminação da resistência tem sido cada vez mais reconhecida (Martinez 2008; Wright 2010; Ashbolt et al. 2013; Finley et al., 2013; Pruden et al., 2013; Bondarczuk et al., 2015). Portanto, o meio ambiente pode funcionar como fonte de genes de resistência aos agentes patogênicos e para a disseminação de bactérias resistentes, incluindo patógenos humanos (Kallmeyer et al., 2012), com pressão suficiente para promover o recrutamento de novos determinantes de resistência, mas ele também pode ajudar a rearranjar os fatores de resistência existentes (Pruden, 2014).

Os antibióticos podem entrar no ambiente através de várias rotas diferentes. Podem ser liberados de hospitais, bem como de efluentes de águas residuais hospitalares (Wellington, 2013; Hughes et al., 2013). Os antibióticos também são usados terapeuticamente ou como promotores de crescimento em gado e em aves, podendo, dessa forma, serem carreados diretamente no meio aquático (Wellington, 2013). As rotas pelas quais os seres humanos podem entrar em contato com bactérias portadoras de genes de resistência são numerosas (Baquero et al., 2008). Elas incluem o consumo de culturas cultivadas por lodo contaminado usado como fertilizante e o consumo de águas contaminadas (Wellington et al., 2013). Furlan e Stehling (2017) encontraram genes codificadores das enzimas ESBL SHV, OXA-1, CTX-M-14 e OXA-48-like no solo do aterro do presente estudo, indicando a presença de genes de resistência a antimicrobianos nesta área.

A seleção de espécies bacterianas com baixa resistência a antibióticos, além de alta capacidade metabólica é importante para proteção contra a disseminação de genes de resistência aos antibióticos durante processos de biorremediação (Buyukunal & Tas, 2017).

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Foram isoladas duas bactérias portadoras do gene *alk*B, uma de solo e outra de água, as quais foram identificadas como *Paenibacillus* sp. S5 e *Bacillus cereus* A1, respectivamente.

- Os isolados S5 e A1 apresentaram capacidade de degradar o PBDE em condições aeróbias, demonstrado pelo aparecimento de novos grupos funcionais indicativos de degradação, como grupos carbonila, diminuição do peso final, e formação de poros nos filmes de polietileno.

- As bactérias estudadas, S5 e A1, apresentaram pouco potencial para degradação dos plásticos PUR e PVC, sendo o PVC o que se apresentou menos suscetível à degradação.

- Os resultados mais promissores foram obtidos com o isolado S5, o qual pode ser utilizado na biodegradação de plásticos.

- O baixo perfil de resistência do *Paenibacillus* sp. S5 é um bom indicativo para que este isolado possa ser utilizado em processos de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, A.C., ANDERSSON, S.O., KARLSSON,S. The mechanism of biodegradation of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability,** v.18, p.73–87, 1987.

ALBERTSSON, A.C., SARES, C., KARLSSON, S. Increased biodegradation of LDPE with nonionic surfactants. **Acta Polymerica,** v. 44, p. 243–246, 1993.

ANDRADY, A.L. MICROPLASTICS in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin,** v.62, p.1596–1605, 2011.

ANDRADY, A.L., NEAL, M.A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,** v.364, p.1977–1984, 2009.

ANWAR, M.S., NEGI, H., ZAIDI, G.H., GUPTA, S., GOEL, R. Biodeterioration studies of thermoplastics in nature using indigenous bacterial consortium. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v.56, p.475-484, 2013.

APPIAH, J.A. et al. Use of waste plastic materials for road construction in Ghana. **Case Studies in Construction Materials**, v. 6, 2017.

ARUTCHELVI, J., SUDHAKAR, M., ARKATKAR, A., DOBLE, M., BHADURI, S. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. **Indian Journal of Biotechnology**, v.7, p.9-22, 2008.

ASHBOLT, N.J., AMEZQUITA, A., BACKHAUS, T. Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. **Environmental Health Perspective**, v.121, p.993–1001, 2013.

AUTA, H.S., EMENIKE, C.U., FAUZIAH, S.H. Screening of *Bacillus* strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation. **Environmental Pollution,** p.1-8, 2017.

BALASUBRAMANIAN, V., NATARAJAN, K., HEMAMBIKA, B., RAMESH, N., SUMATHI, C.S., KOTTAIMUTHU, R., KANNAN, V.R. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. **Letters of Applied Microbiology**, v.51, p.205–211, 2010.

BAQUERO, F., MARTINEZ, J.L., CANTON R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion Biotechnology**, v.19, p.260–5, 2008.

BARNES, D.K.A., GALGANI, F., THOMPSON, R.C., BARLAZ, M. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,** v.364, p.1985–1998, 2009.

BARNES, D. K. A., MILNER, P. Drifting plastic and its consequences for sessile organism dispersal in the Atlantic Ocean. **Marine Biology**, v.146, p.815-825, 2005.

BLAKE, R.C., HOWARD, G.T. Adhesion and growth of a *Bacillus* sp on a polyesterurethane. **Int. Biodeter. Biodegrad**. 42:63–73; 1998.

BONANNO, G., ORLANDO-BONACA, M. Ten inconvenient questions about plastics in the sea. **Environmental Science and Policy,** v. 85, p.146-154, 2018.

BONDARCZUK, K., MARKOWICZ, A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. **Environmental International**, v.87, p.49–55, 2015.

BONHOMME, S., CUER, A., DELORT, A.M., LEMAIRE, J., SANCELME, M., SCOTT, G.Environmental biodegradation of polyethylene. **Polymer Degradation and Stability**. v.81, p.441–452, 2003.

BYUNTAE, L., ANTHONY, L.P., ALFRED, F., THEODORE, B.B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by Phanerocheate and Streptomyces species. **Applied Environmental Microbiology**, v.57, p.678–688, 1991.

BUYUKUNAL, E.B., TAS, S. Gram Negative Bacterial Diversity and Antimicrobial Resistance Profiles in Heavily Polluted Environmental Samples around The Sır Dam Lake (Turkey). **Microbiological Research Journal International,** v.5, p.1-10, 2017.

CENSKY, E. J., HODGE, K., DUDLEY, J.. Over-water dispersal of lizards due to hurricanes. **Nature**, p.395-556, 1998.

CHANDRA, R., YADAV, S., BHARAGAVA, R.N., RAI, V. Phenol degradation by Paenibacillusthiaminolyticus and Bacillus cereus in axenic and mixed conditions.**World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.2939-2947, 2011.

CHUNG, S.Y., YETTELLA, R.R., KIM, J.S., KWON, K., KIM, M.C., MIN, D.B. Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. **Food Chemicals**, v.129, p.1420–1426, 2011.

Clinical and laboratory standards institute.Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA. **CLSI** M 100-S23, 2017.

COE, J. M., ROGERS, D. B. Marine Debris: sources, impacts, and solutions. **Science**, Springer, New York, 1997.

CORTI, A., MUNIYASAMI, S., VITALI, M., IMAM, S.H., CHIELLINI, E. Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. **Polymer Degradation Stability**, v.95, p.1106–1114, 2010.

DARBY, R.T., KAPLAN, A.M. Fungal susceptibility of polyurethanes. **Appl. Microbiology**, v.16, p. 900–905, 1968.

DEEPIKA, S., JAYA, M. R. Biodegradation of low density polyethylene by microorganisms from garbage soil. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.3, p.15-21, 2015.

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

DIVYALAKSHMI, S., SUBHASHINI, A. Screening and Isolation of Polyethylene Degrading Bacteria from Various Soil Environments. IOSR J Environ. Sci. **Toxicology Food Technology,** v.10, p.01-07, 2016.

EL-SHAFEI, H.A., EL-NASSER, N.H.A., KANSOH, A.L., ALI, A.M., 1998. Biodegradation of disposable polyethylene by fungi and Streptomyces species. **PolymerDegradation and Stability**, v.62, p.361 – 365, 1998.

ESMAEILI, A., POURBABAEE, A.A., ALIKHANI, H.A., SHABANI, F., ESMAEILI, E., Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillusxylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil**. PLoS ONE**, v.9, p.717-720, 2013.

European Bioplastics, Position Paper: "Oxo-Biodegradable" plastic, 2009.

FINLEY, R.L., COLLIGNON, P., LARSSON, D.G.J., MCEWEN, S.A., LI X-Z., GAZE W.H. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. **Clinical Infection Disease**, 2013.

MARTINS-FRANCHETTI, S.M., EGERTON, T.A. White, J.R. Morphological Changes in Poly(Caprolactone)/Poly(Vinyl Chloride) Blends Caused by Biodegradation. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 18, p. 7983, 2010.

FRIED JR. Polymer Science and Technology. Prentice-Hall, PTR, Englewood CliHs, NJ; 1995.

FOLARIN, O.M., SADIKU, E.R. Thermal stabilizers for poly(vinyl chloride): A review. **Int. J. Phys. Sci**. v. 6, p. 4323, 2011.

FUHS, G.W., Der mikrobielleabbau von kohlenwasserstoffen**. Archives of Microbiology,** v.39, p.374-422, 1961.

FURLAN, J.P.R., STEHLING, E.G., Presence of β-Lactamases Encoding Genes in Soil Samples from Different Origins.Water**, Air and Soil Pollution,** v.228, p.125, 2017.

GAJENDIRAN, A., KRISHNAMOORTHY, S., ABRAHAM, J., Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. **Biotechnology,** v.6, p.52-58, 2016.

GAUTAM, R., BASSI, A.S., YANFUL, E.K. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.141, p.85-108, 2007.

GILAN, Y., HADAR, A., SIVAN. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of Rhodococcus rubber. **Applied Microbiology andBiotechnolology**, v.65, p.97–104, 2004.

GNANAVEL, G., THIRUMARIMURUGAN, M., VALLI, M.J. Biodegradation of oxo polyethylene: an approach using soil compost degraders. **International Journal of Advanced Engineering Technology**, v. 2, p.140-144, 2016.

GNANAVEL, G. V. P., VALLI, M. J., THIRUMARIMURUGAN, M. A Review of Biodegradation of Plastics Waste. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v.1, p.670-673, 2012.

GU, J.D., FORD, T.E., MITTON, D.B. E MITCHELL, R. Microbial degradation and deterioration of polymeric materials. Em: **Revie, W**. **(Ed.), The Uhlig Corrosion Handbook, 2nd Edition. Wiley, New York**. p.439-460, 2000.

Hansen, J. Risk for testicular cancer after occupational exposure to plastics. **International Journal of Cancer**, v. 82, p. 911–912, 1999.

HEISS-BLANQUET, S., BENOIT, Y., MARÉCHAUX, C., MONOT, F. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.1392-1403, 2005.

HIRAI, H., TAKADA, H., OGATA, Y., YAMASHITA, R., MIZUKAWA, K., SAHA, M., KWAN, C., MOORE, C., GRAY, H., LAURSEN, D., ZETTLER, E.R., FARRINGTON, J.W., REDDY, C.M., PEACOCK, E.E., WARD, M.W. Organic micropollutants in marine plastic debris from the open ocean and remote and urban beaches. **Marine Pollution Bulletin,** v.62, p.1683–1692, 2011.

HUGHES, S.R., KAY, P., BROWN, L.E. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from river systems**. Environmental Science Technology**, v.47, p.661–677, 2013.

IBIENE, A. A., STANLEY, H. O., IMMANUEL, O. M. Biodegradation of Polyethylene by Bacillus sp. Indigenous to the Niger Delta Mangrove Swamp. **NigeriamJournal of Biotechnology,** v.26, p.68-79, 2013.

ISHIGAKI, T., SUGANO, W., NAKANISHI, A., TATEDA, M., IKE, M., FUJITA, M. The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors. **Chemosphere,** v.54, p.225–233, 2004.

JIN, L., SUN, X., ZHANG, X., GUO, Y., SHI, H., Co-Metabolic Biodegradation of DBP by *Paenibacillus* sp. **S-3 and H-2. Current Microbiology,** v.6, p.708–716, 2014.

KALE, S. K., DESHMUKH, A. G., DUDHARE, M. S., PATIL, V. B. Microbial degradation of plastic: a review. **Journal of Biochemical Technology**, v.6, p.952-961, 2015.

KALLMEYER, J., POCKALNY, R., ADHIKARI, R.R. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), v.**109, p.16213–6, 2012.

KATHIRESAN, K. Polythene and plastic degrading microbes from mangrove soil.**Revista deBiologia Tropical**, v.51, p.629–633, 2003.

KELEN, T. “Polymer Degradation”, Van Nostrand Reinhold Company, **New York**, 1983.

KIRBAŞ, Z, KESKIN, N, GÜNER, A. Biodegradation of polyvinylchloride (PVC) by white rot fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v.63, p.335-342, 1999.

HENSCHLER, D. Toxicity of chlorinated organic compounds: effects of the introduction of chlorine in organic molecules. **Angewandte Chemie International Edition** (English) v. 33, p. 1920–1935, 1994.

KOHNO, T., SUGIMOTO, Y., SEI, K., MORI, K., Design of PCR Primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria.**Microbial Environmental**, v.17, p.114-121, 2002.

KLOSS, J.R., PEDROZO, T.H., DAL MAGROFOLLMANN, H., PERALTA-ZAMORA, P., DIONÍSIO, J.A., AKCELRUD, L., ZAWADZKI, S.F., RAMOS, L.P., Application of the principal component analysis method in the biodegradation polyurethanes evaluation. **Materials Science and Engineering**, v.29, p.470-473, 2009.

KYAW, B.M., CHAMPAKALAKSHMI, R., SAKHARKAR, M.K., LIM, C.S., SAKHARKAR, K.R. Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by Pseudomonas Species. **Indian Journal of Microbiology**, v.3, p.411–419, 2012.

LINOS, A., BEREKAA, M.M., REICHELT, R., KELLER, U., SCMITT, J., FLEMMING, H. **Applied Environmental Microbiology,** v.66, p.1639–45, 2000.

LUCAS, N., BIENAIME, C., BELLOY, C., QUENEUDEC, M., SILVESTRE, F., NAVA-SAUCEDO, J. Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. **Chemosphere,** v.73, p.429-442, 2008.

MADDEVER, W.J E CHAPMAN, G.M. **Plastics Engineering**, v.31, p.31, 1989.

MAHAJANA N & GUPTA P. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. **RSC Adv**; 5: 41839–41854; 2015.

MARTEN E. Correlation between the structure and the enzymatic hydrolysis of polyesters, Dissertation, Technical University Braunschweig, Germany, 2000.

MARTINEZ, J.L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science,** v.321 p.365–7, 2008.

MATO, Y., ISOBE, T., TAKADA, H., KANEHIRO, H.,OHTAKE, C., KAMINUMA, T. Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. **Environmental Science Technology**, v.35, p.318–324, 2001.

MASÓ, M., GARCÉS, E., PAGÈS, F., CAMP, J. Drifting plastic debris as a potential vector for harmful algal bloom (HAB) species. **Scientia Marina**, v.67, p.107-111, 2003.

MOHAN, S. K. AND SURESH, B. Studies on biodegradation of plastics by Aspergillus sp. isolated from dye effluent enriched soil, **Indo American Journal of Pharmeutical Sciences**, v.2, p. 214-229, 2015.

MOORE, C.J. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. **Environmental Research,** v.108, p.131–139, 2008.

MUKHERJEE, S., CHATTERJEE, S. A comparative study of commercially available plastic carry bag biodegradation by microorganisms isolated from hydrocarbon effluent enriched soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science, v.** 3, p.318-325, 2014.

MUTHUKUMAR, A. AND VEERAPPAPILLAI, S. Biodegradation of plastics: a brief review. **International Journal of Pharmeutical Sciences Review and Research**, v.31, p.204-209, 2014.

NAKKABI, A., SADIKI, M., IBNSSOUDA, S., FAHIM, M. Biological degradation of polyurethane by a newly isolated wood bacterium. **International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research**., v.2, p. 222-225, 2015.

NANDA, S., SAHU, S.S. Biodegradability of polyethylene by Brevibacillus, Pseudomonas, and Rhodococcus spp. **New York Science Journal**, v.3, p.7-12, 2010.

NATARAJAN, K.A., PRAKASAN, SABARI M.R., Biodegradation of sodium isopropyl xanthate by Paenibacilluspolymyxa and Pseudomonasputida.**Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review Journal,** v.4, p. 226-232, 2013.

NJERU, J. The urban political ecology of plastic bag waste problem in Nairobi, Kenya. **Geoforum**, v.37, p.1046-1058, 2006.

NOWAK, B., PAJAK, J., DROZD-BRATKOWICZ, M., RYMARZ, G. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.757-767, 2011.

OPPE, E. E. G., SALVAGNINI, W.M., TAQUEDA, M.E.S. em Anais do 8º Congresso Ibero Americano de Engenharia Mecânica, Cusco, código 1612, 2007.

OPREA, S. Dependence of fungal biodegradation of PEG/castor oil-based polyurethane elastomers on the hard-segment structure.**Polymers Degradability and Stability,** v. 95, p. 2396-2404, 2010.

PEIXOTO, J., SILVA, L.P., KRÜGER, R.H. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for unpretreated polyethylene biodegradation. **Journal of Hazard Material**, v.324, p. 634–644, 2017.

PINHEIRO, A.C.F.B., MONTEIRO, A.L.F. Ciências do ambiente – ecologia, poluição e impacto ambiental. **São Paulo: EditoraMakron**, 1992.

Plastics Europe, Plastics – The Facts, 2010.

Plastic Europe: An analysis of European plastics production demand and waste data.Belgium: EPRO, 2015.

POSPISIL J, NESPUREK S. Highlights in chemistry and physics of polymer stabilization. **Macromol.Symp**., v. 115, p.143-163, 1997.

PRAMILA, R., RAMESH, K., V. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water– a SEM analysis. **African Journal of Microbiology Research**, v.28, p. 5013-5018, 2011.

PRESTINACI, F., PEZZOTTI, P., PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifacetedphenomenon. **Pathogens Global Health**, v.7, p.309- 318, 2015.

PRIYANKA, N., ARCHANA, T. Biodegradation of polythene and plastic by the help of microorganisms: a way for brighter future. **Journal Environmental Analysis Toxicology**, v.1, p. 1-11, 2011.

PRUDEN, A., LARSSON, D.G.J, AMÉZQUITA, A., COLLIGNON, P., BRANDT, K.K., GRAHAM, D.W., LAZORCHAK, J.M. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. **Environmental Health Perspective**, v.121, p.878–885, 2013.

PRUDEN, A. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance. **Environmental Science Technology**; v.48, p.5–14, 2014.

RAZIYAFATHIMA, M., PRASEETHA, P. K., RIMAL ISAAC, R. S. Microbial Degradation of Plastic Waste: A Review. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and BiologialScience**, v.4, p.231-242, 2016.

RESTREPO-FLÓREZ, J-M., BASSI, A., THOMPSON, M. R. Microbial degradation and deterioration of polyethylene: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.88, p.83-89, 2014.

RIOS, L.M., MOORE, C., JONES, P.R. Persistent organic pollutants carried by synthetic polymers in the ocean environment. **Marine Pollution Bulletin**., v.54, p.1230–1237, 2007.

ROWE, L., HOWARD, G.T. Growth of Bacillus subtilis on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. **Int. Biodeter. Biodegrad**. V. 50, p. 33-40; 2002.

RUTKOWSKA, M., HEIMOWSKA, A., KRASOWSKA, K., JANIK, H. **Biodegradability of Polyethylene Starch Blends in Sea Water Pollution Journal Environment Studies**, v.11, p.267-274, 2002.

SAND, W. Microbial life in geotermal waters. **Geothermics**, v.32, p.655-667, 2003.

SANGALE, M.K., SHAHNAWAZ, M. A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. **Journal of bioremediation and biodegradation**, v.3, p.164, 2012.

SARKAR, S, ADHIKARI, B. Biodegradation of lactic acid and polyethylene glycol based polyester urethanes. **Indian Journal of Chemical Technology**, v.14, p.221-228, 2007.

SCHECTER, A., COLACINO, J., HAFFNER, D., PATEL, K., OPEL, M., PÄPKE, O., BIRNBAUM, L. Perfluorinated compounds, polychlorinated biphenyls, and organochlorine pesticide contamination in composite food samples from Dallas, Texas, USA. **Environmental Health Perspective**, v.118, p.796–802, 2010.

SECCHI, E.R., ZURZUR, S. Plastic debris ingested by a Blainville's beaked whale, Mesoplodondensirostris, Washed ashore in Brazil. **Aquatic Mammals**, v.25, p.21–24, 1999.

SEN, S.K. E RAUT, S. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): a review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v.3, p.462-473, 2015.

SHAH, A.A., HASAN, F., HAMEED, A., AHMED,S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advance**, v.26, p.246-265, 2008.

SHAH, Z.U. **Microbial degradation of polyester polyurethane**, 2012.

SHARMA, A., SHARMA, A. Degradation assessment of low density polythene (LDP) and polythene (PP) by an indigenousisolate of Pseudomonas stutzeri. **J.Scient. Ind. Res.,** v. 63, p.293-296, 2004.

SHARMA, J., GURUNG, T., UPADHYAY, A.,NANDY, K.,AGNIHOTRI, P., MITRA, A.K. Isolation and Characterization of Plastic Degrading Bacteria from Soil Collected from the Dumping Grounds of an Industrial Area. **International Journal Advance Innovation Research**, v.3, p. 2278-7844, 2015.

SINGH, G., SINGH, A.K., BHATT, K. Biodegradation of polythenes by bacteria isolated from soil. **International Journal Research Development Pharmaceutical Life Science**, v.2, p.2056-2062, 2016.

SINGH, S., SINGH, B.B., CHANDRA, R. Biodegradation of phenol in batch culture by pure and mixed strains of *Paenibacillus* sp.and *Bacilluscereus*. **Polish Journal of Microbiology**, v.4, p.319-325, 2009.

SIVAN, A. New perspectives in plastic biodegradation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.422–426, 2011.

SOCHA, A., S. ABERNETHY, B. BIRMINGHAM, R. BLOXAM, S. FLEMING, D. MCLAUGHLIN, AND D. SPRY. **Plastimet Inc. Fire**, Hamilton, Ontario, July 9–12, 1997.

SOLOMON, K., BERGMAN, H., HUGGETT, R., MACKAY, D., MCKAGUE, B. A Review and Assessment of the Ecological Risks Associated with the Use of Chlorine Dioxide for the Bleaching of Pulp. Washington DC: **Alliance for Environmental Technlogy**, 1993.

SOWMYA, H.V., RAMALINGAPPA, KRISHNAPPA, M., THIPPESWAMY, B. Degradation of polyethylene by Trichodermaharzianum—SEM, FTIR, and NMR analyses. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.186, p.6577–6586, 2014a.

SOWMYA, H.V., RAMALINGAPPA, KRISHNAPPA M, THIPPESWAMY. Biodegradation of Polyethylene by *Bacillus cereus*. **Advances In Polymer Science Technology: An International Journal**, v.4, p.28-32, 2014b.

SOWMYA, H.V., RAMALINGAPPA, B., NAYANASHREE, G., THIPPESWAMY, B., KRISHNAPPA, M. Polyethylene degradation by fungal consortium. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, p.823-830, 2015.

SPEAR, L.B., AINLEY, D.G., RIBIC, C.A. Incidence of plastic in seabirds from the tropical Pacific 1984-91: relation with distribution of species, sex, age, season, year and body weight. **Marine Environmental Research**, v. 40, p.123–141, 1995.

SURESH, B., MARUTHAMUTHU, S., PALANISAMY, N., RAGUNATHAN, R., NAVANEETHA, K. PANDIYARAJMURALIDHARAN, V.S. Investigation on biodegradability of polyethylene by Bacillus cereus strain Ma-Su isolated from compost soil. **International Research Journal of Microbiology (IRJM)**, v.2, p.292-302, 2011.

SURESH, S.S., MOHANTY, S., NAYAK, S.K. Composition analysis and characterization of waste polyvinyl chloride (PVC) recovered from data cables. **Waste Manag**. V. 60, p. 100-111, 2017.

SWAPNIL, K.K., DESHMUKH, A.G., DUDHARE, M.S., PATIL, V.B. Microbial degradation of plastic: a review.**Journal of Biochemical Technology**, v.1, p.952-961, 2015.

SWIFT, G. Non-medical biodegradable polymers: environmentally degradable polymers.In: A.J. Domb, J. Kost, D.M. Wiseman (Eds.), **Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic, Amsterdam**, p.473-511, 1997.

THOMPSON, R.C., SWAN, S.H., MOORE, C.J., VOM SAAL, F.S. Our plastic age. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences,** v.364, p. 1973–1976, 2009.

THORNTON, J. 2000. Pandora's Poison: Chlorine, Health, and a New Environmental Strategy. Cambridge: MIT Press.

TRIVEDI, P., HASAN, A., AKHTAR, S., SIDDIQUI, M. H., SAYEED, U., KHAN, M. K. A. Role of microbes in degradation of synthetic plastics and manufacture of bioplastics. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.8, p.211-216, 2016.

TRUDEL, D., SCHERINGER, M., VON GOETZ, N., HUNGERBÜHLER, K. Total consumer exposure to polybrominateddiphenyl ethers in North America and Europe. **Environmental Science Technology**, v.45, p.2391–2397, 2011.

URBANSKI J, CZERWINSKI W, JANICKA K, MAJEWSKA F, ZOWALL H. Handbook of Analysis of Synthetic Polymers and Plastics. **Ellis Horwood Limited, Chichester**; 1977.

USHA, R., SANGEETHA T., PALANISWAMY M. Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. **Library of Agricultural ResearchCent J International,** v.4, p.200-204, 2011.

VASILE, C. Degradation and decomposition. In: Handbook of polyolefins synthesis and properties (Eds. C. Vasile and R.B. Seymour). Marcel Dekker Inc, New York, p. 479-506, 1993.

VERMA, R., VINODA, K.S.,PAPIREDDY, M. A., GOWDA N. S. Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. **Procedia Environmental Sciences**, v.35, p.701-708, 2016.

VROMAN, I., TIGHZERT, L. **Biodegradable Polymers. Materials**, v.2, p.307-344, 2009.

WEBB, H. K., ARNOTT, J., CRAWFORD, R. J., IVANOVA, E. P. Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). **Polymers**, v.5, p.1-18, 2013.

WELLINGTON, E.M., BOXALL, A.B., CROSS, P., FEIL, E.J., GAZE, W.H., HAWKEY, P.M. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in gram-negative bacteria. **Lancet Infection Disease**, v.13, p.155–165, 2013.

WHEELER, W. M. Ants carried in a floating log from the brazilian mainland to San Sebastian Island. **Psyche**, v.23, p.180-183, 1916.

WRIGHT, G.D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic. **Current Opinion Microbiology**, v.13, p.589–94, 2010.

YADAV, I., RATHNAM, V.S., YOGALAKSHMI, Y., CHAKRABORTY, S., BANERJEE, I., ANIS, A., PAL, K. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol- carboxymethyl tamarind gum based composite films. **Carbohydr Polym**. v. 165, p. 159-168, 2017.

YOUNG RJ, LOVELL PA. Introduction to polymers', 2nd edn. Chapman & Hall, London; 1994.

YOON, M.G., JEON, H.J., KIM, M.N. Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. **Journal of Bioremedediation and Biodegradation**, v.3, p.145-152, 2012.

XIE X, WANG R, LI J, LUO L, WEN D, ZHONG Y, ZHAO C. Fluorocarbon chain end-capped poly(carbonate urethane)s as biomaterials: Blood compatibility and chemical stability assessments **J**. **Biomed. Mater. Res**, Part B. v.1, p. 223–241, 2009.

ZHOU, Q., GAO, Y., XIE, G. Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase micro extraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. **Talanta**, v.85, p.1598–1602, 2011.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES