

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
AMBIENTAIS**

Nicole Mateus de Alencastro Barros

**AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO DO POLIETILENO POR *CHELATOCOCCUS
COMPOSTI* E *ANOXYBACILLUS RUPIENSIS***

**Sorocaba/SP
2026**

Nicole Mateus de Alencastro Barros

AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO DO POLIETILENO POR *CHELATOCOCCUS COMPOSTI* E *ANOXYBACILLUS RUPIENSIS*

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Marcio Squina

**Sorocaba/SP
2026**

Ficha Catalográfica

B28a Barros, Nicole Mateus de Alencastro
Avaliação de biodegradação do polietileno por *Helatococcus composti* e *Anoxybacillus rupiensis* / Nicole Mateus de Alencastro Barros. -- 2026.
95 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Marcio Squina.
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais) -
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2026.

1. Polietileno de baixa densidade. 2. Biodegradação. I. Squina, Fabio Marcio, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.


Nicole Mateus de Alencastro Barros

**AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO DO POLIETILENO POR
CHELATOCOCCUS COMPOSTI E *ANOXYBACILLUS RUPIENSIS***


Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 30/01/2026


BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 **FABIO MARCIO SQUINA**
Data: 09/02/2026 10:10:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabio Marcio Squina
Presidente da banca
Universidade de Sorocaba- UNISO

Documento assinado digitalmente
 **RENATA DE LIMA**
Data: 07/02/2026 08:42:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.(a) Dra. Renata de Lima
Universidade de Sorocaba- UNISO

Documento assinado digitalmente
 **ADRIANE DE MEDEIROS FERREIRA**
Data: 05/02/2026 18:16:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.(a) Dra. Adriane de Medeiros Ferreira
Universidade de Sorocaba- UNISO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à sociedade que, direta ou indiretamente, tornou possível minha trajetória.

Fui estudante de ensino médio técnico em uma instituição pública e, mais tarde, bolsista do Prouni no ensino superior. Oportunidades viabilizadas por políticas públicas e pelo esforço coletivo em prol da educação.

Este mestrado é fruto desse investimento social e representa, para mim, um compromisso de retribuição.

Que esta pesquisa, construída com responsabilidade e gratidão, contribua para o fortalecimento da ciência e da produção de conhecimento no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à FAPESP pelo apoio institucional durante o mestrado e ao CNPq pela concessão da bolsa, que foi essencial para a realização desta pesquisa. Ao meu orientador, Professor Fábio Marcio Squina, agradeço a orientação atenta, pelas valiosas contribuições e por compartilhar sua experiência ao longo de todo este processo.

À minha mãe, Michelle, minha maior inspiração, agradeço pelo amor incondicional, pela força que me ensinou a cultivar e por nunca deixar que eu desistisse. À minha irmã, Catherine, obrigada por sua presença constante, pelo apoio imprescindível. Estendo meus agradecimentos à minha tia Juliane e ao meu primo Gustavo, por sempre me motivarem, e à minha tia Mariane e sua esposa Thais, pelo carinho e incentivo. Amo vocês profundamente.

Não poderia deixar de mencionar meus companheiros de quatro patas: Bella que esteve ao meu lado por tantos anos e cuja presença permanece viva em minha memória com muito amor e saudade, e os adoráveis e terríveis Bartholomeu e Brisa, cuja presença alegre tornou os dias mais leves.

Aos colegas que marcaram minha trajetória no laboratório LACIMO: Larissa, Tamires, Felipe e Ana Bárbara, agradeço pelos ensinamentos, pela parceria e pelo “stop” que muitas vezes encerrou dias longos com muitas risadas. À Isa, Mateus, José, Julia e Ellen, obrigada pelas conversas, pelo apoio diário e pelos incontáveis cookies e bingos que adoçaram as jornadas de trabalho. As minhas queridas amigas Maria Gabriela e Emily, pessoas incrivelmente dedicadas e inteligentes, que com generosidade e paciência me ensinaram tanto ao longo desta jornada. Nossas jornadas no laboratório foram fonte de aprendizado, inspiração e amizade.

À minha querida amiga Letícia, minha eterna gratidão pela amizade sólida, pelos momentos de acolhimento, pelas risadas e pela força compartilhada nos dias difíceis. Amo você com todo o coração.

Por fim, e com um carinho especial, agradeço ao meu companheiro João Paulo. Sua paciência, carinho e apoio incondicional ao longo desses últimos anos foram pilares essenciais para que eu pudesse seguir firme até aqui. Sua presença tornou tudo mais leve.

A todos, meu mais sincero obrigada.

*Em memória de minha vó,
Graça da Conceição de Sousa Mateus
05.10.1953 – 05.09.2025
O que é amor não se perde.*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

PEBD	Polietileno de Baixa Densidade
CR22	<i>Chelatococcus composti</i>
CR1	<i>Anoxybacillus rupiensis</i>
PE	Polietileno
O ₃	Ozônio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
FTIR	Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
PP	Polipropileno
(-COOH)	Carboxilas
(-OH)	Hidroxilas
PET	Polietileno de tereftalato
PHA	Polihidroxicanoatos
PSP	Plásticos sintéticos derivados de petróleo
PU	Poliuretano
PA	Poliamida
PS	Poliestireno
PVC	Policloreto de vinila
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
BHPE	<i>Branched High-Density Polyethylene</i>
LDPE	<i>Linear Low-Density Polyethylene</i>
PEAD	Polietileno de Alta Densidade
UV	Ultravioleta
(CO ₂)	Dióxido de carbono
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
AFM	Microscopia de força atômica
BacDive	<i>The Bacterial Diversity Metadatabase</i>
PHB	Polihidroxiacetato
EG	Etilenoglicol
TPA	Ácido tereftálico
PAZY	<i>Plastic Active Enzymes</i>
MHET	Ácido Mono-(2-hidroxi)etil Tereftálico

PC	Policarbonato
LCC	<i>Leaf-Compost Cutinase</i>
LCP	<i>Latex-Clearing Protein</i>
(O ₂)	Oxigênio molecular
(POO•)	Radical peroxila
(POOH)	Hidroperóxido
(OH ⁻)	Íons hidroxila
BHS	<i>Bushnell Haas Broth</i>
LB	Luria-Bertani
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ANI	<i>Avarege Nucleotide identify</i>
16S RNA	<i>16S RNA ribossomal - Bacteria e Archaea</i>
TYGS	<i>Types Strain Genome Server</i>
dDDH	Hibridização DNA-DNA digital
HSPs	Comparação de segmentos de alta pontuação
OD	Densidade óptica
SDS	Dodecil sulfato de sódio
PCL	Policaprolactona
BHET	Bis(2-hidroxietil) tereftalato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
BUSCO	<i>Benchmarking Universal Single-copy Orrthologs</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
ATR	Reflexão Total Atenuada
CID	Dissociação induzida por colisão
Bp	Pares de base
CDS	Sequências codificantes
GC	Citosina-Guanina
Kb	Mil pares de base
POA	Processo de oxidação avançado
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA de transferência

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura do polímero a partir da unidade do PE.....	21
Figura 2 - Dificuldade na biodegradação de plásticos.....	24
Figura 3 - Representação esquemática da mineralização de plásticos em ambientes aeróbicos.	25
Figura 4 - Esquema geral degradação por oxidação em polímeros com cadeia principal em carbono.	33
Figura 5- Fluxograma ilustrativo da curva de crescimento	39
Figura 6- Fluxograma ilustrativo do <i>Screening</i>	40
Figura 7- Fluxograma ilustrativo do cultivo de 90 dias.....	42
Figura 8- Fluxograma ilustrativo da análise da EcoPlate	46
Figura 9- Fluxograma ilustrativo do pré-tratamento	49
Figura 10- Gráfico de Curva de crescimento de <i>A. rupiensis</i>	51
Figura 11- Avaliação degradação <i>Screening A. rupiensis</i>	52
Figura 12- MEV do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1 .	53
Figura 13- Imagens obtidas por MEV da superfície de PEBD.....	54
Figura 14- Percentual de perda de massa do PEBD	56
Figura 15- FTIR do PEBD e sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1	57
Figura 16- Índices.....	58
Figura 17- FTIR do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1 .	60
Figura 18- Índices.....	60
Figura 19- Análise filogenética	64
Figura 20 - Gráfico de Curva de Crescimento.....	67
Figura 21- Avaliação degradação <i>Screening CR22</i>	68
Figura 22- MEV da superfície do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22	69
Figura 23- MEV da superfície do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada, em cultivo com CR22 e controle.	70
Figura 24- Percentual de perda de massa do PEBD	71
Figura 25- FTIR do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22	73
Figura 26- Índice	74
Figura 27- FTIR do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22	75
Figura 28- Índices.....	76
Figura 29- Análise filogenética	79
Figura 30- FTIR do PEBD sem pré-tratamento em cultivo com a CR1 e CR22	94
Figura 31- FTIR do PEBD sem pré-tratamento em cultivo com a CR1 e CR22	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação da intensidade da utilização de substratos pela CR1 na EcoPlate.....	62
Tabela 2- Enzimas selecionadas CR1	65
Tabela 3- Classificação da intensidade da utilização de substratos pela CR22 na EcoPlate....	78
Tabela 4- Enzimas selecionadas da linhagem CR22 com potencial à degradação de polímeros plásticos.	80
Tabela 5- <i>Heatmap</i> da atividade metabólica da bactéria <i>A. ruyensis</i> obtido com a EcoPlate™ ao longo de 144 horas	92
Tabela 6- <i>Heatmap</i> da atividade metabólica da bactéria <i>C. composti</i> em EcoPlate™ ao longo de 144 horas.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Enzimas microbianas com atividade funcional em plásticos.....	30
Quadro 2- Síntese dos principais conceitos sobre biodegradação de polímeros, pré-tratamento e interação enzima-polímero.....	33
Quadro 3- Relação enzimática do gênero <i>Anoxybacillus</i> com potencial á degradação de polímeros.....	65

RESUMO

O aumento expressivo na produção e descarte de plásticos de origem petroquímica representa um dos principais desafios ambientais da atualidade. Entre esses materiais, destaca-se o polietileno de baixa densidade (PEBD), amplamente utilizado e notoriamente resistente à degradação natural. Diante da limitação dos métodos convencionais de reaproveitamento, a biodegradação microbiana surge como alternativa promissora. Neste estudo, foram desenvolvidos consórcios microbianos termofílicos a partir de amostras de compostagem, dos quais foram isoladas duas linhagens degradadoras de PEBD: *Chelatococcus composti* (CR22) e *Anoxybacillus rupiensis* (CR1), com crescimento a 50 °C em meio mínimo contendo PEBD como principal fonte de carbono. As linhagens foram avaliadas quanto à capacidade de degradar amostras de polietileno (PE), com e sem pré-tratamento de oxidação avançada por ozônio (O₃) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O tratamento de oxidação avançada promoveu alterações na superfície do polímero, evidenciadas por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de varredura (MEV), como aumento de rugosidade, fissuras e formação de grupos oxidativos. Após 90 dias de incubação, observou-se perda percentual de massa de PE de 12,7% ± 3,0 nos filmes oxidados por ação de CR22 e de 3,4% ± 0,6 por ação de CR1, enquanto os controles não apresentaram perdas significativas. A análise metabólica com *Biolog EcoPlate* demonstrou a versatilidade metabólica dos microrganismos. Análises genômicas indicaram a presença de enzimas associadas a atividades de desidrogenases, oxidases FAD-dependentes, peroxidases e polifenol oxidases, que podem estar relacionadas à degradação de PEBD. Os resultados indicam o potencial biotecnológico das linhagens, em especial a CR22, para a degradação do PEBD, com implicações relevantes para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis.

Palavras-chave: Polietileno de baixa densidade (PEBD); microrganismos termofílicos; biodegradação microbiana; oxidação avançada; *A. rupiensis*; *C. composti*

ABSTRACT

The significant increase in the production and disposal of petrochemical-based plastics represents one of the major environmental challenges today. Among these materials, low-density polyethylene (LDPE) stands out as a widely used polymer that is notably resistant to natural degradation. Given the limitations of conventional recycling methods, microbial biodegradation emerges as a promising alternative. In this study, thermophilic microbial consortia were developed from composting samples, from which two LDPE-degrading strains were isolated: *Chelatococcus composti* (CR22) and *Anoxybacillus rupiensis* (CR1), both able to grow at 50 °C in minimal medium containing LDPE as the main carbon source. The strains were evaluated for their ability to degrade polyethylene (PE) samples, with and without advanced oxidation pretreatment using ozone (O₃) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The advanced oxidation treatment promoted changes on the polymer surface, as evidenced by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM), including increased roughness, cracks, and the formation of oxidative groups. After 90 days of incubation, a percentage mass loss of 12.7% ± 3.0 was observed in oxidized PE films exposed to CR22 and 3.4% ± 0.6 in those exposed to CR1, while the control samples showed no significant loss. Metabolic profiling using *Biolog EcoPlate* demonstrated the metabolic versatility of the microorganisms. Genomic analyses identified enzymes associated with dehydrogenase activity, FAD-dependent oxidases, peroxidases, and polyphenol oxidases, which may be involved in LDPE degradation. The results highlight the biotechnological potential of these strains, particularly CR22, for LDPE degradation, with important implications for the development of sustainable strategies

Keywords: Low-density polyethylene (LDPE); thermophilic microorganisms; microbial biodegradation; advanced oxidation; *A. rupiensis*; *C. composti*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Plásticos sintéticos derivados de petróleo (PSP)	18
2.2	Poluição plástica	19
2.3	Plástico PE	20
2.4	Degradação ambiental do PE	22
2.5	Dificuldade de biodegradação de plásticos	23
2.6	Degradação de PE por microrganismos	26
2.6.1	<i>Anoxybacillus sp.</i>	28
2.6.2	<i>Chelatococcus sp.</i>	29
2.7	Mecanismos enzimáticos na degradação	30
2.8	Pré-Tratamento físico-químico de plásticos	32
2.9	Resumo dos conceitos de biodegradação	34
3	OBJETIVO	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Coleta de Solo e Enriquecimento Microbiano	36
4.1.1	Isolamento dos Microrganismos.	36
4.1.2	Identificação Taxonômica do Microrganismo	37
4.2	Curva de crescimento de <i>C. composti</i> e <i>A. ruyensis</i>. em PEBD	38
4.3	Avaliação degradação “Screening”	39
4.4	Cultivo de 90 dias	41
4.5	Análise de FTIR	42
4.5.1	Índice FTIR.....	42
4.6	Análise de MEV	44
4.6.1	Análise de MEV Biofilme	44
4.7	Análise da perda de massa percentual do PEBD	44
4.8	Análise <i>Biolog Ecoplate</i>	45
4.8.1	Preparação das culturas bacterianas.....	46
4.8.2	Inoculação e incubação das placas.....	46
4.8.3	Correção e normalização dos dados.....	47
4.8.4	Análise qualitativa e construção de <i>heatmap</i>	47
4.9	Sequenciamento Global e Bioinformática	48
4.9.1	Identificação de Enzimas Degradoras de Plástico nos genomas.....	48
4.10	Pré-tratamento oxidativo avançado em PEBD	49

4.10.1	Limpeza Pré-Oxidação e Pós Cultivo	49
4.10.2	Oxidação Avançada por Ozônio e Peróxido de Hidrogênio	49
5	RESULTADOS E DISCUÇÕES DA LINHAGEM <i>A. RUPIENSIS</i>	51
5.1	Curva de crescimento CR1	51
5.2	Avaliação degradação “<i>Screening</i>” CR1	52
5.3	MEV	53
5.3.1	MEV do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1	53
5.3.2	MEV do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1....	54
5.4	Perda percentual de massa de PEBD.....	55
5.5	FTIR.....	57
5.5.1	FTIR do PEBD sem pré-tratamento e utilizado em cultivos com CR1	57
5.3.2	FTIR do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1	59
5.6	Biolog Ecoplate	61
5.7	Análise filogenética CR1	64
5.8	Caracterização genômica da cepa CR1	64
6	RESULTADOS E DISCUÇÕES DA LINHAGEM <i>C. COMPOSTI</i>	67
6.1	Curva de crescimento CR22	67
6.2	Avaliação degradação “<i>Screening</i>” <i>C. CR22</i>	68
6.3	MEV	69
6.3.1	MEV do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22 ..	69
6.3.2	MEV do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22..	70
6.4	Análise da perda de massa percentual do PEBD.....	71
6.5	FTIR.....	72
6.5.1	FTIR do PEBD sem pré-tratamento e cultivado com CR22.....	72
6.5.2	FTIR do PEBD com pré-tratamento e cultivado com CR22	75
6.6	Biolog Ecoplate	77
6.7	Análise filogenética CR22	79
6.8	Caracterização genômica da CR22	80
7	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	92
	APENDICE	96

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos derivados do petróleo são amplamente utilizados em diversas atividades cotidianas devido às suas propriedades excepcionais, como durabilidade, resistência e versatilidade em diversas aplicações (Geyer; Jambeck; Law, 2017). No entanto, o uso excessivo desses materiais tem gerado uma série de impactos negativos ao meio ambiente e à sociedade, além de representar um desafio econômico para os países (Zhou et al., 2020). O ciclo de vida dos plásticos afeta tanto o bem-estar humano quanto os ecossistemas, principalmente devido às emissões de gases de efeito estufa decorrentes do gerenciamento de resíduos e da produção de plásticos (Cole et al., 2011; Sarker et al., 2020).

No Brasil, a crise do plástico é intensa: apenas 21% dos resíduos pós-consumo e 24,4% das embalagens são reciclados, enquanto 79% permanecem fora da economia circular, e apesar de gerar mais de 1 milhão de toneladas de resina reciclada e milhares de empregos, a coleta seletiva limitada e a falta de políticas públicas resultam em descarte irregular (ABIPLAST, 2025). O *Blue Keepers* (Pacto Global-Rede Brasil) indica que 3,44 milhões de toneladas de plástico têm risco de escapar para o ambiente, e até 2,3 milhões podem alcançar rios e mares. A Oceana Brasil estima que 1,3 milhão de toneladas chegam aos oceanos anualmente, correspondendo a 8% da poluição plástica global, colocando o país como 8º maior poluidor do mundo e líder na América Latina. O descarte inadequado de plásticos permite que atinjam a hidrosfera, fragmentem em pequenos pedaços (microplásticos e nanoplásticos), que podem persistir no ambiente por centenas ou milhares de anos, contaminando lençóis freáticos e animais (Haider et al., 2019).

O PE, um dos polímeros sintéticos mais produzidos e descartados globalmente, destaca-se por sua elevada hidrofobicidade, cristalinidade e elevado peso molecular, fatores que dificultam a atuação de enzimas microbianas. Essas propriedades estruturais tornam o PE resistente à biodegradação, limitando sua fragmentação em compostos menores passíveis de metabolização por microrganismos, além disso, a escassez de grupos funcionais reativos em sua cadeia impede interações eficientes com enzimas (Coutinho; Mello; Santa Maria, 2003; Geyer; Jambeck; Law, 2017).

Condições ambientais, como temperatura, umidade, presença de oxigênio e composição do solo, também exercem influência direta sobre a taxa de degradação, podendo acelerar ou restringir o processo (Otake et al., 1995). Outro fator limitante é a baixa biodisponibilidade dos resíduos plásticos no ambiente, somada à escassez de microrganismos com capacidade enzimática adequada para sua degradação efetiva. Mesmo em casos em que se observa alguma

alteração física ou química no polímero, a mineralização completa é rara e, geralmente, os processos de biodegradação são parciais ou muito lentos (Danso; Chow; Streita, 2019).

O pré-tratamento químico de plásticos desempenha um papel importante ao modificar a superfície do PE tornando-a mais suscetível à adesão microbiana e facilitando etapas subsequentes de degradação biológica (Hu; Lim; Hu, 2023). Essa abordagem é amplamente empregada, uma vez que os reagentes oxidantes promovem modificações na superfície do plástico, principalmente em cadeias hidrofóbicas como o PE e o polipropileno (PP), introduzindo grupos funcionais como carboxilas (-COOH) e hidroxilas (-OH), que aumentam sua reatividade e interação entre enzimas e plásticos derivados do petróleo (Gilan; Hadar; Sivan, 2004).

Pesquisas recentes do grupo LaCiMo, da Universidade de Sorocaba, resultaram no desenvolvimento de dois consórcios bacterianos com potencial para degradação de polímeros plásticos. O consórcio investigado por (ROMAN et al., 2024), possibilitou o isolamento de uma bactéria com potencial degradador, destacando-se no contexto da biodegradação de plástico tereftalato de polietileno (PET) e produção de polihidroxialcanoatos (PHA). Em sequência, foi desenvolvido um segundo consórcio, adaptado a altas temperaturas (50 °C), que resultou no isolamento de duas linhagens promissoras: *C. composti* e *A. rupiensis*.

Esses achados reforçam a viabilidade de alternativas biotecnológicas capazes de reduzir a dependência de soluções químicas convencionais e promover estratégias mais sustentáveis para a gestão de resíduos plásticos. Nesse contexto, estratégias que combinam o uso de microrganismos com pré-tratamentos físico-químicos têm sido estudadas para aumentar a biodisponibilidade do polímero e favorecer sua subsequente degradação microbiana.

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade degradativa das bactérias *C. composti* e *A. rupiensis* frente ao PEBD, tanto na forma bruta (embalagem de alimento comercial) quanto após o pré-tratamento oxidativo com ozônio e peróxido de hidrogênio, pressupondo-se que o pré-tratamento aumente a suscetibilidade do polímero à degradação microbiana, potencializando a ação das bactérias sobre o PE, com a introdução de grupos carbonila e carboxila, aumentando sua hidrofiliabilidade e, conseqüentemente, sua suscetibilidade à ação enzimática.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plásticos sintéticos derivados de petróleo (PSP)

Os PSP apresentam propriedades excepcionais, como multifuncionalidade e longevidade (Geyer; Jambeck; Law, 2017). Eles são onipresentes e indispensáveis à nossa sociedade; estão presentes em embalagens, nos automóveis, na construção civil, em eletrodomésticos e em tecidos, bem como são utilizados na manufatura de produtos agrícolas e de materiais hospitalares. No entanto, o uso intensivo de plásticos pela humanidade vem causando inúmeros impactos negativos ao meio ambiente, impondo grandes desafios socioeconômicos às nações (Beaumont et al., 2019).

Entre os principais polímeros sintéticos produzidos do petróleo incluem o poliuretano (PU), encontrado em colchões e cabos; o PE, utilizado em embalagens e revestimentos; a poliamida (PA), popularmente conhecida como náilon; o PET, visto em embalagens; o poliestireno (PS), o qual um de seus tipos é o isopor; o cloreto de polivinil (PVC), utilizado na fabricação de canos e calçados; e o polipropileno, encontrado em tecidos e consoles de carros (Danso; Chow; Streita, 2019).

Os PSPs causam enormes problemas ambientais e impactam o bem-estar da humanidade, por serem inertes e geralmente apresentam ciclo de vida curto; metade desses produtos torna-se resíduo após quatro anos ou menos de uso; acumulam de forma alarmante em aterros e no meio ambiente (Danso; Chow; Streita, 2019). Estima-se que, caso os padrões atuais de produção e gestão de resíduos plásticos sejam mantidos, aproximadamente 12 bilhões de toneladas métricas desse material serão depositadas em aterros sanitários e no meio ambiente até 2050. Além disso, projeta-se que cerca de 10 milhões de toneladas métricas de plásticos ingressem nos oceanos anualmente, intensificando a problemática ambiental global associada a esse tipo de poluente (Singh et al., 2021).

O descarte inadequado permite que esses materiais atinjam corpos d'água, tendo como destino, lagos, mares e oceanos. Nesse caminho e ao longo do tempo, esse material plástico pode se fragmentar e persistir no ambiente por centenas ou milhares de anos, contaminando lençóis freáticos, fauna e flora. Além desses problemas, os PSPs provocam a emissão de gases de efeito estufa durante o processo de produção e, após o descarte, durante a gestão, quando submetidos a operações de incineração (Singh et al., 2021).

Processos de reciclagem mecânica e química são importantes, mas insuficientes para conter a poluição causada pelos materiais plásticos, sobretudo porque a porcentagem

efetivamente reciclada após o descarte permanece baixa. Além disso, os processos atualmente utilizados exigem etapas de triagem e lavagem antes da produção dos pellets reciclados, o que aumenta custos e limita a reciclagem a materiais com menor grau de contaminação, gerando também resíduos adicionais (Ellis et al., 2021). Outro desafio relevante é que as propriedades dos polímeros reciclados geralmente são inferiores às dos materiais virgens, o que restringe seu uso a produtos de menor valor agregado e que, ao final de sua vida útil, costumam ser novamente descartados em aterros ou no ambiente (Ellis et al., 2021). Embora plásticos como o PE, especialmente na forma não pigmentada, apresentem taxas altas de reciclagem, os plásticos coloridos ou com aditivos apresentam menor valorização e menor demanda na cadeia de reciclagem, o que reduz sua taxa de reaproveitamento. Por fim, os processos de reciclagem disponíveis, sejam mecânicos, energéticos ou químicos, também acarretam impactos ambientais e emissões de gases de efeito estufa (Beaumont et al., 2019).

A reutilização biotecnológica dos polímeros possibilita que os resíduos plásticos sejam considerados como matéria-prima. Desta forma, os plásticos disponíveis após a utilização humana poderiam se tornar material de partida, abundante e de baixo custo para a produção de novos materiais ou moléculas de valor econômico. Por exemplo, monômeros plásticos isolados podem ser transformados em derivados funcionalizados com estruturas químicas complexas e de valor agregado (Kárpáti et al., 2019). Porém, encontrar soluções biocatalíticas para a conversão de plásticos pós-consumo em materiais de valor econômico é um grande desafio tecnológico que requer estratégias avançadas.

2.2 Poluição plástica

A poluição plástica tornou-se um dos maiores desafios ambientais do século XXI, afetando ecossistemas terrestres, aquáticos e a saúde humana. A produção global de plástico ultrapassa 400 milhões de toneladas por ano, sendo que a maior parte é composta por itens descartáveis e de curta vida útil. Relatórios do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) destacam que apenas cerca de 9% de todo o plástico consumido no mundo é reciclado. O restante é enviado para aterros, incinerado ou descartado inadequadamente no meio ambiente. Esse descarte irregular é responsável por um fluxo anual estimado entre 9 e 14 milhões de toneladas de plástico que chegam aos oceanos. A crise global se agrava pela falta de infraestrutura de gestão de resíduos, pelo consumo acelerado e pela lenta implementação de políticas de redução, reutilização e reciclagem.

Esse cenário global se reflete de maneira evidente no Brasil, um dos maiores consumidores de plástico do planeta (<https://brasil.oceana.org/>). Os dados mais recentes da ABIPLAST (2025, ano-base 2024) mostram que o país recicla apenas 21% dos plásticos pós-consumo, e 24,4% das embalagens plásticas. Embora a produção de resina reciclada pós-consumo tenha alcançado 1,012 milhão de toneladas em 2024, gerando mais de 20 mil empregos diretos e movimentando cerca de R\$ 4 bilhões, isso ainda significa que 79% dos plásticos descartados no Brasil não retornam ao ciclo produtivo.

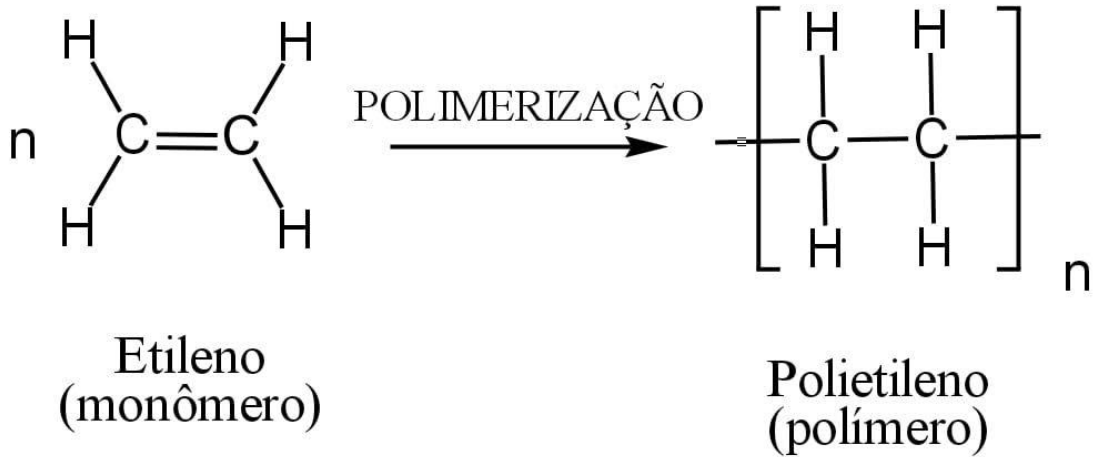
Os impactos desse sistema ineficiente aparecem com clareza nos estudos do *Blue Keepers* / Pacto Global – Rede Brasil, que identificam cerca de 3,44 milhões de toneladas de plástico anuais com alto risco de escape para o ambiente. Desses resíduos, até 2,3 milhões de toneladas têm potencial de alcançar rios e mares. Relatórios da Oceana Brasil reforçam essa preocupação ao apontar que o Brasil despeja aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de plástico no oceano por ano, contribuindo com cerca de 8% da poluição plástica marinha global. Isso coloca o Brasil no ranking dos 10 maiores poluidores globais por plástico, sendo o 8º no mundo, e o líder na América Latina. Esse dado evidencia que o problema brasileiro não é apenas a baixa reciclagem, mas principalmente o desperdício, o descarte irregular e a ausência de infraestrutura de contenção e de tratamento de resíduos.

Assim, tanto no cenário global quanto no brasileiro, torna-se claro que a crise dos resíduos plásticos envolve fatores estruturais, sociais, econômicos e culturais. Apesar dos avanços observados na indústria da reciclagem no Brasil e da crescente busca por economia circular, os esforços ainda são insuficientes para conter o volume de plástico que escapa para o ambiente todos os anos.

2.3 Plástico PE

O PE é um material difícil de degradar no ambiente, o que contribui para sua persistência e impacto ambiental (Ghatge et al., 2020; Wang; Bonfield, 2001). Possui estrutura básica mais simples em comparação a outros polímeros, pois é formado pela poliadicação do etileno (C_2H_4), na qual ocorre a quebra da dupla ligação e a formação da unidade repetitiva $-CH_2-CH_2-$ do polietileno (Chen; Lin, 2021; Ghatge et al., 2020; Wang; Bonfield, 2001). Essas unidades de PE se conectam por ligações covalentes entre os átomos de carbono, formando longas cadeias (Teh; Rudin; Keung, 1994). A estrutura básica do PE pode ser representada da seguinte forma, como ilustrada na Figura 1.

Figura 1- Estrutura do polímero a partir da unidade do PE



Legenda: Representação esquemática da polimerização por adição do etileno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), na qual a ruptura da ligação π da dupla ligação possibilita a formação do PE, um polímero composto por unidades repetitivas $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ organizadas em uma cadeia saturada. O material pode apresentar diferentes graus de ramificação.

Fonte: Autoria própria

Sua resistência à degradação está relacionada a diversas características estruturais, como a insolubilidade em água, a natureza hidrofóbica conferida pela presença exclusiva de átomos de carbono e hidrogênio. Estes fatores, resultantes da presença de longas cadeias moleculares, contribuem significativamente para a sua baixa biodegradabilidade e elevada estabilidade físico-química (Coutinho; Mello; Santa Maria, 2003; Lucas et al., 2008).

As principais características atrativas do PE incluem seu baixo custo, excelente isolamento elétrico, resistência química, além de ser tenaz e flexível e sua ampla gama de polimerização. No dia a dia, isso se traduz em uma série de aplicações úteis, como cabos elétricos, que aproveitam sua capacidade de isolamento; embalagens plásticas (como sacolas e filmes), que se beneficiam de sua flexibilidade; e garrafas e recipientes, que demonstram sua resistência e durabilidade. Além disso, filmes finos de PE, usados em embalagens de alimentos, também podem ser transparentes, permitindo visibilidade e praticidade aos consumidores (Chen; Lin, 2021; Wang; Bonfield, 2001).

O PEBD ou LDPE (*Linear Low-Density Polyethylene*) e o polietileno de alta densidade (PEAD) têm sido amplamente estudados em pesquisas sobre biodegradação (Ghatge et al., 2020; Gilan; Hadar; Sivan, 2004; Kumar Sen; Raut, 2015; Restrepo-Flórez; Bassi; Thompson,

2014). Cada uma dessas variações de PE apresenta propriedades específicas determinadas pela organização e pelo comprimento de suas cadeias, o que afeta o uso do material em diferentes aplicações.

O PEBD, apresenta uma estrutura ramificada, o que impede que as moléculas se organizem de forma compacta, resultando em um material mais flexível e menos denso. Esse tipo de PE é obtido por polimerização de etileno sob alta pressão, e suas cadeias ramificadas conferem-lhe boa flexibilidade e resistência à deformação. O PEBD suporta temperaturas de até 95 °C por curtos períodos e de até 80 °C por períodos mais longos. Sua cristalinidade varia entre 50% e 60%, o que lhe confere várias propriedades desejáveis, como opacidade, resistência à tração e flexibilidade (Chen; Lin, 2021; Teh; Rudin; Keung, 1994).

O PEAD, também conhecido pela sigla BHPE (*Branched High-Density Polyethylene*), possui uma estrutura formada por cadeias poliméricas, principalmente lineares. Essa configuração permite que as moléculas se compactem de forma organizada, conferindo ao material densidade elevada e maior resistência mecânica e térmica. Essas propriedades tornam o PEAD especialmente indicado para usos que demandam durabilidade superior, resistência a impactos e capacidade de suportar temperaturas mais altas em comparação ao PEBD (Chen; Lin, 2021; Teh; Rudin; Keung, 1994).

2.4 Degradação ambiental do PE

O plástico PE é persistente no ambiente e levanta sérias preocupações quanto aos seus impactos ambientais, especialmente devido à sua decomposição lenta e ao acúmulo de resíduos plásticos. A degradação ambiental do PE é um processo complexo, que envolve múltiplos mecanismos interligados, como a degradação fotoquímica, termo-oxidativa e a interação com organismos biológicos (yao; seong; jang, 2022).

A degradação fotoquímica é o mecanismo mais comum de deterioração do PE ocorrendo principalmente quando o material é exposto à luz solar, em especial à radiação ultravioleta (UV). A incidência de luz UV promove a ruptura de ligações químicas nas cadeias poliméricas, levando à geração de radicais livres. Esses radicais iniciam uma série de reações de oxidação que resultam na fragmentação da estrutura do polímero. Como consequência, formam-se diversos produtos de degradação, incluindo alcanos, alcenos e grupos funcionais oxigenados, como cetonas e aldeídos (Cai et al., 2018; Iñiguez; Conesa; Fullana, 2018).

A degradação termo-oxidativa ocorre quando o polímero derivado do petróleo é exposto a temperaturas elevadas, na presença de oxigênio, o que promove a quebra de cadeias

poliméricas e a formação de radicais livres. Embora seja um processo abiótico, pode ocorrer naturalmente no ambiente, contribuindo para a fragmentação do plástico, e facilitando as etapas posteriores de biodegradação. No entanto, em processos controlados, como a pirólise, os desafios técnicos e os custos elevados limitam sua aplicação em larga escala, especialmente devido à baixa condutividade térmica do PE (Ding et al., 2019; Haider et al., 2019; Palza; Aravena; Colet, 2017).

Além dos processos físicos e químicos, o PE e outros plásticos também podem ser degradados por ação biológica. Certos microrganismos, como bactérias e fungos, têm a capacidade de metabolizar os produtos da degradação do PE, o que acelera a decomposição do material (Arkatkar et al., 2010; Bardaji et al., 2020). A interação entre a degradação fotoquímica e a atividade biológica pode ser particularmente significativa, pois os produtos gerados pela radiação UV tornam o polímero mais acessível a esses microrganismos (Yao; Seong; Jang, 2022).

Os estudos de Berlin Heidelberg, Hakkarainen e Albertsson, 2004, identificaram mais de 200 produtos distintos formados durante a degradação ambiental do PE, incluindo uma ampla gama de compostos químicos, como alcanos, alcenos, cetonas, aldeídos, álcoois e ácidos carboxílicos. Esses produtos podem ter diferentes implicações ambientais, dependendo de sua toxicidade, persistência e mobilidade no ambiente.

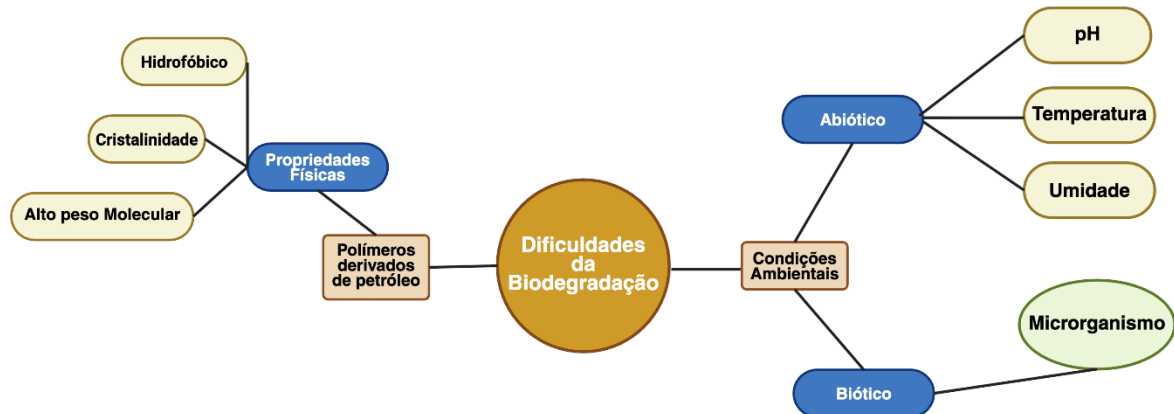
Em um estudo conhecido “*Biodegradation of Low-Density Polyethylene, Polystyrene, Polyvinyl Chloride, and Urea Formaldehyde Resin Buried Under Soil for Over 32 Years*” realizado sobre a biodegradação de diferentes polímeros enterrados no solo por mais de 32 anos, foi observada uma descoloração do PEBD, sugerindo degradação microbiológica. (Otake et al., 1995).

2.5 Dificuldade de biodegradação de plásticos

A biodegradação de plásticos representa um desafio significativo, polímeros sintéticos, como o PE e o PP que são hidrofóbicos e sem biodisponibilidade, o que dificulta sua fragmentação e assimilação por microrganismos (Coutinho; Mello; Santa Maria, 2003; Geyer; Jambeck; Law, 2017). Além disso, fatores ambientais, como temperatura, umidade, presença de oxigênio e tipo de solo, influenciam diretamente a taxa de degradação (Otake et al., 1995). A limitada disponibilidade de microrganismos especializados, associada à baixa biodisponibilidade do material plástico, prolonga o tempo necessário para sua mineralização completa (Danso; Chow; Streita, 2019). Por isso, mesmo quando há algum nível de degradação,

o processo é muitas vezes parcial (Ghatge et al., 2020). A Figura 2 ilustra os principais fatores que dificultam a biodegradação de plásticos e destaca a complexidade desse processo em diferentes ambientes.

Figura 2 - Dificuldade na biodegradação de plásticos.



Fonte: Autoria própria.

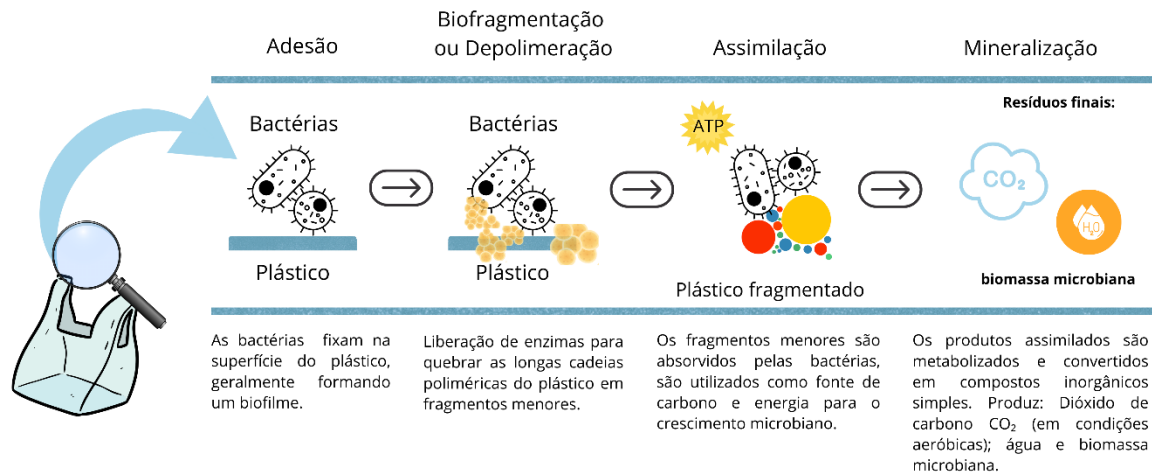
A pesquisa sobre a biodegradação microbiana do PE tem avançado, mas ainda enfrenta desafios significativos devido à falta de padronização nos métodos experimentais. Estudos recentes evidenciam que pesquisas distintas utilizam condições experimentais variadas, como o tempo de incubação, a temperatura, o tipo de meio de cultura e a espessura do filme de PE, o que dificulta a comparação e a interpretação dos resultados. Além disso, a ausência de uma definição clara e consistente do que constitui a "biodegradação" do PE limita a compreensão dos mecanismos envolvidos.

Para avançar nesse campo, é essencial estabelecer protocolos experimentais uniformes que permitam a comparação entre estudos e a identificação precisa das fases do processo de degradação. Essas fases incluem a adesão, a biofragmentação, a assimilação e a mineralização, que, juntas, representam o ciclo completo de degradação do PE por microrganismos (Zahra et al., 2010). Ao adotar abordagens metodológicas padronizadas e uma definição clara de biodegradação, será possível aprimorar a eficácia das pesquisas e contribuir para soluções mais eficazes no enfrentamento da poluição por plásticos de acordo com a Figura 3 (Gilan; Hadar; Sivan, 2004; Kumar Sen; Raut, 2015; Montazer; Najafi; Levin, 2020a).

A primeira etapa é a adesão do microrganismo ao plástico, a chamada biodeterioração consiste nas alterações iniciais do material plástico, que podem ser causadas por fatores abióticos, como a radiação UV, calor e agentes químicos presentes no ambiente, ou pela ação superficial de microrganismos (Figura 3). Essas modificações promovem microfissuras e

fragilizam a estrutura do polímero, criando pontos de entrada que facilitam a ação de enzimas microbianas. Alguns microrganismos são capazes de iniciar esse processo de forma autônoma por meio da reação de hidroperoxidação, que provoca a oxidação direta do plástico, caracterizando a biodeterioração (Hueck, 2001; Khoshtinat, 2023; Montazer; Najafi; Levin, 2020).

Figura 3 - Representação esquemática da mineralização de plásticos em ambientes aeróbicos.



Fonte: Autoria própria com base em Hueck, 2001; Khoshtinat, 2023; Montazer; Najafi; Levin, 2020.

Na sequência, ocorre a biofragmentação ou despolimerização, etapa em que enzimas produzidas pelos microrganismos quebram as longas cadeias poliméricas em fragmentos menores, como oligômeros e ácidos graxos. Essa quebra enzimática ocorre principalmente nas regiões amorfas ou previamente oxidadas do polímero, tornando os produtos resultantes mais solúveis e acessíveis às células microbianas. A terceira fase é a assimilação ou bioassimilação, na qual os fragmentos gerados na etapa anterior são absorvidos pelos microrganismos e incorporados ao seu metabolismo (Figura 3). Nesse momento, os compostos provenientes da degradação do polímero são utilizados como fonte de carbono e energia, evidenciando que o plástico está sendo efetivamente metabolizado (Montazer; Najafi; Levin, 2020).

Por fim, a mineralização representa a etapa final do processo, em que os produtos assimilados são convertidos em substâncias simples, como CO_2 , água e biomassa celular. Essa fase corresponde à completa degradação do polímero, na qual não restam resíduos sintéticos no meio ambiente (Figura 3) (Montazer; Najafi; Levin, 2020; Yang et al., 2015)

No entanto, o PE precisa passar por alterações estruturais iniciais para se tornar mais suscetível à ação microbiana. Essas alterações geralmente ocorrem por mecanismos abióticos

na natureza ou induzidos em laboratórios (radiação UV, ao calor ou a agentes químicos) (Chen; Lin, 2021; Ronca, 2017).

É importante distinguir entre a simples deterioração superficial e a biodegradação completa, que envolve a fragmentação da cadeia principal do polímero e sua posterior mineralização. Embora a completa biodegradação do PE ainda não tenha sido claramente demonstrada para polímeros de alto peso molecular, estratégias como pré-oxidação e o uso de microrganismos termofílicos têm mostrado avanços promissores no sentido de tornar o PE mais suscetível à ação microbiana (Jeon; Kim, 2013; Montazer; Najafi; Levin, 2020).

A biodegradação completa do PE, entendida como a mineralização total do polímero intacto, inclusive da cadeia principal, ainda não foi comprovada experimentalmente. Como discutido por Yoon et al. (2012), apesar de alguns microrganismos apresentarem capacidade de degradar parcialmente o PE de baixo peso molecular, a degradação completa do PE virgem por microrganismos isolados ainda não foi demonstrada (Gyung Yoon; Jeong Jeon; Nam Kim, 2012).

Portanto, muitos dos relatos de biodegradação do PE encontrados na literatura referem-se a processos parciais, em que se observa predominantemente a remoção de frações de baixo peso molecular, de cadeias laterais ou de regiões amorfas do polímero, sem evidências consistentes de fragmentação da cadeia principal (Ghatge et al., 2020; Heris, 2024; Montazer; Najafi; Levin, 2020).

2.6 Degradação de PE por microrganismos

PEBD é recalcitrante sendo assim resistente à degradação ambiental, no entanto, apesar de sua resistência, estudos têm mostrado que certos microrganismos, como fungos e bactérias, podem degradar o PE, um processo conhecido como biodegradação microbiana e têm mostrado potencial para metabolizar ou degradar as cadeias de PE, embora com limitações em termos de velocidade e eficiência (Arkatkar et al., 2010; Ghatge et al., 2020; Jeon; Kim, 2013; Kumar Sen; Raut, 2015; Restrepo-Flórez; Bassi; Thompson, 2014). A degradação biológica do PE é uma área de pesquisa em crescimento devido ao seu potencial para reduzir os impactos ambientais dos plásticos e promover soluções mais sustentáveis.

De acordo com “*Biodegradation of polyethylene: a brief review*” (Ghatge et al., 2020), muitos estudos sobre a biodegradação do PE empregam avaliações investigativas de mudanças nas propriedades físico-químicas estruturais do material para comprovar a biodegradação do

polímero, utilizando técnicas como FTIR, calorimetria diferencial de varredura (DSC), MEV e microscopia de força atômica (AFM).

Investigações mais aprofundadas sobre os mecanismos enzimáticos envolvidos na degradação do PE podem esclarecer como os microrganismos promovem a quebra de suas cadeias poliméricas. Esse conhecimento é essencial para desenvolver estratégias que aumentem a eficiência da biodegradação e contribuam para a redução do impacto ambiental associado ao material. A área tem avançado com a identificação de enzimas capazes de atuar sobre o PE, destacando-se como um campo promissor para o aprimoramento de processos biodegradativos (Gilan; Hadar; Sivan, 2004; Kumar Sen; Raut, 2015).

Nesse contexto, cepas bacterianas como *Rhodococcus ruber* têm se destacado como promissoras na degradação de PE, com pesquisas demonstrando sua capacidade de colonizar e degradar o polímero de forma eficiente (Gilan; Hadar; Sivan, 2004). Além disso, no caso do PP, a combinação das bactérias *Bacillus flexus* e *Pseudomonas azotoformans* demonstrou uma degradação de 22,7% após 12 meses de incubação, quando submetidas a pré-tratamento por UV (Arkatkar et al., 2010). A irradiação UV do PE, simula o envelhecimento natural causado pela exposição ao sol, é uma técnica comum utilizada para aumentar a suscetibilidade do plástico à biodegradabilidade, ao promover modificações estruturais, como a formação de grupos carbonila, que facilitam a ação microbiana (Arkatkar et al., 2010; Gilan; Hadar; Sivan, 2004).

As espécies bacterianas identificadas em estudos foram *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Pseudomonas* sp. Entre as espécies fúngicas identificadas, estão *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* e *Aspergillus glaucus* (Gupta; Gupta; Rathi, 2004; Jeon; Kim, 2013; Kyaw et al., 2012; Roman et al., 2024; Wróbel et al., 2023; Zahra et al., 2010).

No estudo de (Kyaw et al., 2012) utilizaram cepas do gênero *Pseudomonas*, cultivadas em meio mínimo contendo filmes comerciais de PEBD. Embora não tenham empregado pré-tratamento químico ou térmico no polímero, os autores utilizaram diferentes métodos analíticos para avaliar a degradação, como perda de massa, alterações na morfologia da superfície por MEV e mudanças estruturais detectadas por FTIR.

Já Zahra et al. (2010) adotaram uma estratégia baseada no uso de fungos isolados de aterros sanitários (*A. fumigatus*, *A. terreus* e *F. solani*), cultivados em meio sólido composto por resíduos orgânicos. O diferencial metodológico foi o pré-tratamento do PEBD por exposição à radiação UV durante 25 dias, o que promoveu a oxidação e facilitou a colonização fúngica. A degradação foi avaliada ao longo de 100 dias, por meio de análises morfológicas,

FTIR e de perda de peso, sendo uma das poucas abordagens que combinam simulação de condições reais de resíduo sólido urbano com o uso de pré-tratamento oxidativo.

Em uma abordagem mais recente e abrangente, Roman et al. (2024) investigaram comunidades microbianas complexas presentes em solos contaminados com plásticos. O estudo focou no enriquecimento de consórcios microbianos, seguido de análises metagenômicas para identificar genes e vias metabólicas envolvidos na degradação de polímeros.

Por fim, (Wróbel et al., 2023) realizaram uma triagem de micro-organismos isolados de ambientes contaminados, avaliando sua capacidade de degradar tanto PE quanto PP. A metodologia incluiu o cultivo de cepas bacterianas e fúngicas em contato com fragmentos de polímero e posterior análise por MEV e FTIR. O estudo destaca a importância da seleção criteriosa de micro-organismos com potencial de aplicação industrial.

2.6.1 *Anoxybacillus sp.*

O gênero *Anoxybacillus* compreende bactérias termofílicas e moderadamente termotolerantes, amplamente encontradas em ambientes aquecidos, como fontes termais, solos geotérmicos, regiões submetidas a altas temperaturas. De acordo com descrições taxonômicas consolidadas em bases de dados microbiológicas, como o BacDive (*The Bacterial Diversity Metadatabase*) (<https://bacdive.dsmz.de>), essas bactérias geralmente apresentam crescimento ótimo entre 45 °C e 60 °C, podendo tolerar temperaturas superiores, dependendo da linhagem. Essa adaptação natural a temperaturas elevadas confere características metabólicas e fisiológicas de grande interesse biotecnológico, especialmente em processos que se beneficiam da estabilidade térmica, da robustez enzimática e da maior eficiência de degradação em condições extremas. No contexto da biodegradabilidade de plásticos, a aplicação de microrganismos termofílicos tem sido considerada uma abordagem inovadora para acelerar a degradação (Özdemir et al., 2022). Altas temperaturas favorecem a degradação de plásticos por bactérias termofílicas, pois o calor aumenta a mobilidade das cadeias poliméricas e compromete a integridade mecânica do material, facilitando a ação das enzimas (Atanasova et al., 2021). A biodegradação realizada por esses microrganismos, seja em ambientes naturalmente quentes ou em sistemas de tratamento térmico de resíduos, representa uma alternativa promissora para reduzir o acúmulo de plásticos descartados. A alta eficiência dessas bactérias termofílicas em ambientes aquecidos pode ser uma solução eficaz para mitigar o impacto ambiental dos plásticos, especialmente em cenários em que os métodos tradicionais de decomposição são lentos ou ineficazes (Atanasova et al., 2021; Özdemir et al., 2022).

Hidrocarbonetos, como os presentes no óleo bruto, são compostos orgânicos complexos, frequentemente difíceis de degradar por microrganismos (Nzila, 2018). No entanto, algumas bactérias termofílicas, como as espécies de *Anoxybacillus sp.*, têm demonstrado grande potencial para metabolizar esses compostos, principalmente por meio da produção de enzimas, como a alcano hidroxilase e a lipase. Essas enzimas desempenham um papel crucial na degradação de hidrocarbonetos, facilitando a biodegradabilidade desses compostos e, assim, auxiliando no processo de biorremediação (Yusoff et al., 2020).

A produção de alcano hidroxilase por *Anoxybacillus sp* torna essa bactéria candidata ideal para a biorremediação de ambientes contaminados por petróleo, devido à sua capacidade de degradar eficientemente os alcanos, um dos principais componentes do óleo bruto (Kumar et al., 2020; Yusoff et al., 2020). Além disso, outra característica importante que tem ganhado atenção em bactérias termofílicas é a tolerância a solventes, um aspecto até então pouco explorado. A *Anoxybacillus sp.* PGDY12, por exemplo, é a primeira bactéria estritamente termofílica capaz de tolerar uma ampla gama de solventes (Gao et al., 2011).

2.6.2 *Chelatococcus sp.*

O gênero *Chelatococcus* abrange bactérias aeróbias e gram-negativas, isoladas principalmente de solos, lodos ativados, águas residuárias e regiões com alta temperatura. De acordo com descrições taxonômicas disponibilizadas em bases especializadas, como o BacDive (<https://bacdive.dsmz.de/strain/133085>), a maioria das espécies conhecidas de *Chelatococcus* apresenta perfil mesofílico, com crescimento predominante em temperaturas moderadas. No entanto, algumas linhagens isoladas de ambientes aquecidos demonstram tolerância térmica elevada, o que indica que o gênero possui potencial adaptativo para atuar em condições mais extremas quando selecionado sob tais pressões ambientais. De acordo com o BacDive, a cepa *Chelatococcus composti* DSM 101465 (BacDive ID 133085) apresentou crescimento registrado na faixa de 30 a 60 °C, isso indica uma grande tolerância térmica.

Os PHAs, especialmente o polihidroxibutirato (PHB), são biopolímeros produzidos por diversos microrganismos como forma de reserva de carbono e energia. Sua relevância cresce diante da necessidade de alternativas sustentáveis aos plásticos convencionais, pois são biodegradáveis, biocompatíveis e derivados de fontes renováveis. O gênero *Chelatococcus* tem se destacado como um grupo promissor na produção de PHA, com várias cepas demonstrando essa capacidade metabólica. Estudos recentes revelaram que o acúmulo de PHAs, antes

considerado uma característica isolada, é, na verdade, uma propriedade comum entre diferentes espécies do gênero em condições termofílicas (Ibrahim et al., 2016; Xu et al., 2014).

No estudo de (Jeon; Kim, 2013), foi isolada uma bactéria termofílica (*Chelatococcus sp.*) a partir de composto orgânico, capaz de degradar PEBD. A cultura foi realizada sob condições termofílicas, com o polímero como única fonte de carbono. Destaca-se o uso de frações previamente obtidas por degradação térmica, o que facilita a atuação microbiana devido à menor complexidade estrutural do substrato.

2.7 Mecanismos enzimáticos na degradação

A aplicação de abordagens ômicas, como metagenômica, transcriptômica e proteômica, tem sido aplicada ao estudo de consórcios microbianos voltados à conversão de biomassa vegetal e plásticos fósseis pelo nosso grupo de pesquisa (Moraes et al., 2018; Paixão et al., 2021; Roman et al., 2024). O termo “ômica” refere-se a estratégias experimentais que permitem a análise em larga escala de diferentes tipos de moléculas biológicas, proporcionando uma visão integrada da estrutura, função e atividade microbianas. A metagenômica possibilita a caracterização do material genético total presente em uma comunidade, permitindo identificar não apenas as espécies microbianas presentes, mas também os genes que codificam enzimas e rotas metabólicas potencialmente envolvidas na degradação de polímeros e biomassa. Já a transcriptômica fornece informações sobre a expressão gênica, indicando quais genes estão ativos em determinadas condições, permitindo compreender quais processos metabólicos estão efetivamente sendo utilizados durante a degradação. Por fim, a proteômica permite a análise das proteínas produzidas, incluindo enzimas funcionais diretamente responsáveis pela catálise de reações de degradação e adaptação a estresses ambientais. Nesse contexto, o trabalho de (Moraes et al., 2018), pioneiro na identificação de enzimas e rotas metabólicas para a conversão de lignina, revelou centenas de enzimas envolvidas na conversão desse polímero e dezenas de genomas bacterianos associados à degradação de compostos aromáticos. Além disso, esses estudos permitiram viabilizar o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos para a produção de biocombustíveis e de rotas biocatalíticas aplicadas à obtenção de compostos nutracêuticos e químicos de alto valor a partir de biomassa lignocelulósica (Damasio et al., 2019; Franco Cairo et al., 2021; Tramontina et al., 2023).

As estratégias de prospecção de biocatalisadores descritas nesses estudos demonstram grande potencial de aplicação na despolimerização de polímeros sintéticos persistentes, que possuem ligações C–O, C–N e C–C. Esses microrganismos são capazes de canalizar os

intermediários da degradação para rotas catabólicas centrais, o que permite a produção de compostos de interesse biotecnológico. Esse processo, conhecido como “afunilamento biológico”, é amplamente estabelecido na valorização da lignina e pode ser adaptado à biorreciclagem de plásticos.

A descoberta de microrganismos capazes de degradar plásticos derivados do petróleo e assimilar seus monômeros gerou grande expectativa quanto à viabilidade da reciclagem biológica desses materiais (Yoshida et al., 2016). Embora o estudo das enzimas envolvidas na degradação de plásticos ainda esteja em estágio inicial, os avanços têm sido rápidos. Desde 2011, pesquisas têm se concentrado em enzimas como esterases, lipases, cutinases e carboxilesterases com atividade sobre polímeros plásticos (Carr; Clarke; Dobson, 2020; Danso; Chow; Streita, 2019; Wei; Oeser; Zimmermann, 2014). A identificação da bactéria *Ideonella sakaiensis* em 2016 foi um marco nesse campo, uma vez que essa espécie produz duas enzimas-chave, como a PETase e a MHETase, que atuam sinergicamente na degradação do PET, convertendo-o em etilenoglicol (EG) e ácido tereftálico (TPA), representado na Quadro 1 (Han et al., 2017; Palm et al., 2019; Yoshida et al., 2016).

Desde então, diversos estudos buscaram otimizar a eficiência catalítica e a especificidade da PETase, com resultados promissores para sua aplicação biotecnológica (Austin et al., 2018; Lu et al., 2022). A caracterização estrutural e bioquímica da MHETase também trouxe avanços importantes para o entendimento da atuação conjunta dessas enzimas (Knott et al., 2020).

Quadro 1 Enzimas microbianas com atividade funcional em plásticos

Enzima / Classe	Plástico	Função / mecanismo
PETse	PET	Hidrolisa ligações éster no PET, gerando monômeros ou oligômeros de ácido tereftálico e etileno glicol.
MHETase	PET / MHET	Converte MHET (mono-2-hidroxi-etileno tereftalato) em monômeros de PET.
Leaf-compost cutinase (LCC)	PET e outros poliésteres	Hidrolisa poliésteres, facilitando a degradação microbiana do polímero
Polycarbonate-active enzymes	Polycarbonato (PC)	Quebra ligações éster do polycarbonato, favorecendo a degradação química e enzimática
Latex-clearing protein (LCP)	Diversos polímeros sintéticos	Facilita a depolimerização de polímeros, promovendo degradação do material

Legenda: Enzimas retiradas de artigos de revisão de acordo com Pérez-García et al., 2025; Wei; Zimmermann, 2017.

Fonte: Autoria própria.

Além disso, a criação de bancos de dados, como o PAZY (*Plastic Active Enzymes*), tem sido essencial para sistematizar o conhecimento sobre enzimas ativas em plásticos (Buchholz

et al., 2022; Gambarini et al., 2022; Sriariyanun et al., 2019). Nos últimos anos, avanços significativos permitiram a identificação e caracterização de enzimas microbianas capazes de degradar polímeros sintéticos, com destaque para as hidrolases atuantes em poliésteres como o PET, por sua capacidade de romper ligações éster e viabilizar processos de reciclagem biotecnológica mais sustentáveis. De acordo com revisões recentes, já são conhecidas mais de 255 enzimas microbianas com atividade funcional contra diferentes plásticos, de acordo com o Quadro 1 (Pérez-García et al., 2025; Wei; Zimmermann, 2017).

A ampliação da diversidade enzimática e a otimização de rotas metabólicas são estratégias centrais para o desenvolvimento de tecnologias viáveis de reciclagem biológica, com potencial para transformar resíduos persistentes em matérias-primas reaproveitáveis, alinhando-se aos princípios de economia circular e sustentabilidade (Pérez-García et al., 2025; Wei; Zimmermann, 2017).

2.8 Pré-Tratamento físico-químico de plásticos

O pré-tratamento químico de plásticos é uma etapa fundamental, pois envolve a modificação das superfícies plásticas para melhorar a adesão de microrganismos e promover a degradação biológica. Esta área visa tornar as superfícies plásticas mais suscetíveis ao ataque de microrganismos degradadores. Em termos práticos, a escolha da técnica de pré-tratamento ideal depende das características do plástico a ser tratado e do objetivo da pesquisa ou da aplicação. A eficácia do tratamento pode ser influenciada por fatores como a concentração do reagente, o tempo de exposição e a temperatura, sendo necessário realizar otimizações experimentais para cada tipo de plástico. O tratamento químico visa alterar essas propriedades para que os plásticos se tornem mais reativos ou porosos, permitindo maior interação com os microrganismos (Hu; Lim; Hu, 2023). Ao realizar modificações superficiais, os tratamentos físico-químicos de plásticos podem facilitar a adesão de microrganismos e a ação de enzimas degradadoras à superfície do plástico (Gilan; Hadar; Sivan, 2004).

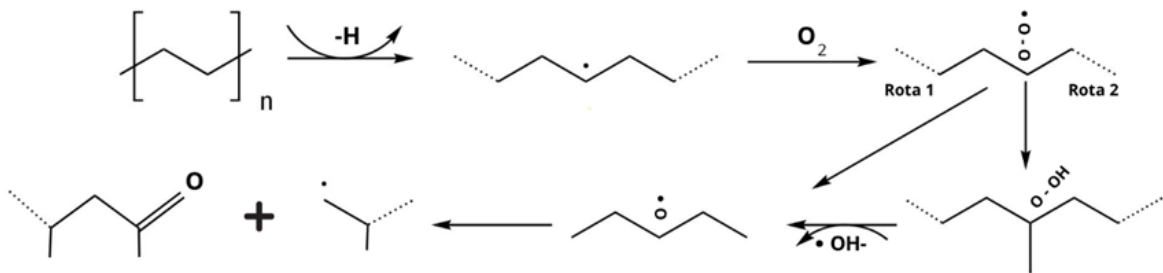
As técnicas de tratamento químico mais comuns, destacam-se o uso de ácidos, bases e oxidação. O tratamento com ácidos, como o ácido nítrico ou o ácido sulfúrico, é uma das abordagens mais utilizadas, pois esses reagentes promovem a oxidação da superfície do plástico, criando grupos funcionais como carboxilas (-COOH) e hidroxilas (-OH), que aumentam a reatividade da superfície e a possibilidade de interação com microrganismos. Outro método eficaz é o uso de peróxidos, como o peróxido de hidrogênio, que introduzem radicais livres na superfície, tornando o plástico mais reativo e suscetível ao ataque microbiano. O

tratamento com ozônio, por ser um potente agente oxidante, também pode ser utilizado para modificar a superfície do plástico, tornando-a mais suscetível à degradação biológica.

A introdução de grupos como carboxilas ou hidroxilas aumenta a capacidade do plástico de absorver água, o que favorece o ataque de microrganismos, já que muitos processos de biodegradação dependem da umidade para ocorrerem de forma eficiente. Além disso, a formação de microfissuras ou o aumento da rugosidade da superfície pode facilitar a colonização microbiana, permitindo maior difusão de enzimas e nutrientes para o interior do plástico (Hu; Lim; Hu, 2023).

A Figura 4 apresenta um esquema geral do processo de degradação oxidativa em polímeros cuja cadeia principal é composta por átomos de carbono. A oxidação inicia-se pela abstração de um átomo de hidrogênio da cadeia polimérica, formando um radical. Na presença de oxigênio molecular (O_2), esse radical converte-se em um radical peroxila ($POO\bullet$).

Figura 4 - Esquema geral degradação por oxidação em polímeros com cadeia principal em carbono.



Fonte: Autoria própria.

Na Rota 1, o radical peroxila sofre rearranjos que levam à formação de um radical alcóxi ($PO\bullet$), o qual é altamente instável e tende a promover cisão da cadeia polimérica. Essa ruptura resulta em fragmentos de menor massa molecular, como carbonila, e em novos radicais capazes de continuar o processo de degradação. Na Rota 2, o radical peroxila abstrai um hidrogênio de outra cadeia polimérica, formando um hidroperóxido ($POOH$). Esse hidroperóxido pode posteriormente decompor-se, especialmente na presença de íons hidroxila (OH^-), dando origem a novos radicais que perpetuam a oxidação.

Na oxidação avançada do PE, o uso combinado de ozônio (O_3) e peróxidos potencializa a formação desses radicais reativos, acelerando a ruptura da cadeia polimérica. A geração desses produtos oxigenados não apenas reduz o peso molecular do material, mas também aumenta sua polaridade e acessibilidade enzimática, favorecendo a degradação microbiológica posterior do polímero no ambiente (Oh; Stache, 2024).

2.9 Resumo dos conceitos de biodegradação

Para facilitar a visualização e consolidar os principais conceitos abordados nesta seção, os elementos centrais relacionados à biodegradação de polímeros, pré-tratamento e interação enzima-polímero são resumidos na Quadro 2.

Quadro 2 Síntese dos principais conceitos sobre biodegradação de polímeros, pré-tratamento e interação enzima-polímero

Item	Degradação de polímeros	Pré-tratamento do polímero	Interação enzima-polímero
Conceito / descrição	Fragmentação do polímero em moléculas menores, tornando-o disponível para metabolização microbiana.	Modificação física ou química do polímero para aumentar sua reatividade e suscetibilidade microbiana.	Contato efetivo entre enzimas/microrganismos e o polímero, essencial para degradação. Polímeros com baixa disponibilidade de grupos reativos apresentam menor adesão enzimática.
Mecanismo	Atuação enzimática e processos oxidação avançada. Influenciada por temperatura, umidade, pH, oxigênio e composição do solo.	Oxidação química (ozônio, H ₂ O ₂); introdução de grupos funcionais como -OH e -COOH, aumentando hidrofiliabilidade e adesão microbiana.	Adsorção na superfície, reconhecimento de grupos funcionais e penetração parcial em regiões amorfas. Pré-tratamentos aumentam a interação.
Impacto na biodegradação	Determina a disponibilidade do polímero para metabolização microbiana.	Facilita a ação enzimática, aumentando a eficiência da degradação. Pré-tratamento de PEBD promove maior formação de carbonilas e carboxilas.	Favorece a taxa de degradação; pré-tratamentos aumentam a adesão enzimática e a eficiência microbiana.

Fonte: Autoria própria.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial metabólico e bioquímico dos microrganismos termofílicos *C. composti* (CR22) e *A. rupiensis* (CR1) na biodegradação do PEBD, comparando a eficiência do processo em amostras com e sem pré-tratamento por oxidação avançada, com ozônio e peróxido de hidrogênio.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a capacidade da linhagem *A. rupiensis* de degradar o PEBD em condições termofílicas;
- Verificar a capacidade das linhagens *C. composti* de degradar o PEBD em condições termofílicas;
- Comparar o desempenho da biodegradação do PEBD submetido ao pré-tratamento por oxidação avançada com o não pré-tratado;
- Avaliar as alterações físico-químicas na estrutura do PEBD após o cultivo microbiano, por meio de análises como FTIR e MEV;
- Caracterizar o perfil genômico das linhagens bacterianas, investigando o potencial enzimático e as vias metabólicas envolvidas na degradação do polímero.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta de Solo e Enriquecimento Microbiano

O solo foi coletado em uma área de compostagem localizada na Universidade de Sorocaba (UNISO). A amostragem considerou a camada superficial do solo, que passou por peneiração criteriosa para a remoção de materiais indesejados, como pedras, galhos e folhas, resultando em 10 g de solo limpo destinados à análise.

Para o enriquecimento microbiológico, foi utilizado 1 g da amostra de solo como inóculo em um meio de cultura desenvolvido para selecionar cepas com a capacidade de degradar PE (Roman et al., 2024). O enriquecimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 50 ml de *Bushnell Haas Broth* (BHS), preparado com a seguinte composição: 0,20 g/L de MgSO₄, 0,02 g/L de CaCl₂, 1,00 g/L de KH₂PO₄, 1,00 g/L, NH₄NO₃, 0,05 g/L de FeCl₃, além de 0,1% de triptona e 0,1% de glicose (Cho et al., 2025; Zampolli et al., 2024). A solução foi suplementada com 5% (w/v) de PEBD. O frasco foi então incubado em uma estufa com agitador (SOLAB SL-222, Brasil) a 50°C e 80 rpm para promover o crescimento bacteriano e a biodegradação do PE.

Os repiques foram realizados a cada 10 dias, transferindo 1 ml da cultura prévia como inóculo para a nova preparação, juntamente com um pellet de PE (Sigma-Aldrich 428043) proveniente da cultura anterior. Este processo de subcultura foi repetido por 10 ciclos consecutivos, totalizando 100 dias de cultivo contínuo, com o objetivo de enriquecer as populações bacterianas capazes de degradar o PE de forma eficiente.

4.1.1 Isolamento dos Microrganismos.

Ao término do cultivo de enriquecimento, procedeu-se ao isolamento das cepas bacterianas utilizando meio de cultura Luria-Bertani (LB), composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, suplementado com 2% de ágar. O meio foi vertido em placas de Petri estéreis (90 × 15 mm). O inóculo, proveniente do cultivo enriquecido após 100 dias de incubação, foi aplicado nas placas, que foram incubadas a 30 °C em estufa microbiológica (*Ethik Technology* 410-2D, Brasil), para favorecer o desenvolvimento das colônias bacterianas. Após o crescimento das colônias, as que apresentaram morfologia distinta foram selecionadas e subcultivadas em novas placas de Petri contendo o mesmo meio de

cultura, com o objetivo de obter o isolamento puro de cada microrganismo. Ao final desse processo, foram obtidas sete colônias puras (Wróbel et al., 2023).

Em seguida, realizou-se a coloração de Gram das cepas isoladas para caracterização preliminar. Para avaliar a capacidade de crescimento utilizando PE como fonte de carbono, as cepas foram cultivadas em meio BHS, suplementado com 0,1% de glicose, 0,1% de triptona e fragmentos de garrafa de PE (1 cm × 1 cm). Esse ensaio teve como objetivo identificar quais cepas isoladas eram capazes de utilizar o PE como fonte de carbono.

Após o processo de isolamento, as bactérias CR1 e CR22 foram selecionadas com base em características morfológicas distintas e submetidas a sucessivos subcultivos até o isolamento em cultura pura.

4.1.2 Identificação Taxonômica do Microrganismo

O DNA genômico da bactéria foi extraído para sequenciamento ribossomal utilizando o *kit EasyPure® Bacteria Genomic DNA (TransGen Corporation, China)*, conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. A verificação da qualidade da extração foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e quantificação com o espectrofotômetro DS-11 FX (*DeNovix, Estados Unidos da América*). A amplificação do gene 16S RNA ribossomal foi realizada por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando os *primers* 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3').

Para otimizar o sequenciamento do fragmento amplificado, o produto de PCR foi precipitado e, em seguida, a clonagem foi realizada em um plasmídeo pJET 1.2/blunt, com o auxílio do *kit CloneJet PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific, Lituânia)*. Após a transformação de células de *Escherichia coli* por eletroporação, os plasmídeos foram recuperados. O crescimento das colônias foi seguido da extração dos plasmídeos com o *kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, Lituânia)*, e a extração foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os plasmídeos obtidos foram sequenciados por meio do método Sanger. As sequências foram então submetidas à pesquisa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), com o banco de dados de RNA ribossômico 16S (16S RNA ribossomal - *Bacteria e Archaea*), utilizando *Megablast*. Além do sequenciamento ribossomal, uma análise de *average nucleotide identity* (ANI) foi realizada na plataforma *EzBiocloud* para a identificação a nível de espécie. A identidade média de nucleotídeos foi calculada com base em regiões homólogas dos genomas comparados. Para isso, foram selecionadas com base nas similaridades do RNA ribossomal 16S. Em seguida, os genomas completos dessas cepas foram

comparados diretamente aos *scaffolds* gerados pelo sequenciamento global das cepas CRI e CR22, com dados disponíveis na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Yoon et al., 2017).

A identificação filogenômica das cepas *A. rupiensis* e *C. composti* foi realizada através do servidor TYGS (*Type Strain Genome Server*), acessível em <https://tygs.dsmz.de>. O servidor TYGS foi utilizado para a classificação taxonômica da cepa através da análise de Hibridização DNA-DNA digital (dDDH), que avalia a identidade genômica por meio da comparação de pares de segmentos de alta pontuação (HSPs) em regiões alinhadas, além da construção de uma árvore filogenética.

4.2 Curva de crescimento de *C. composti* e *A. rupiensis* em PEBD

A definição dos parâmetros experimentais de temperatura de 50 °C foi escolhida por corresponder à faixa ótima de crescimento das linhagens *C. composti* e *A. rupiensis*, previamente isoladas de um consórcio termofílico (Roman et al., 2024). A proporção de polímero utilizada nos ensaios foi definida para garantir quantidade suficiente de substrato para a avaliação da degradação, mantendo-se em acordo com protocolos utilizados em estudos anteriores de biodegradação (Edwards et al., 2022; Yao; Seong; Jang, 2022b; Yusoff et al., 2020)

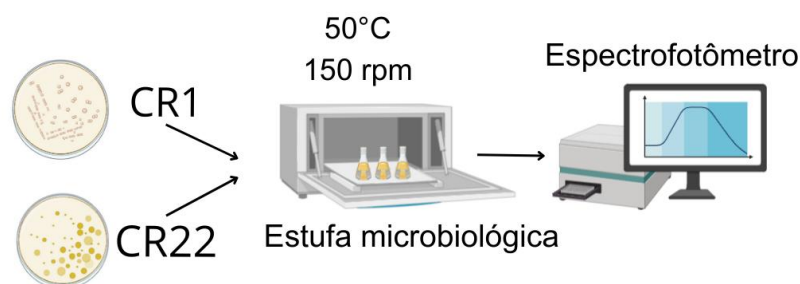
Quanto ao pré-tratamento químico, as concentrações de ozônio e de peróxido de hidrogênio, bem como o tempo de exposição, foram escolhidas com base em evidências de que esses agentes introduzem grupos funcionais oxidativos, como carbonilas e carboxilas, capazes de aumentar a hidrofiliabilidade e favorecer a adesão microbiana, sem promover degradação excessiva antes da etapa biológica (Hu; Lim; Hu, 2023). Além disso, a determinação da curva de crescimento das linhagens foi necessária para estabelecer as condições adequadas de inoculação nos ensaios subsequentes.

A curva foi obtida por meio do monitoramento da densidade óptica (OD600) ao longo do tempo, permitindo identificar a fase exponencial de crescimento e esse acompanhamento também possibilitou determinar o intervalo de tempo necessário para que as bactérias atingissem a fase de maior atividade. Foram realizados cultivos com e sem pré-tratamento oxidativo em filme plástico de PEBD, inicialmente, foi preparado pré-inóculo em tubos Falcon de 50 mL contendo 25 mL de meio TB estéril mais as cepas: *C. composti* e *A. rupiensis*, que foram incubados a 50 °C por 24 horas sob agitação em estufa shaker (SOLAB SL-222, Brasil). Em seguida, transferiu-se 5% (v/v) desse pré-inóculo para frascos Erlenmeyer de 125 mL

contendo 50 mL de meio mínimo M9 (KH_2PO_4 , 15 g/L, NaCl , 2.5 g/L, Na_2HPO_4 , 33.9 g/L, NH_4Cl , 5 g/L) 0,1% de glicose, 0,1% de triptona e adicionado 0,1 g de filme plástico PEBD, fornecido pela empresa Extrusa Pack (código: 510264), composto exclusivamente por PEBD (Cho et al., 2025; Yun et al., 2023; Zampolli et al., 2024). O filme foi previamente cortado, lavado com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (w/v) durante 4 horas em agitação em estufa shaker (SOLAB SL-222, Brasil) a 50°C. Após 4 horas, os plásticos foram lavados em água ultrapura e secos em estufa microbiológica (*Ethink Technology* 410-2D, Brasil) a 50 °C *overnight* e adicionados de forma estéril ao meio (Harshvardhan; Jha, 2013).

As culturas foram mantidas sob incubação a 50 °C com agitação constante. O crescimento foi monitorado por meio de leituras de OD600 em diferentes tempos até 58 horas. As medições foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (*Thermo Fisher Scientific Genesys* 50, Estados Unidos da América) em triplicata para cada bactéria isolada, utilizando cubetas de quartzo apropriadas para medições precisas de absorbância, ilustrada pela Figura 5.

Figura 5- Fluxograma ilustrativo da curva de crescimento



Fonte: Autoria própria.

Os dados obtidos foram utilizados para a construção das curvas de crescimento, permitindo a identificação das fases *lag* (adaptação), *log* (crescimento exponencial), estacionária e início de declínio.

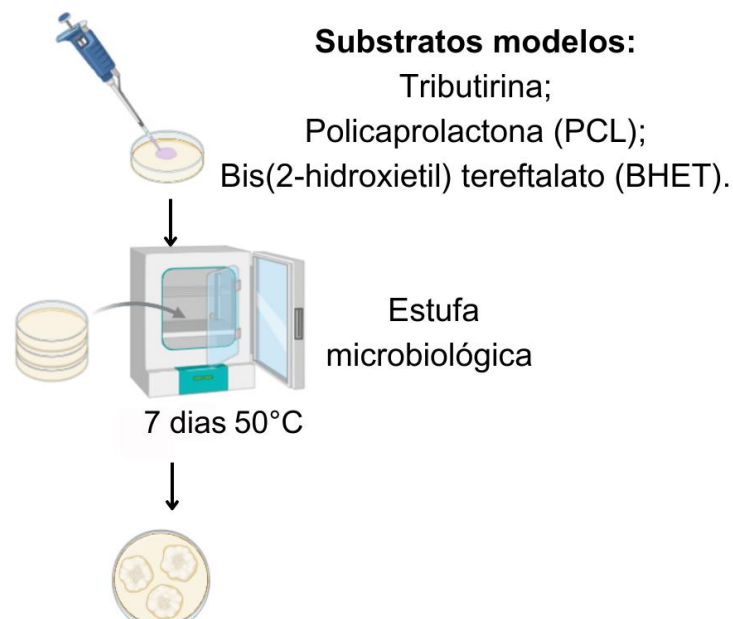
4.3 Avaliação de degradação “*Screening*”

Para a avaliação da capacidade degradativa das cepas bacterianas sobre tributirina, policaprolactona (PCL) e bis(2-hidroxi-etil) tereftalato (BHET), foram realizados testes qualitativos de triagem em placas de ágar. Placas contendo meio mínimo com 2% de tributirina (Sigma-Aldrich, código W222322) e 2% de ágar foram preparadas (w/v). O inóculo bacteriano foi aplicado no centro das placas, que foram incubadas a 50 °C por 1 dia (Figura 6).

Após o período de incubação, as placas de tributirina foram coradas por imersão em solução de *Fast Garnet* (Sigma-Aldrich, código 121568) a 10 mg/mL, previamente diluída em álcool etílico absoluto, durante 15 minutos. Em seguida, as placas foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura para remover o corante em excesso. A presença de um halo transparente ao redor das colônias foi interpretada como evidência de degradação da tributirina, resultado da ação de lipases produzidas pelas bactérias, conforme descrito por Smeltzer, Hart e Iandolo (1992). Esse halo indica a hidrólise dos ésteres presentes na tributirina, promovendo a formação da zona de clareamento (Smeltzer; Hart; Iandolo, 1992).

A PCL é um poliéster sintético amplamente utilizado em estudos de biodegradação devido à sua estrutura química, suscetível à hidrólise, e à capacidade de ser degradada por diversos microrganismos, como bactérias do gênero *Rhodococcus* (Shah et al., 2008; Zampolli et al., 2023). Para avaliar a degradação da PCL, o polímero em pó (Sigma-Aldrich, código 440744) foi dissolvido em acetona a 2% (p/v), avaliação ilustrada na Figura 6.

Figura 6- Fluxograma ilustrativo do *Screening*



Fonte: Autoria própria.

A solução foi homogeneizada e incorporada ao meio mínimo contendo 2% de ágar, ainda quente. Após nova homogeneização, o meio foi vertido em placas de Petri e deixado para solidificar. O inóculo bacteriano foi aplicado no centro das placas, que foram incubadas a 50 °C por 7 dias. A formação de zonas de clareamento ao redor das colônias foi interpretada como indicativa de atividade degradativa sobre a PCL.

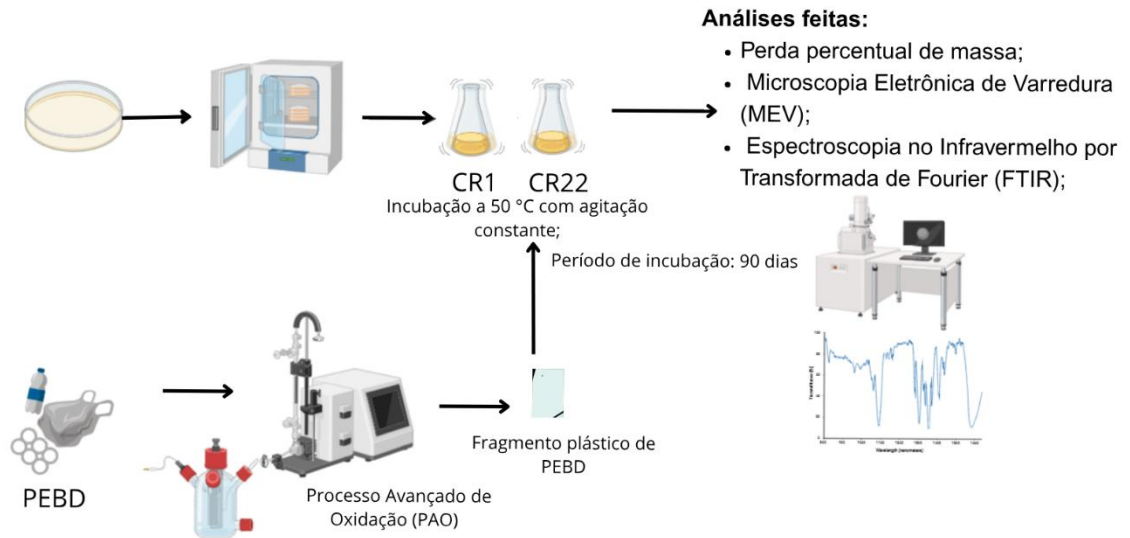
Já o BHET é um intermediário da degradação do polietileno tereftalato, frequentemente utilizado como modelo para investigar a ação de enzimas e microrganismos capazes de degradá-lo (Shah et al., 2008). Estudos demonstram que enzimas como as cutinases são capazes de catalisar eficientemente a hidrólise de PET e de seus intermediários, como o BHET, em condições controladas (Ronkvist et al., 2009). Para os ensaios de triagem da degradação de BHET (Sigma-Aldrich, código 465151) foi previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, código 276855) e adicionado ao meio mínimo contendo 2% de ágar, na concentração final de 0,5% (w/v). A mistura foi homogeneizada enquanto o meio ainda estava quente e, posteriormente, vertida em placas de Petri. Após a solidificação, o inóculo bacteriano foi aplicado no centro das placas, que foram então incubadas a 50 °C por 7 dias. A presença de zonas de clareamento, redução da opacidade ou alterações na superfície do meio foi considerada indicativa de possível atividade degradativa sobre o BHET.

4.4 Cultivo de 90 dias

Inicialmente, foi preparado um pré-inóculo em tubos Falcon de 50 mL, contendo 25 mL de meio de cultura TB estéril e as cepas *C. composti*. e *A. rupiensis*. Os tubos foram incubados a 50 °C por 24 horas, sob agitação, em uma estufa shaker (SOLAB SL-222, Brasil) a 150 rpm. Posteriormente, 5% (v/v) desse pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio M9 (KH₂PO₄, 15 g/L, NaCl, 2.5 g/L, Na₂HPO₄, 33.9 g/L, NH₄Cl, 5 g/L) suplementado com 0,1% de glicose, 0,1% de triptona e 0,1 g de filme plástico de PEBD, fornecido pela empresa Extrusa Pack, filme de PEBD composto exclusivamente por PEBD (código: 510264), foi previamente cortado, lavado com solução de SDS a 2% (w/v) durante 4 horas em agitação em estufa shaker (SOLAB SL-222, Brasil) a 50°C. Após 4 horas, os plásticos foram lavados em água ultrapura e secos em estufa microbiológica (*Ethik Technology* 410-2D, Brasil) a 50 °C *overnight* e adicionados de forma estéril ao meio (Harshvardhan; Jha, 2013). Após 90 dias de cultivo, foram coletados fragmentos do filme de PEBD para análises de FTIR, MEV e perda percentual de massa, ilustrados na Figura 7.

O tempo de incubação adotado buscou assegurar um período adequado para que alterações físico-químicas no PEBD fossem detectáveis, considerando que a biodegradação deste polímero ocorre de forma lenta e progressiva, geralmente exigindo semanas a meses para produzir efeitos mensuráveis (Cole et al., 2011; Otake et al., 1995; Roman et al., 2024).

Figura 7- Fluxograma ilustrativo do cultivo de 90 dias



Fonte: Autoria própria.

4.5 Análise de FTIR

Após 90 dias de cultivo, foram coletados fragmentos do filme de PEBD para análise por FTIR. Os fragmentos do PEBD foram retirados do meio e submetidos a um processo de lavagem com solução de SDS a 2% (w/v) durante 4 horas em agitação em estufa shaker orbital a 50°C. Após 4 horas, os plásticos foram lavados em água ultrapura, e secos em estufa microbiológica (*Ethik Technology 410-2D*, Brasil) a 50°C *overnight*, com o objetivo de remover resíduos celulares aderidos à superfície do matéria, em seguida, as amostras (Harshvardhan; Jha, 2013; Yao; Seong; Jang, 2022). Após os fragmentos limpos, foram analisados por FTIR (*Agilent Cary 630*, Estados Unidos da América). As análises foram realizadas no modo ATR (Reflexão Total Atenuada), cobrindo a faixa espectral de 500 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹, a fim de identificar possíveis alterações químicas na estrutura do polímero decorrentes da exposição às condições de cultivo bacteriano.

4.5.1 Índice FTIR

Os espectros de FTIR foram inicialmente convertidos de transmitância (%) para absorvância (A), utilizando a equação:

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Onde T representa a transmitância relativa em cada ponto do espectro. A conversão foi realizada com o objetivo de linearizar a resposta espectral, permitindo uma quantificação mais precisa da intensidade relativa das bandas.

A quantificação dos índices do PEBD foi realizada por meio do cálculo de índices espectrais, baseando-se na razão entre a absorvência de bandas associadas a grupos funcionais introduzidos durante a degradação e a absorvência de uma banda de referência interna estável, localizada em 1465 cm^{-1} , que permanece inalterada durante o processo e, portanto, é adequada para normalização (Roman et al., 2024).

Os índices foram calculados conforme descrito por Syranidou et al. (2023) e Albertsson e Karlsson (1990), com as seguintes fórmulas:

Índice de Carbonila (CI):

$$CI = \frac{A_{1715}}{A_{1465}}$$

Índice de Hidroxila (HI):

$$HI = \frac{A_{3340}}{A_{1465}}$$

Índice de Vinil (VI):

$$VI = \frac{A_{1640}}{A_{1465}}$$

Índice de Alifático (AI):

$$AI = \frac{A_{2848}}{A_{1465}}$$

A escolha da banda de referência em 1465 cm^{-1} segue a metodologia descrita por Roman et al. (2024), que destaca a estabilidade desta região durante processos oxidativos ou exposição microbiana. Os valores dos índices foram posteriormente plotados em gráficos para comparação entre os diferentes tratamentos e controles, permitindo avaliar o grau de modificação química sofrido pelas amostras de PEBD.

4.6 Análise de MEV

Após 90 dias de incubação, os fragmentos de filme plástico de PEBD foram cuidadosamente removidos dos frascos, lavados com SDS a 2% (w/v) a 50 °C, em agitação de 150 rpm; em seguida, lavados com água ultrapura para eliminação de resíduos do meio e deixados para secar à temperatura ambiente, em superfície limpa (Gupta; Devi, 2020; Harshvardhan; Jha, 2013). Para a análise morfológica da superfície, foi utilizado o JST-IT200; as amostras secas foram fixadas em suportes metálicos (*stubs*) com fita condutiva de carbono e, posteriormente, recobertas com uma fina camada de ouro (metalização) por pulverização catódica (*sputtering*) de 10 nm a cada 2 minutos, a fim de conferir condutividade elétrica adequada para a análise (Goldstein et al., 2017).

As imagens foram obtidas por MEV em diferentes ampliações, com o objetivo de identificar alterações morfológicas, formação de fissuras, rugosidade e evidências de degradação superficial decorrentes da exposição ao cultivo bacteriano.

4.6.1 Análise de MEV Biofilme

Um fragmento de PEBD contendo uma camada visível de biofilme, resultante do cultivo bacteriano, foi seco sob condições estéreis em capela de fluxo laminar, com o objetivo de preservar a estrutura superficial do biofilme (Wang et al., 2023). Após a secagem completa, as amostras foram submetidas ao processo de metalização, no qual uma fina camada de ouro foi depositada a vácuo (*Jeol DII-29010SCTR*, Japão). Esse revestimento metálico teve como finalidade conferir condutividade elétrica à amostra, melhorando a dispersão dos elétrons incidentes e minimizando os danos causados pela interação com o feixe eletrônico durante a análise por MEV (Goldstein et al., 2017).

4.7 Análise da perda de massa percentual do PEBD

Após o período de incubação de 90 dias, os fragmentos foram removidos dos frascos, novamente lavados com SDS 2% (w/v) sob as mesmas condições para remoção do biofilme e dos resíduos, enxaguados com água ultrapura e secos em estufa (*Ethik Technology 410-2D*, Brasil) a 50 °C *overnight* antes da pesagem final.

As massas iniciais e finais foram determinadas utilizando balança eletrônica analítica (*Quimis Aparelhos Científicos Q500B210C*, Brasil). Cálculo da perda percentual de massa para cada amostra, usando a fórmula:

$$\% \text{ perda de peso} = \left(\frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \right) \times 100$$

De acordo com a literatura, foram calculados a média e o desvio padrão das perdas percentuais de massa para cada grupo experimental e para os controles. Para comparar a perda de massa percentual do PEBD antes e depois do tratamento, foi aplicado o teste t de *Student* para amostras pareadas. Esse teste é indicado quando se pretende avaliar se existe diferença estatisticamente significativa entre duas medições relacionadas, realizadas sobre as mesmas amostras. O teste t pareado compara as diferenças individuais entre os valores antes e depois, verificando se a média dessas diferenças é estatisticamente diferente. As hipóteses estatísticas foram definidas como:

- H0 (hipótese nula): a média da perda de massa antes é igual à média após (não há diferença).
- H1 (hipótese alternativa): existe diferença entre as médias.

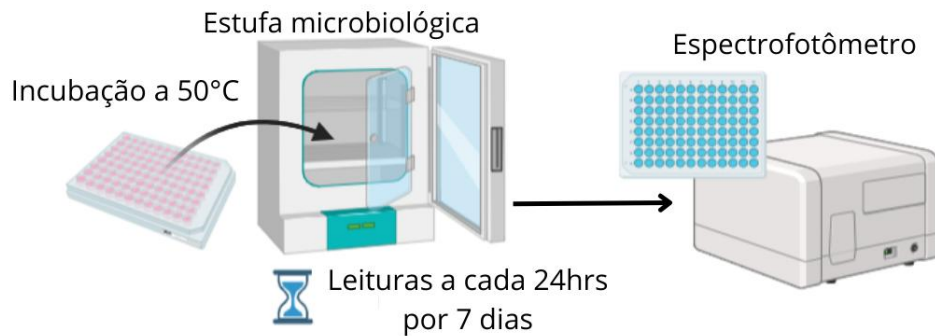
O teste foi realizado considerando nível de significância de $\alpha = 0,1$. Os cálculos foram executados no software Excel, utilizando o procedimento padrão para o teste t pareado. Esse valor foi escolhido para permitir a detecção de possíveis efeitos, considerando a variabilidade natural dos dados e o número reduzido de replicatas, o que é comum em experimentos preliminares (Ali et al., 2023; Lou et al., 2020).

4.8 Análise *Biolog EcoPlate*

A atividade metabólica de duas linhagens bacterianas isoladas, CR1 e CR22, foi avaliada com o sistema *EcoPlate*TM (*Biolog Inc.*, Estados Unidos da América). Cada placa contém 31 fontes de carbono distintas, organizadas em triplicata, além de um controle negativo (sem carbono), totalizando 96 poços. O método baseia-se na redução de um corante redox (tetrazólio violeta), que é convertida em um composto violeta (formazano) em resposta à atividade

metabólica bacteriana. A intensidade da coloração é diretamente proporcional à capacidade da bactéria de metabolizar o substrato presente no poço, análise ilustrada na figura 8.

Figura 8- Fluxograma ilustrativo da análise da EcoPlate



Fonte: Autoria própria.

4.8.1 Preparação das culturas bacterianas

As cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em meio *Terrific Broth*, com 25 mL de meio por tubo Falcon de 50 mL, totalizando 2 tubos por linhagem. As culturas foram incubadas a 50 °C por 24 horas em estufa tipo shaker (SOLAB SL-222, Brasil), com agitação orbital contínua, para promover o crescimento aeróbio das bactérias. Após o período de incubação, os cultivos foram centrifugados a 6000 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Os pellets bacterianos obtidos foram ressuspensos em água ultrapura autoclavada. Em seguida, foi realizada a calibração da densidade celular utilizando um espectrofotômetro UV-visível (*Thermo Fisher Scientific Genesys 50*, Estados Unidos da América) a 600 nm, diluindo as colônias na mesma solução até atingir uma OD de 0,1 (correspondente a uma densidade celular de 1×10^5), de acordo com o manual da empresa *BiologEcoPlate* (<https://www.biolog.com/product-literature/ecoplate-instructions-for-use/>).

4.8.2 Inoculação e incubação das placas

Após o ajuste da OD, 100 µL da suspensão bacteriana foram inoculados em cada poço das placas *EcoPlate*, sendo que cada linhagem foi avaliada individualmente, com placas exclusivas. As placas foram incubadas a 50 °C por 144 horas (6 dias). As leituras espectrofotométricas foram realizadas diariamente utilizando o leitor de microplacas Tecan INFINITE F200 (Tecan Austria GmbH 5082, Áustria), com intervalo de 24 horas (0h, 24h, 48h,

72h, 96h, 120h e 144h), utilizando microplaca leitor de absorvância nos comprimentos de onda de 590 nm e 750 nm.

4.8.3 Correção e normalização dos dados

As leituras obtidas em 750 nm foram utilizadas para correção de turbidez e de absorção de fundo, sendo subtraídas das leituras a 590 nm ($Abs_{590} - Abs_{750}$). Em seguida, os valores do controle negativo (sem substrato) foram subtraídos dos demais poços, considerando-se os valores correspondentes a cada tempo de incubação. Posteriormente, os dados foram normalizados e calculados a média e o desvio padrão das triplicatas de cada substrato (Sofó; Ricciuti, 2019).

4.8.4 Análise qualitativa e construção de *heatmap*

Com os dados processados, foram gerados *heatmaps* no *Microsoft Excel*, permitindo a visualização da variação temporal da atividade metabólica de cada linhagem bacteriana diante das diferentes fontes de carbono. As escalas de cores foram ajustadas para representar, de forma proporcional, a intensidade da resposta metabólica, em que cores mais intensas indicavam maior atividade.

Além da visualização gráfica, foi aplicada uma categorização simbólica para descrever qualitativamente o nível de resposta microbiana, com base em um ponto de corte de 0,10 unidades de absorvância. Esse limiar foi adotado com base na literatura, especialmente no protocolo padronizado proposto que estabelece esse valor como suficiente para distinguir atividade metabólica real de variações (Sofó; Ricciuti, 2019). Essa fórmula foi aplicada às leituras de cada substrato ao longo do tempo, permitindo a classificação conforme os seguintes critérios:

- a) “+++” = ≥ 5 substratos com absorvância $> 0,10$;
- b) “++” = 3 a 4 substratos com absorvância $> 0,10$;
- c) “+” = 1 a 2 substratos com absorvância $> 0,10$;
- d) “NULO” = substrato com absorvância $< 0,10$.

Esse sistema qualitativo foi utilizado como complemento à análise gráfica, permitindo destacar tendências específicas de consumo de substratos por cada linhagem bacteriana.

4.9 Sequenciamento Global e Bioinformática

A extração de DNA para sequenciamento das bactérias CR1 e CR22 foi realizada utilizando o *Kit Qiagen DNeasy PowerSoil*, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A purificação do DNA foi realizada com o *Kit Power Clean® DNA Clean-Up (MoBio Laboratories, Estados Unidos da América)*. Posteriormente, as amostras purificadas de DNA foram enviadas à empresa *Macrogen, Inc.*, para o sequenciamento. O sequenciamento do genoma completo das amostras bacterianas foi conduzido com a biblioteca *TruSeq DNA Nano 350 bp* e a plataforma de sequenciamento *NovaSeq*, resultando em aproximadamente 2 gigabytes de dados por amostra, com leituras pareadas de 150 pares de bases cada (Roman et al., 2024).

O sequenciamento foi realizado na plataforma *Illumina NovaSeq*, conforme os protocolos recomendados pelo fabricante. A construção da biblioteca incluiu a preparação de extremidades pareadas, seguida do sequenciamento. Após o sequenciamento, as leituras foram filtradas e aparadas para remoção de adaptadores e sequências de baixa qualidade, utilizando o *software Trimmomatic* (Bolger; Lohse; Usadel, 2014) com as configurações padrão. As sequências de alta qualidade foram, então, montadas de novo com o *SPAdes* (Bankevich et al., 2012). A avaliação das métricas de montagem, completude e quimerismo foi realizada com o *QUAST* (Gurevich et al., 2013) enquanto o *BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs)* foi utilizado para avaliar a completude do genoma e a qualidade das montagens (Simão et al., 2015).

4.9.1 Identificação de Enzimas Degradoras de Plástico nos genomas

Para realizar a anotação e a previsão automáticas dos genes, inicialmente, foi utilizado o *PROKKA* (Seemann, 2014), ferramenta amplamente empregada na análise genômica. A partir desta anotação, a análise foi direcionada à identificação de domínios proteicos relacionados à degradação plástica, com foco nas famílias de proteínas presentes nos bancos de dados *PFAM* (Buchholz et al., 2022; Roman et al., 2024). Especificamente, foram investigadas famílias de proteínas que apresentam atividades em ligações tipo C-C e C-O.

4.10 Pré-tratamento oxidativo avançado em PEBD

4.10.1 Limpeza Pré-Oxidação e Pós Cultivo

Os polímeros foram higienizados em frascos do tipo Erlenmeyer contendo solução de SDS a 2% (w/v). O sistema foi submetido à agitação em incubadora shaker (SOLAB SL-222, Brasil), operando a 50 °C e a 150 rpm, durante 4 horas. Em seguida, os materiais foram enxaguados com água ultrapura (Milli-Q) aquecida a 50 °C e, posteriormente, secos em estufa microbiológica (*Ethik Technology* 410-2D, Brasil), mantida a 50 °C, por 12 horas (Harshvardhan; Jha, 2013).

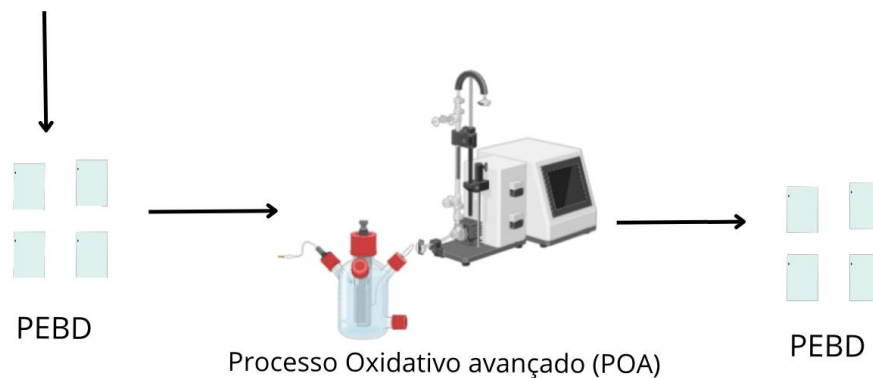
4.10.2 Oxidação Avançada por Ozônio e Peróxido de Hidrogênio

Esta metodologia é uma adaptação do procedimento descrito no artigo “*Ozonation facilitates the aging and mineralization of polyethylene microplastics from water: Behavior, mechanisms, and pathways*”(Hu; Lim; Hu, 2023). A oxidação avançada foi conduzida em bateladas com duração total de 8 horas, em frasco lavador de gás com placa porosa. Cada ensaio foi realizado com 250 mL de água ultrapura (Milli-Q), com pH 7,0. Adicionou-se 1,0 g do polímero PEBD a cada batelada, ilustrado na Figura 9.

Figura 9- Fluxograma ilustrativo do pré-tratamento

Limpeza:

- Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 2%;
- Secagem *overnight*.



Fonte: Autoria própria.

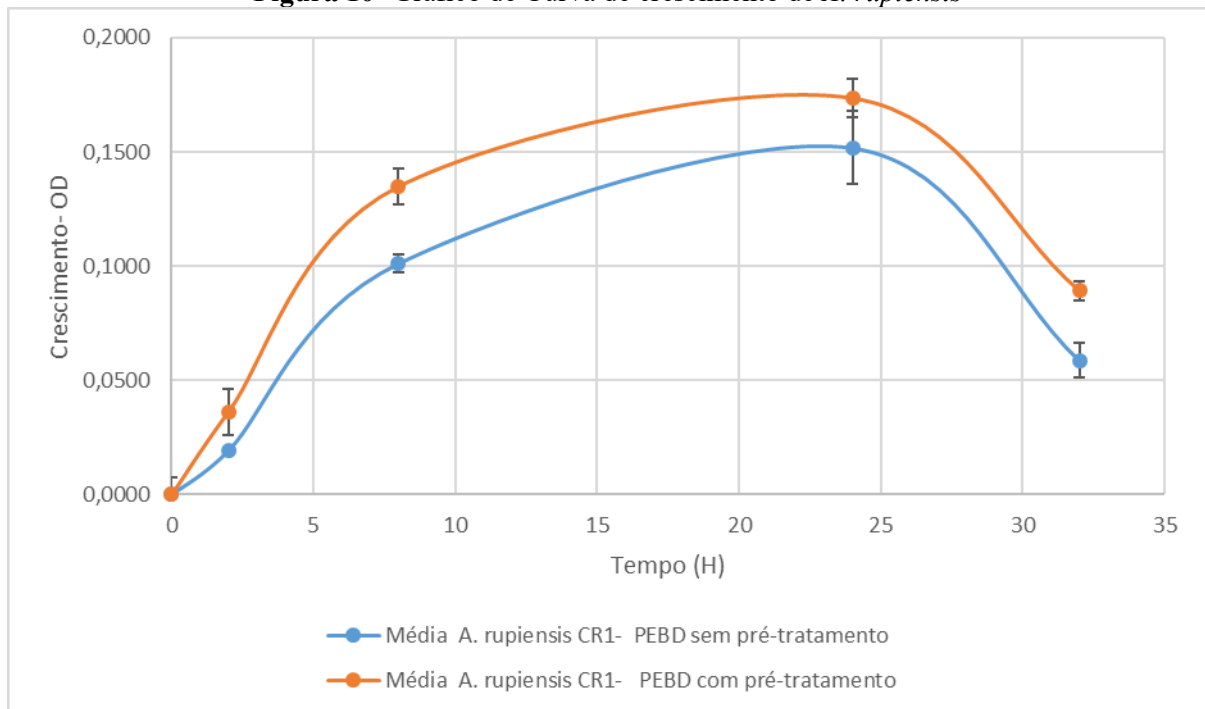
No início e a cada 2 horas de experimento, foi introduzido peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na quantidade necessária para atingir uma concentração de $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, a fim de manter a efetividade do processo oxidativo ao longo do tempo de reação. O sistema foi mantido à temperatura constante de $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. O gás ozônio, gerado por um ozonizador da marca *My Ozone*-modelo P3, alimentado com oxigênio hospitalar de alta pureza, foi continuamente borbulhado no meio reacional, que, após 30 minutos de borbulhamento, atingiu a concentração de ozônio dissolvido de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$.

5 RESULTADOS E DISCUÇÕES DA LINHAGEM *A. RUPIENSIS*

5.1 Curva de crescimento CR1

A Figura 10 mostra as curvas de crescimento da bactéria *A. rupsiensis* cultivada em plástico PEBD, com e sem pré-tratamento. Observa-se que ambas as culturas apresentaram um padrão de crescimento semelhante. A cultura com PE pré-tratado demonstra um aumento mais acentuado na OD. Esse comportamento pode indicar que o pré-tratamento do PEBD facilitou a adesão inicial da bactéria ao plástico, acelerando a fase de adaptação (fase *lag*) e promovendo um crescimento mais robusto na fase logarítmica.

Figura 10- Gráfico de Curva de crescimento de *A. rupsiensis*



Legenda: Curva de crescimento de *A. rupsiensis* obtida em meio mínimo com filme plástico de PEBD com e sem pré-tratamento. As medições foram realizadas por meio de leitura de densidade óptica a 600 nm (OD600) em triplicata, o cultivo foi conduzido a 50 °C.

Fonte: Autoria própria.

Após as 24 horas, observa-se uma diminuição na OD em ambos os grupos e o declínio da população bacteriana, possivelmente devido ao esgotamento de nutrientes. Os resultados obtidos nas curvas de crescimento para CR1 mostraram que a fase exponencial ocorreu de maneira mais acentuada nas primeiras 10 a 24 horas, coincidindo com o padrão observado por autores como (Mishra et al., 2024), que relataram taxas máximas de crescimento específico (μ) logo nas primeiras horas (12 a 24 horas), seguidas de uma queda na fase estacionária. A análise

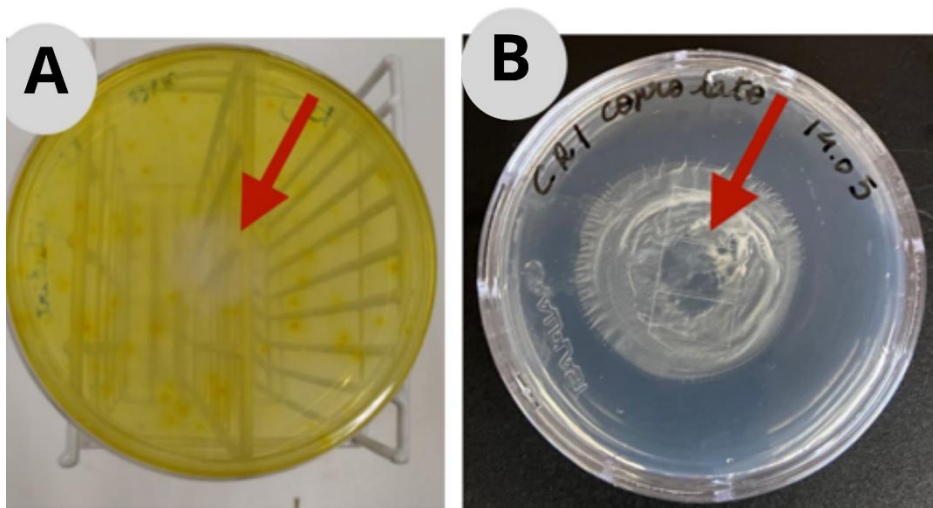
demonstra que as temperaturas ótimas (55 °C, 50 °C e 45 °C) promoveram um crescimento mais rápido. Esse comportamento é consistente com as características termofílicas de *Anoxybacillus sp.*, sugerindo que os dados estão em conformidade com os padrões descritos na literatura (Mishra et al., 2024).

O pré-tratamento oxidativo do PEBD modifica a estrutura química do polímero, rompendo cadeias e introduzindo grupos funcionais como carbonilas e hidroxilas. Essas alterações reduzem a cristalinidade e aumentam a hidrofílicoidade da superfície, facilitando a interação com enzimas microbianas e promovendo maior adesão celular. Como resultado, cria-se um ambiente mais favorável ao crescimento bacteriano e ao início da degradação do material plástico. Esses efeitos estão em concordância com estudos anteriores que demonstram que métodos de oxidação avançada podem aumentar a biodegradabilidade de polímeros sintéticos ao expor mais pontos ativos e tornar a matriz polimérica menos resistente à ação microbiana. (Hu; Lim; Hu, 2023; Oh; Stache, 2024).

5.2 Avaliação degradação “Screening” CR1

Durante os ensaios em meios contendo tributirina e PCL, foi possível observar, na Figura 11, a formação de halos de clareamento ao redor das colônias bacterianas. Esse fenômeno é indicativo da ação de enzimas hidrolíticas, capazes de degradar substratos contendo ligações ésteres.

Figura 11- Avaliação degradação *Screening* *A. ruyiensis*



Legenda: Avaliação da degradação de tributirina (A) e PCL (B) em meio sólido contendo M9 suplementado com 0,1% de glicose e 0,1%.

Fonte: Autoria própria.

A formação dos halos na tributirina (Figura 11-A), especialmente após a aplicação do corante *Fast Garnet*, evidencia a clivagem enzimática das ligações éster, resultando na liberação de ácidos graxos. Essa liberação altera a transparência do meio, tornando visíveis zonas de clareamento ao redor das colônias (Samad et al., 1989). Dessa forma, a presença de halos pode ser interpretada como indicativa da produção e secreção de lipases pelas linhagens estudadas.

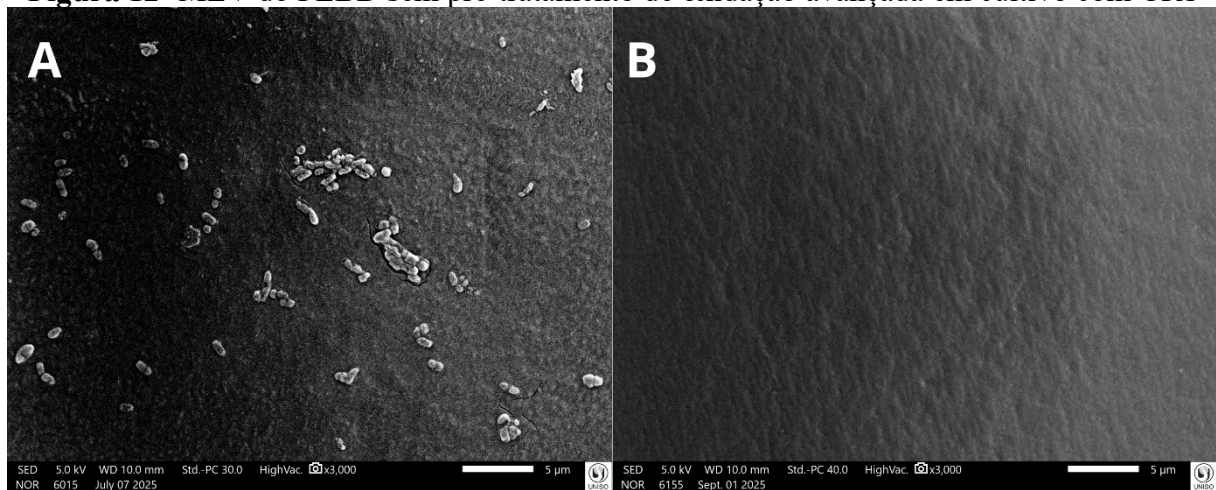
Na Figura 11-B, PCL, observa-se a formação de um halo clareado no centro da placa, associado a atividades de enzimas, como esterases (Al Hosni; Pittman; Robson, 2019; Feng et al., 2020).

5.3 MEV

5.3.1 MEV do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1

As imagens de MEV (Figura 12) mostram a superfície do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada, exposta à bactéria *A. rupiensis* (Figura 12A), bem como seus respectivos controles (Figura 12B).

Figura 12- MEV do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1



Legenda: MEV da superfície do PEBD: (A) superfície do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada, em cultivo da bactéria *A. rupiensis*, com 5 µm; (B) controle sem bactéria, superfície do PEBD, sem pré-tratamento de oxidação avançada, com 5 µm.

Fonte: Autoria própria.

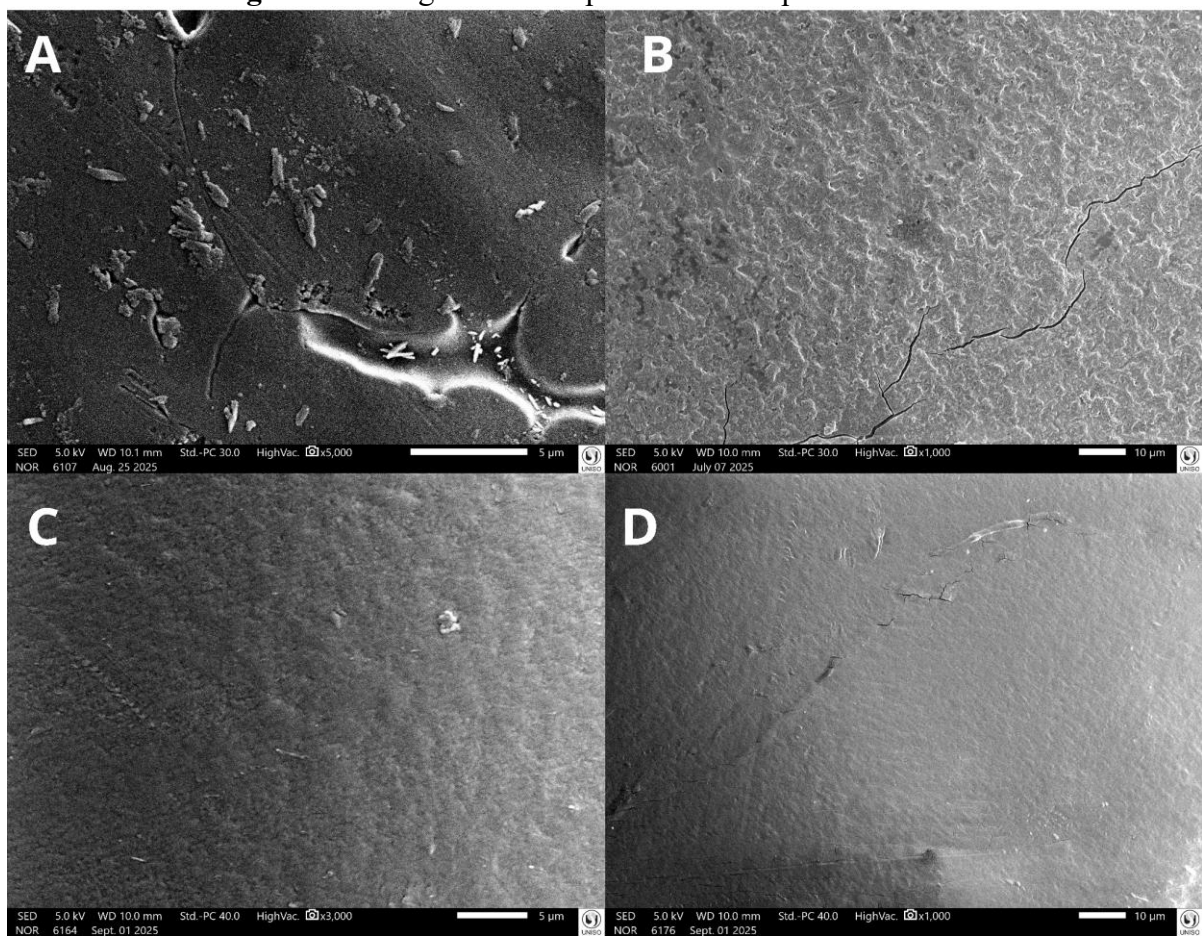
O painel A, com magnificação de 5 µm, reforça a presença de agrupamentos celulares na superfície, sugerindo uma etapa de colonização. Ainda que a superfície do PEBD permaneça relativamente uniforme, a presença bacteriana indica que, mesmo sem tratamento prévio, *A. rupiensis* foi capaz de aderir ao substrato hidrofóbico.

Em contraste, o painel B controle, representa o controle sem exposição bacteriana, apresentando superfícies contínuas, lisas e homogêneas, sem a presença de estruturas celulares ou sinais evidentes de degradação.

Essas características confirmam a estabilidade morfológica do PEBD na ausência de microrganismos e de agentes oxidantes, mantendo sua baixa rugosidade e, portanto, menor propensão à colonização microbiana (Kumar Sen; Raut, 2015).

5.3.2 MEV do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1

Figura 13- Imagens obtidas por MEV da superfície de PEBD



Legenda: (A) Superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada e cultivada com *A. rupiensis* (escala 5 μm); (B) Superfície de PEBD com pré-tratamento e cultivo com *A. rupiensis* (escala 10 μm); (C) Controle sem bactéria: superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada (escala 5 μm); (D) Controle sem bactéria: superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada (escala 10 μm).

Fonte: Autoria própria.

A Figura 13 apresenta micrografias obtidas por MEV, ilustrando os efeitos da exposição da bactéria *A. rupiensis* sobre filmes de PEBD, previamente submetidos a pré-tratamento de oxidação avançada. A análise permite comparar a morfologia superficial do polímero entre as amostras tratadas com a bactéria e os respectivos controles.

Os painéis A e B (Figura 13A e 13B) representam a mesma amostra de PEBD oxidado exposta à bactéria, observada em diferentes ampliações. No painel A, observa-se uma superfície bastante alterada, com fissuras profundas, sulcos irregulares e áreas de descontinuidade, indicativas de degradação localizada do polímero. Também são visíveis estruturas celulares distribuídas ao longo da superfície polimérica, frequentemente associadas à presença de resíduos extracelulares, possivelmente derivados da matriz da bactéria. Já no painel B, observa-se uma rede de microfissuras e alterações topográficas, o que fornece uma visão geral da extensão das modificações promovidas pela colonização bacteriana.

Em contraste, os painéis C e D (Figura 13C e 13D) são amostras-controle, compostas por PEBD oxidado, mas não expostas à bactéria. As superfícies observadas apresentam-se lisamente contínuas, homogêneas e sem sinais evidentes de colonização.

O material submetido ao pré-tratamento de oxidação avançada (Figura 13A e 13B) apresenta aumento discreto da rugosidade superficial, com a presença de irregularidades, fissuras e áreas de maior heterogeneidade quando comparado ao controle não tratado, que se mostra mais homogêneo e com superfície relativamente lisa. Esse aumento de rugosidade pode estar associado à introdução de grupos polares na superfície do polímero, indicando maior hidrofilicidade do material após o pré-tratamento. Tais modificações superficiais favorecem a interação com microrganismos, levantando a hipótese de que a adesão observada de *A. rupiensis* possa ocorrer não apenas por interações químicas, mas também por ancoragem física facilitada pela topografia superficial do polímero.

Esses achados indicam que a combinação de pré-oxidação química e ação de *A. rupiensis* pode ser uma abordagem promissora para iniciar a degradação de PE em ambientes naturais ou controlados.

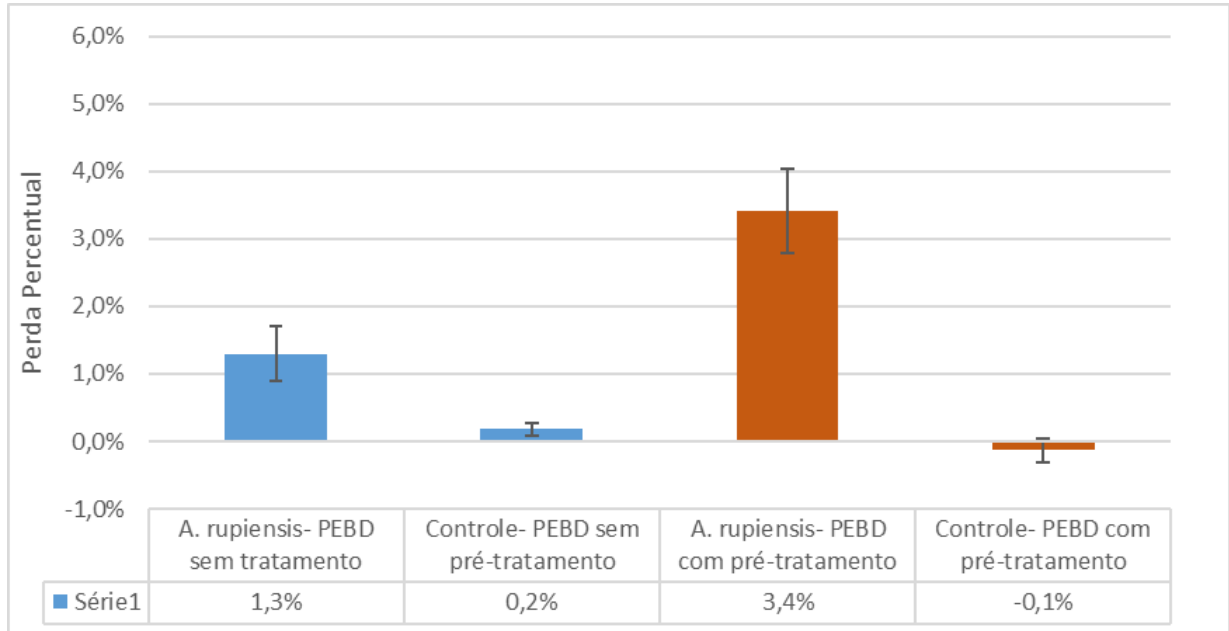
5.4 Perda percentual de massa de PEBD

O isolado bacteriano *A. rupiensis* demonstrou capacidade relativamente limitada de degradação do PE sem pré-tratamento, com perda de massa de $1,3 \pm 0,4\%$ ao final do período experimental (Figura 14). As amostras de PEBD analisadas no cultivo da CR1, a massa inicial do fragmento foi de 0,1184 g e a massa final, após o período de 90 dias de incubação, foi de 0,1168 g, representando uma perda absoluta de 0,0016 g. Essa variação equivale a uma redução de aproximadamente 1,3% na massa do material.

O controle negativo, composto apenas pelo polímero incubado nas mesmas condições, mas sem microrganismos, não apresentou variações significativas de massa, confirmando que

a perda observada nos tratamentos experimentais é atribuída exclusivamente à atividade microbiana (Figura 14).

Figura 14- Percentual de perda de massa do PEBD



Legenda: Percentual de perda de massa do PEBD após 90 dias de cultivo. Sem pré-tratamento, o cultivo com CR1 apresentou perda de $1,3 \pm 0,4\%$, sem alteração no controle negativo ($\alpha = 0,1$). Com pré-tratamento, o cultivo com *A. rupiensis* apresentou perda de $3,4 \pm 0,6\%$, também sem alteração no controle negativo ($\alpha = 0,05$) (Cohen, 2013).

Fonte: Autoria própria.

Um estudo conduzido por Tao et al. (2023), com *Rhodococcus sp.*, isolado de plástico envelhecido, apresentou cerca de 1% de perda de massa em PE após 30 dias de incubação, evidenciada por alterações químicas e morfológicas no polímero.

Já no cultivo do PEBD pré-tratado, a diferença corresponde uma perda de 0,0026 g, equivalente a uma redução de 3,4% na massa do material. Esse valor é consideravelmente maior do que a média geral obtida nos demais ensaios ($1,3\% \pm 0,4\%$, da Figura 14), o que indica maior eficiência de degradação nessa amostra da CR1. A maior perda de massa pode estar relacionada ao efeito do pré-tratamento oxidativo, que, ao tornar o polímero mais acessível à ação microbiana, pode ter favorecido a biodeterioração do PEBD.

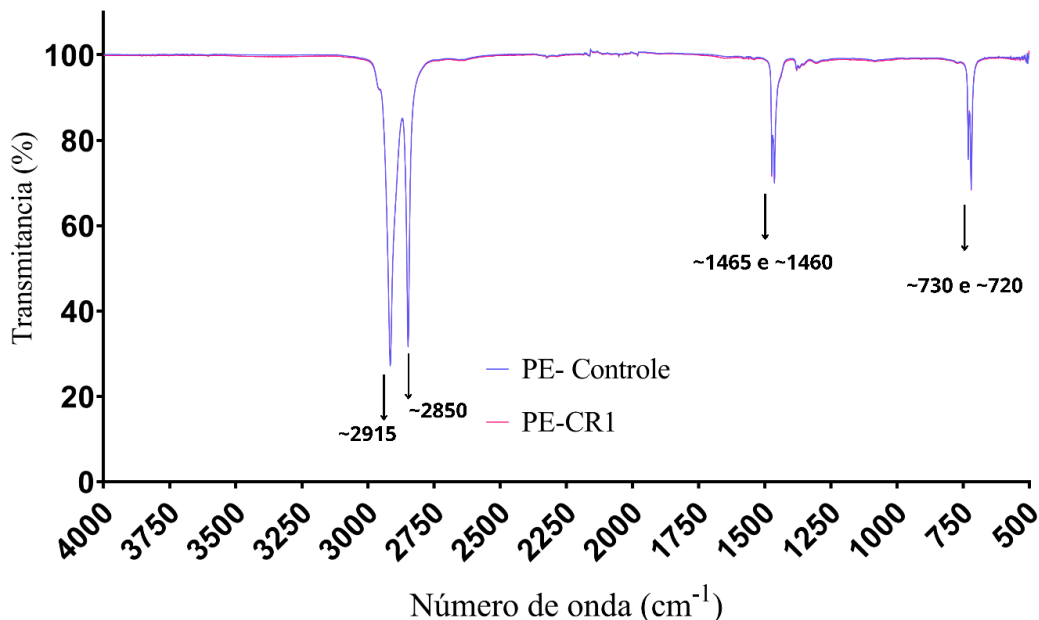
Estudos prévios também indicam que o pré-tratamento oxidativo pode aumentar significativamente a biodegradabilidade do PE, Mohammadi, Moussavi e Rezaei, (2022) relataram 22,5 % de perda de massa em filmes de PE tratados por um consórcio bacteriano produtor de peroxidase em presença contínua de H_2O_2 durante 12 meses.

5.5 FTIR

5.5.1 FTIR do PEBD sem pré-tratamento e utilizado em cultivos com CR1

O FTIR foi empregado para investigar possíveis alterações químicas na matriz polimérica do PEBD após exposição ao microrganismo *A. rupiensis*, em condições do PEBD sem tratamento de oxidação avançada. A Figura 15 apresenta os espectros de transmitância obtidos para as amostras controle (PE-Controle), não expostas ao microrganismo, e para as amostras de PEBD submetidas ao cultivo com CR1 (PE-CR1).

Figura 15- FTIR do PEBD e sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1



Legenda: FTIR do plástico PEBD, sem pré-tratamento de oxidação avançada, em cultivo com *A. rupiensis*. A curva em rosa (PE-CR1) representa PEBD cultivado com a cepa *A. rupiensis*, enquanto a curva em lilás representa o PEBD controle, sem bactéria. As setas indicam picos de absorção importantes: ~ 2915 e ~ 2850 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico das ligações C-H dos grupos metileno ($-\text{CH}_2$); ~ 1465 e ~ 1460 cm^{-1} indicam a deformação angular (flexão) dos grupos metileno; e ~ 730 e ~ 720 cm^{-1} estão relacionados às vibrações de torção fora do plano (*rocking*) dos grupos metileno.

Fonte: Autoria própria.

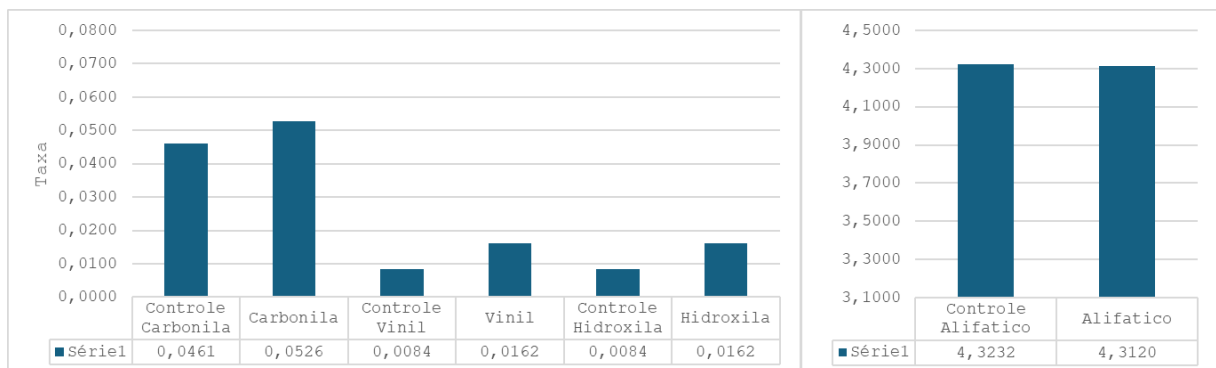
Os espectros de FTIR do PEBD sem pré-tratamento, tanto na condição controle quanto após incubação com a bactéria CR1, apresentaram as bandas características típicas do polietileno, mantendo o perfil espectral esperado para esse tipo de polímero. Na região de 2915 e 2850 cm^{-1} , foram observadas as bandas intensas correspondentes ao estiramento assimétrico e simétrico de C-H, grupos metileno ($-\text{CH}_2$). A presença intensa dessas bandas está relacionada

à integridade da cadeia principal do polímero, essas bandas são marcadores da estrutura alifática do polietileno e demonstram a integridade da cadeia principal do material, como mostrado na Figura 15 (Restrepo-Flórez; Bassi; Thompson, 2014).

As bandas de deformação angular do grupo metileno, observadas próximas de 1465–1460 cm^{-1} e 730–720 cm^{-1} , foram mantidas em ambos os espectros. As bandas em 1465–1460 cm^{-1} correspondem à deformação angular do $-\text{CH}_2-$, enquanto as bandas em 730–720 cm^{-1} estão associadas ao movimento de *rocking* do grupo $-\text{CH}_2-$ e são marcadores característicos das regiões cristalinas do PEBD (Figura 15).

Os espectros analisados apresentam perfis bastante semelhantes entre si, com os picos característicos do PEBD amplamente preservados em ambas as amostras. Corroborando o resultado porcentual de perda de peso baixo, reforçando que a biodegradação do PE sem pré-tratamento foi limitada nas condições experimentais empregadas no presente estudo. Reforça com o que é amplamente descrito na literatura, que o PE apresenta baixa biodegradabilidade em sua forma original (Atanasova et al., 2021; Kumar Sen; Raut, 2015; Zahra et al., 2010).

Figura 16- Índices



Legenda: Gráficos de barras representando os índices espectrais calculados a partir de espectros de FTIR obtidos em duas regiões distintas da mesma amostra de PEBD sem pré-tratamento oxidativo, após cultivo com CR1 e controle. A análise foi conduzida de forma comparativa, avaliando-se a variação relativa das intensidades das bandas características. Ambas as aquisições apresentaram o mesmo padrão espectral para os diferentes grupos funcionais analisados. As colunas correspondem às bandas de carbonila (C=O), vinil (C=C), alifático (C-H) e hidroxila (O-H).

Fonte: Autoria própria.

A Figura 16 dos índices obtida a partir dos espectros de FTIR, mostrou diferenças sutis entre o PEBD incubado com a bactéria CR1 e o controle sem bactéria. Essas diferenças, embora discretas, são consistentes com o início de modificações oxidativas na superfície do polímero, indicando atividade microbiana direcionada à degradação inicial do PEBD.

O índice de carbonila (1715 cm^{-1}) aumentou de 0,0461 no controle para 0,0526 após a incubação com CR1. Esse aumento indica a formação de novos grupos C=O, característicos de

processos oxidativos que representam as etapas iniciais da degradação de polietilenos (Albertsson; Karlsson, 1990; Oh; Stache, 2024; Roman et al., 2024). A oxidação superficial pode resultar da ação enzimática (como peroxidases e oxigenases), que tende a gerar espécies reativas capazes de iniciar esse processo (Pérez-García et al., 2025).

O índice de hidroxila (3340 cm^{-1}) apresentou uma alteração de: 0,0084 no controle para 0,0162 na presença de CR1, praticamente duplicando. Esse aumento é um marcador da formação de grupos -OH , sugerindo que a CR1 favoreceu a fase inicial da oxidação do PEBD. O índice de vinil (1640 cm^{-1}) também apresentou duplicação. O aumento de insaturações é um indicativo de quebra parcial da cadeia polimérica após oxidação. Quanto ao índice alifático (2848 cm^{-1}), observou-se uma redução sutil de 4,3232 para 4,3120 na amostra com CR1. Uma redução discreta neste índice é esperada nos estágios iniciais da degradação do polietileno, onde apenas a camada externa da amostra é afetada (Albertsson; Karlsson, 1990; Syranidou et al., 2023).

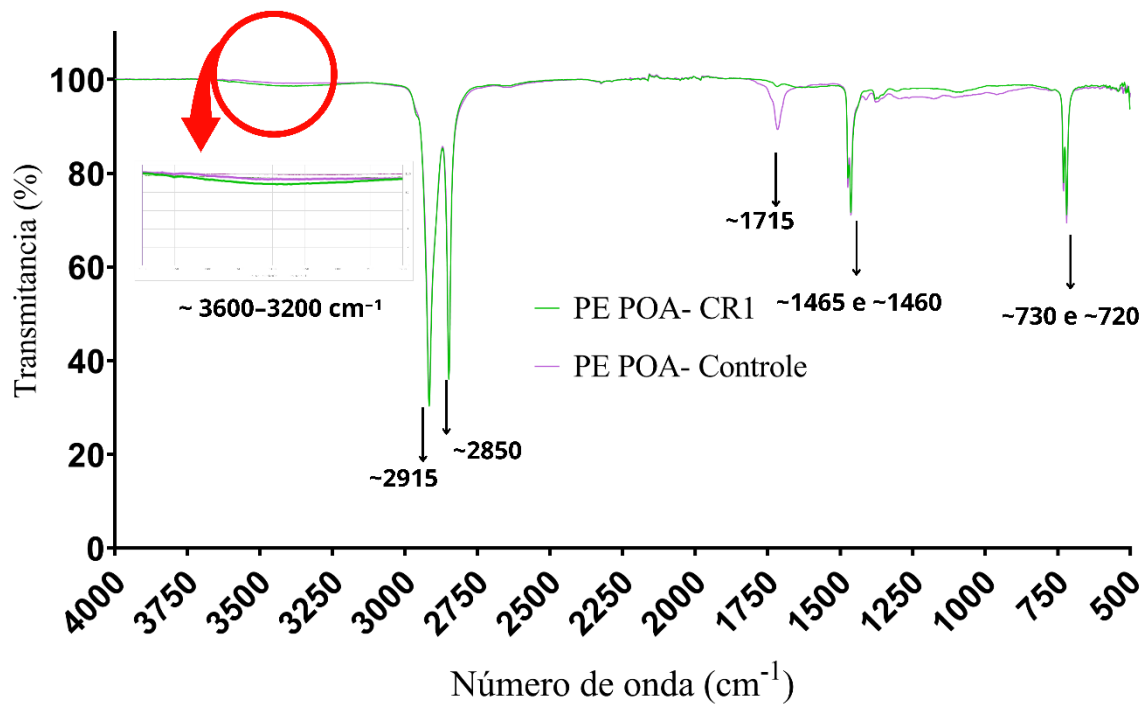
A soma dos efeitos de aumento de hidroxilas, aumento de carbonilas, aumento de insaturações e leve diminuição dos grupos alifáticos, revela um padrão consistente de oxidação inicial.

5.3.2 FTIR do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1

A ação combinada do ozônio e do peróxido de hidrogênio tem sido amplamente relatada como eficaz na introdução de grupos oxigenados, como carbonilas e hidroxilas, na superfície de materiais poliméricos, tornando-os mais suscetíveis a processos subsequentes de degradação (Hu; Lim; Hu, 2023; Oh; Stache, 2024). No espectro do controle, observa-se a presença de uma nova banda, com características atribuídas a grupos funcionais oxigenados, tais como carbonilas (C=O), na região de aproximadamente 1715 cm^{-1} na Figura 17, resultantes do tratamento de oxidação avançada ao qual o polímero foi submetido. Esses grupos funcionais permanecem estáveis no controle, uma vez que a amostra não foi exposta à ação bacteriana (Syranidou et al., 2023)

Há diferença visual no espectro na região de banda larga entre $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, onde se localizam vibrações de estiramento de grupos hidroxila (O-H). Essa banda aparece mais evidente tanto no PEBD incubado com CR1, refletindo grupos oxigenados introduzidos pelo pré-tratamento com ozônio e peróxido.

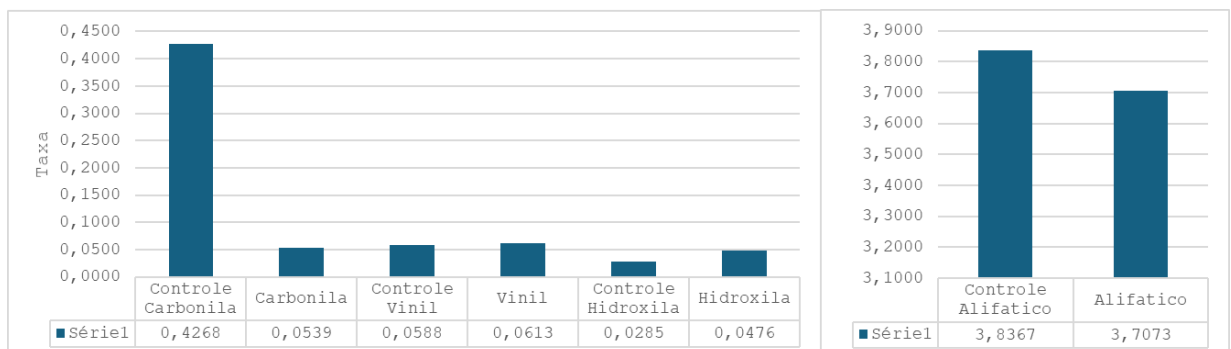
Figura 17- FTIR do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR1



Legenda: FTIR do plástico PEBD com POA em cultivo com *A. rupiensis*. A curva em verde (PE-POA-CR1) representa PEBD submetido ao POA e cultivado com a cepa *A. rupiensis*. A curva em lilás corresponde ao PEBD com POA, sem a presença da bactéria (controle). As setas indicam picos relevantes: ~ 2915 e ~ 2850 cm^{-1} correspondem às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico das ligações C–H dos grupos metileno ($-\text{CH}_2-$); o pico em ~ 1715 cm^{-1} está relacionado à presença de grupos carbonila (C=O), típicos de oxidação do polímero; ~ 1465 e ~ 1460 cm^{-1} indicam a deformação angular (flexão) dos grupos metileno; e ~ 730 e ~ 720 cm^{-1} referem-se às vibrações de torção fora do plano (*rocking*) dos grupos metileno.

Fonte: Autoria própria

Figura 18- Índices



Legenda: Gráficos de barras representando os índices espectrais calculados a partir de espectros de FTIR obtidos em duas regiões distintas da mesma amostra de PEBD com pré-tratamento oxidativo, após cultivo com CR1 e controle. A análise foi conduzida de forma comparativa, avaliando-se a variação relativa das intensidades das bandas características. Ambas as aquisições apresentaram o mesmo padrão espectral para os diferentes grupos funcionais analisados. As colunas correspondem às bandas de carbonila (C=O), vinil (C=C), alifático (C–H) e hidroxila (O–H).

Fonte: Autoria própria.

O índice de carbonila (Figura 18), apresentou valor elevado no controle (0,4268), característico de polímeros previamente oxidados. Após incubação com CR1, o índice caiu para 0,0539, essa diminuição é compatível com o consumo de grupos carbonila pela bactéria como possíveis pontos de ataque enzimático.

O índice de hidroxila, na Figura 18, aumentou de 0,0285 (controle) para 0,0476 após o cultivo com CR1, indicando que a bactéria intensificou a oxidação superficial do PEBD pré-oxidado. Esse aumento demonstra a formação de novos grupos –OH, característica de processos oxidativos. Mesmo em uma superfície já funcionalizada pelo pré-tratamento químico, a CR1 foi capaz de promover acréscimo de hidroxilas, o que sugere continuidade da degradação oxidativa iniciada pelo ozônio e peróxido (Albertsson; Karlsson, 1990).

O índice de vinil aumentou levemente de 0,0588 para 0,0613 após o cultivo com CR1. Esse aumento sugere discreta formação de novas insaturações. Por fim, o índice alifático apresentou redução leve de 3,8367 para 3,7073, indicando diminuição das vibrações CH₂ relativas à região alifática (Albertsson; Karlsson, 1990; Oh; Stache, 2024)

5.6 Biolog Ecoplate

Os resultados obtidos por meio da análise das fontes de carbono assimiladas pela cepa *A. rupiensis.*, utilizando a metodologia EcoPlate™. A partir da leitura das densidades ópticas em múltiplos tempos de incubação (0 a 144 horas), foi possível identificar quais classes de substratos foram preferencialmente metabolizadas, bem como o grau de seletividade ou de versatilidade metabólica de cada cepa.

Essa abordagem avalia a atividade metabólica geral e ajuda a compreender como a cepa responde a diferentes tipos de compostos presentes na placa, incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, polímeros, aminas e compostos fenólicos. O uso combinado de ferramentas visuais (*heatmaps*) e simbólicas (tabela de intensidade com escala “+++” a “nulo”) contribuiu para a interpretação clara dos dados, fornecendo um panorama funcional abrangente.

A cepa CR1 apresentou um perfil metabólico amplamente diversificado, com forte atividade frente aos 31 substratos da placa EcoPlate™. A análise foi realizada com base em leituras espectrofotométricas (OD 590 nm e 750 nm), devidamente corrigidas e normalizadas, seguidas pela visualização em mapas de calor (*heatmaps*) e categorização da intensidade de

metabolização. A diversidade funcional observada indica uma alta capacidade adaptativa e reforça o potencial biotecnológico da linhagem.

Entre os substratos metabolizados com maior intensidade, destacaram-se polímeros, como a α -ciclodextrina e o glicogênio, o que sugere a atuação de enzimas amilolíticas e ciclodextrinases, ilustrado na Tabela 1. Esses resultados corroboram com estudos que descrevem o papel de enzimas termoestáveis na degradação de carboidratos complexos em ambientes aeróbios (Bher et al., 2022).

Tabela 1 Classificação da intensidade da utilização de substratos pela CR1 na EcoPlate

Fonte de carbono	Classificação da intensidade da utilização de substratos
POLÍMEROS	
α -Ciclodextrina	+++
Glicogênio	++
CARBOIDRATOS	
Glicose-1-Fosfato	+
D-Celobiose	++
D-Xilose	+++
i-Eritritol	+
D-Manitol	+++
N-Acetil-D-Glicosamina	++
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	
Éster Metílico do Ácido Pirúvico	+++
Ácido D-Glicosamínico	+++
Ácido γ -Aminobutírico	+
Ácido Itacônico	+++
Ácido α -Cetobutírico	+++
Ácido D-Málico	+++
AMINOÁCIDOS	
L-Serina	+++
L-Treonina	++
Ácido β -Hidroxiglicil-L-Glutâmico	+++
AMINAS	
Feniletilamina	+++

Fonte: Autoria própria.

Também foi observada metabolização significativa de carboidratos, como glicose-1-fosfato e N-acetil-D-glicosamina, indicando a possível ação de enzimas, como fosfoglicomutases e N-acetilglicosaminidases, envolvidas no catabolismo de açúcares fosforilados e de aminoaçúcares derivados da parede celular bacteriana (Garland; Mills, 1991; Insam; Goberna, 2008).

Outros compostos, como D-celobiose, D-xilose, D-manitol e i-eritritol, também foram utilizados, evidenciando a capacidade da linhagem de metabolizar diferentes estruturas de carboidratos (Tabela 1).

No grupo dos ácidos orgânicos, destacaram-se o éster metílico do ácido pirúvico, o ácido D-málico e o ácido itacônico. A metabolização deste último, um composto com propriedades antimicrobianas, capaz de utilizar substratos potencialmente inibitórios (Sriariyanun et al., 2019).

No grupo dos ácidos orgânicos, destacaram-se o éster metílico do ácido pirúvico, o ácido D-málico e o ácido itacônico. A metabolização deste último, um composto com propriedades antimicrobianas, capaz de utilizar substratos potencialmente inibitórios (Sriariyanun et al., 2019).

A linhagem também demonstrou capacidade de metabolizar aminoácidos, como L-serina, L-treonina e o ácido β -hidroxiglicil-L-glutâmico, sugerindo a conversão desses compostos em intermediários centrais, como o piruvato e o 2-oxoglutarato. Essas rotas metabólicas são especialmente relevantes em condições de escassez de carboidratos simples (YU et al., 2021). Além disso, a cepa foi capaz de utilizar a feniletilamina, uma amina aromática com propriedades antimicrobianas, o que reforça seu potencial ecológico e adaptativo (Krysenko; Wohlleben, 2022).

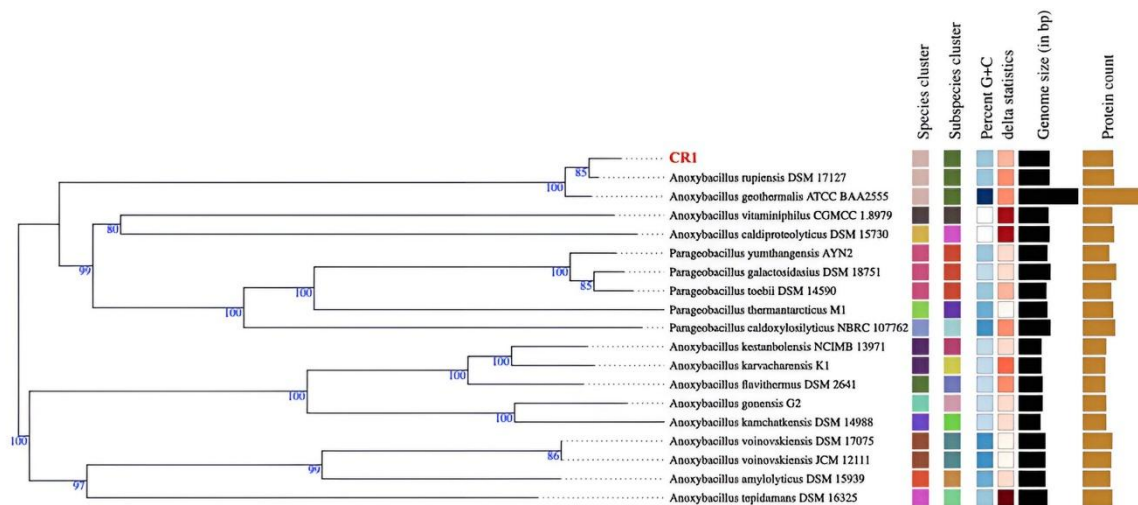
A análise temporal (Tabela 5 em anexo) revelou que a maioria dos substratos começou a ser metabolizada entre 48 e 72 horas, com picos de atividade entre 96 e 120 horas. Polímeros como α -ciclodextrina e Tween 80 apresentaram aumento progressivo na utilização, sugerindo a atuação de enzimas extracelulares como ciclodextrinases e lipases (Gupta; Gupta; Rathi, 2004).

A N-acetil-D-glicosamina foi um dos substratos mais intensamente metabolizados, reforçando a atividade voltada ao catabolismo de aminoaçúcares (Insam; Goberna, 2008). Aminoácidos como L-arginina, L-serina e L-treonina apresentaram maior atividade após 72 horas de incubação.

5.7 Análise filogenética CR1

A sequência obtida foi analisada com a ferramenta BLASTn, no banco de dados NCBI, e apresentou identidade de sequência com espécies do gênero *Anoxybacillus sp* (dado não apresentado). A ANI revelou 99,4% de similaridade com *A. rupiensis* (DSM 17127T), confirmando a classificação taxonômica da cepa.

Figura 19- Análise filogenética



Legenda: Análise filogenômica baseada na comparação de genomas de cepas referência definidas ao nível de espécies e subespécies. Os números nos nós representam valores de suporte Bootstrap, indicando a confiança dos dados preditos. As etiquetas laterais indicam o agrupamento das linhagens em espécies e subespécies, o conteúdo G+C genômico das linhagens, estatísticas delta (semelhança) entre as linhagens, tamanho total do genoma, número total de proteínas preditas. Resultado produzido utilizando a ferramenta TYGS (<https://tygs.dsmz.de>).

Fonte: Autoria própria.

Para uma identificação mais robusta, foi realizada uma análise filogenômica na plataforma TYGS (<https://tygs.dsmz.de>), utilizando genomas de referência e o método de máxima verossimilhança com suporte de bootstrap. Como resultado, a linhagem CR1 foi agrupada com alta confiabilidade com espécies do gênero *Anoxybacillus*, especialmente *A. rupiensis*, confirmando sua identidade como pertencente a essa espécie (Figura 19).

5.8 Caracterização genômica da cepa CR1

O sequenciamento genômico da cepa termofílica CR1 foi conduzido para investigar seu potencial metabólico para a degradação de polímeros sintéticos e compostos aromáticos. Foram obtidas 14,1 milhões de leituras com 150 pares de base (pb), totalizando aproximadamente 2,1 Gbp, com qualidade Q30 superior a 93%. O sequenciamento foi realizado na plataforma *NovaSeq* (*Illumina*).

A montagem do genoma resultou em 86 *contigs*, com N50 de 140.736 pb, totalizando 3.655.966 pb e um conteúdo de GC de 42%. Foram identificados 3.594 genes que codificam proteínas e 82 tRNAs. A qualidade do genoma foi considerada excelente, com completude superior a 99%, evidenciada pela detecção de 105 dos 106 genes essenciais.

A anotação funcional foi realizada com as ferramentas Prokka e InterProScan, permitindo a classificação de 3.118 proteínas (87% do total) em categorias COG. No banco KEGG, foram mapeadas 2.045 proteínas (57% das proteínas preditas), e o banco Pfam indicou a presença de pelo menos um domínio funcional em 86% das sequências (3.074 proteínas). Ao final foram selecionadas 12 enzimas CR1 (Tabela 2).

Tabela 2 Enzimas selecionadas CR1

Lócus do gene	Enzima
KKNLFJLK_00631	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
KKNLFJLK_00705	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
KKNLFJLK_01965	NAD/NADP-dependent betaine aldehyde dehydrogenase
KKNLFJLK_03015	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 1
KKNLFJLK_01157	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
KKNLFJLK_03262	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
KKNLFJLK_01398	ATP-dependent protease ATPase subunit ClpY
KKNLFJLK_01260	3HV_dehydrogenase
KKNLFJLK_01423	3HV_dehydrogenase
KKNLFJLK_02300	PEG_aldehyde_dehydrogenase
KKNLFJLK_02560	3HV_dehydrogenase

Fonte: Autoria própria.

No genoma da cepa CR1, identificaram-se desidrogenases específicas (KKNLFJLK_00631, KKNLFJLK_00705 e KKNLFJLK_03015) que participam da oxidação de álcoois primários, produto da modificação inicial do PE, além de oxidases contendo domínios ATP, como KKNLFJLK_01157, KKNLFJLK_03262 e KKNLFJLK_01298, que contribuem para a geração de espécies reativas de oxigênio (Quadro 3).

Estudos comparativos com outras cepas do gênero *Anoxybacillus* revelaram a presença generalizada de enzimas similares (Tabela 3). Por exemplo, *A. flavithermus*, isolado de ambientes geotermiais na Antártica, apresenta um repertório amplo de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos e estresse oxidativo, incluindo genes para oxidases e desidrogenases (Schultz et al., 2022).

Outro estudo específico sobre *A. rupiensis* TPH1 isolado da fonte termal Tatapani destaca duas azoreductases FMN-dissociadas (AzoRed1 e AzoRed2) com alta afinidade para corantes azo, enzimas estas que possuem estrutura típica com domínios β -sheet e α -hélices, e apresentam potencial para degradação eficiente de compostos aromáticos e poluentes industriais (Patel; Bello; Gupta, 2024).

Quadro 3 Relação enzimática do gênero *Anoxybacillus* com potencial á degradação de polímeros

Enzimas	<i>Anoxybacillus rupiensis</i> (CR1)	Família Anoxybacillaceae	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> (7 cepas LAT)	<i>Anoxybacillus rupiensis</i> TPH1
Desidrogenases	KKNLFJLK_01260, KKNLFJLK_01423, KKNLFJLK_02300 e KKNLFJLK_02560;	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase (WP_091700255); Glutamato sintase beta (WP_091700721)	Genes relacionados a desidrogenases e oxidoreductases presentes, mas sem detalhamento específico	MN-binding NADH azoreductases (AzoRed1 e AzoRed2), com alta afinidade para azoreductase
Oxidases contendo domínios ATP	KKNLFJLK_01157, KKNLFJLK_03262 e KKNLFJLK_01298;	Oxidoreductase dependente de FAD (WP_091704558)	Genes codificadores para oxidases FAD identificados.	Presença de enzimas oxidativa.
Polifenol oxidases e peroxidases	Enzimas envolvidas na oxidação de substratos aromáticos e alifáticos.	Genes relacionados ao grupo oxidoreductases.	Genes relacionados à oxidação de substratos aromáticos e alifáticos.	Atividade oxidativa relacionada à degradação de corantes.
Oxidoreductases	Enzimas atuando em reações redox específicas complementando biodegradação	GNAT family N-acetyltransferase (WP_091705020), potencial oxidoreductase	Presença de genes codificadores de oxidoreductases detectada.	Presença de enzimas reductases importantes para degradação de corantes azo.

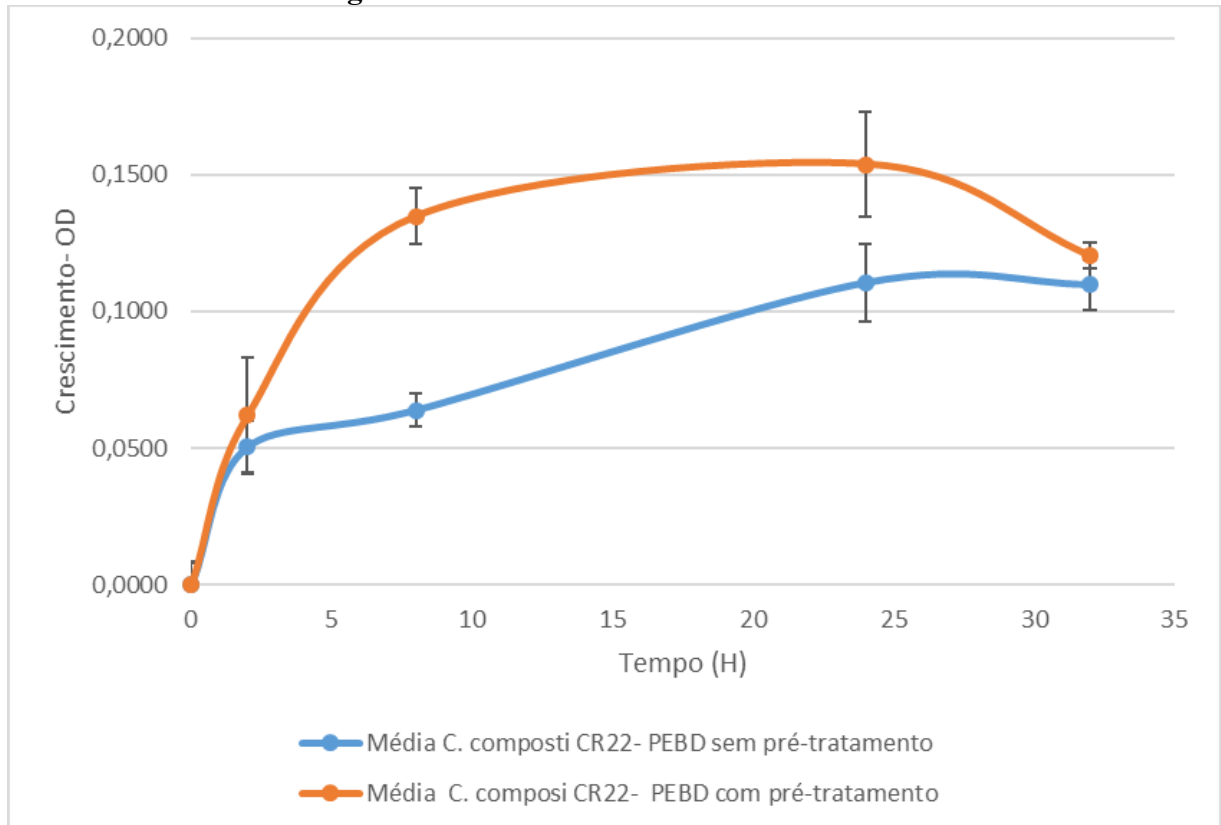
Fonte: Autoria própria.

Dessa forma, a análise combinada dos dados genômicos da cepa CR1 e de outras espécies relacionadas destaca mecanismo para a degradação de polímeros plásticos e compostos aromáticos, centrado em enzimas oxidativas, desidrogenases e oxidoreductases, com potencial para aplicação industrial e ambiental.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES DA LINHAGEM *C. COMPOSTI*

6.1 Curva de crescimento CR22

Figura 20 - Gráfico de Curva de Crescimento



Legenda: Curva de crescimento de *C. composti* obtida em meio mínimo com filme plástico de PEBD com e sem pré-tratamento. As medições foram realizadas por meio de leitura de densidade óptica a 600 nm (OD600) em triplicata, o cultivo foi conduzido a 50 °C.

Fonte: Autoria própria.

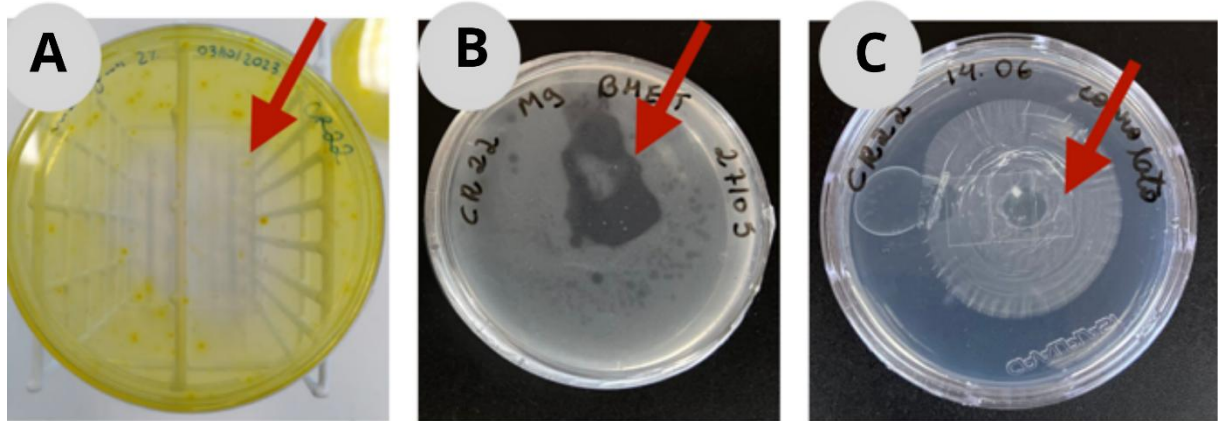
A curva de crescimento da linhagem CR22, apresentada no gráfico da Figura 20, revela diferença na OD das culturas com e sem pré-tratamento ao longo do tempo. Depois das primeiras horas de análise, o cultivo com PE pré-tratado apresentou crescimento celular superior ao do grupo sem pré-tratamento, evidenciado por valores médios de OD mais altos.

Entre 10 e 20 horas, a taxa de crescimento na amostra com PEBD pré-tratado manteve-se consistentemente maior, sugerindo que a ozonização potencializa a fase logarítmica da bactéria. O pico de crescimento ocorreu por volta das 24 horas em ambos os grupos, seguido de uma tendência de declínio na densidade óptica, indicando o início da fase estacionária ou de declínio.

6.2 Avaliação degradação “Screening” *C. CR22*

No painel A (Figura 21A), observa-se a formação de um halo transparente em meio suplementado com tributirina, o que indica atividade lipolítica. Essa degradação reduz a turbidez na região ao redor da colônia, formando um halo claro indicativo de atividade enzimática de lipases, e é visível após coloração com *Fast Garnet* (Samad et al., 1989).

Figura 21- Avaliação degradação *Screening* CR22



Legenda: Avaliação da degradação de tributirina (A), BHET (B) e PCL (C) em meio sólido contendo M9 suplementado com 0,1% de glicose e 0,1%.

Fonte: Autoria própria.

No painel B (Figura 21B), a formação de uma zona clara em meio contendo BHET, um intermediário na degradação do PET, indica a capacidade da linhagem de atuar sobre ligações ésteres aromáticos. Esse tipo de atividade enzimática é associado a mecanismos específicos envolvidos na biorreciclagem de plásticos de difícil degradação (Sriariyanun et al., 2019).

No painel C (Figura 21C), o halo de degradação ao redor da colônia cultivada em meio com PCL, confirma a atuação de enzimas hidrolíticas, como esterases, capazes de romper ligações éster do polímero (Al Hosni; Pittman; Robson, 2019; Feng et al., 2020).

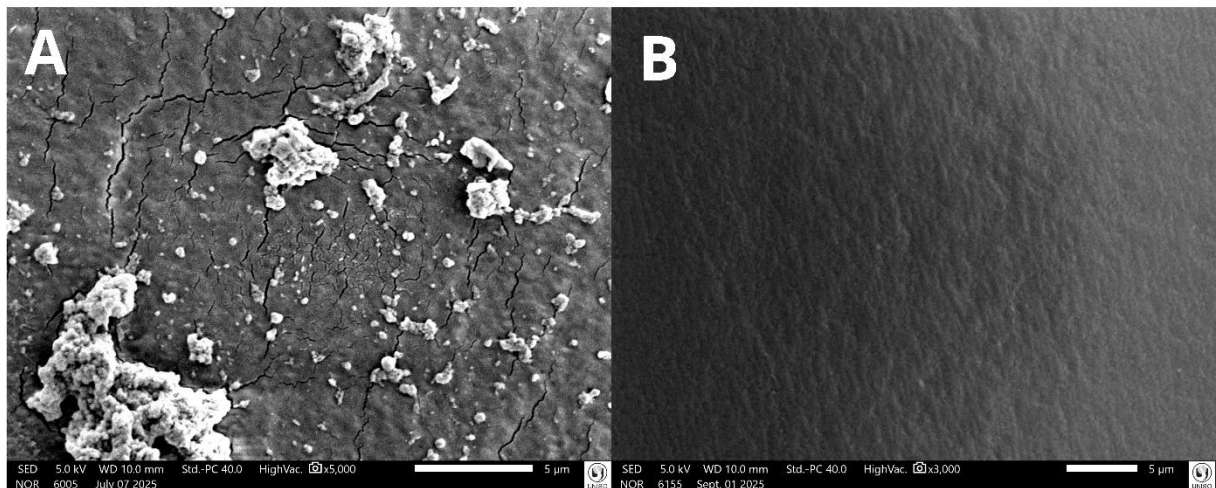
Esses dados, em conjunto, sugerem que a linhagem CR22 apresenta versatilidade enzimática para atuar sobre diferentes substratos, de lipídeos simples a poliésteres sintéticos, destacando seu valor biotecnológico em estratégias voltadas à biodegradação e reciclagem de resíduos plásticos.

6.3 MEV

6.3.1 MEV do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22

As imagens de MEV (Figura 22) mostram as alterações morfológicas na superfície do PEBD exposto à ação da cepa *C. composti*, sem pré-tratamento. No painel A (Figura 22), observa-se a presença de uma estrutura semelhante a fissuras cercada por estruturas celulares, possivelmente associadas à matriz extracelular como biofilme. Esse padrão pode indicar um ponto de colonização bacteriana ou início de degradação localizada do polímero.

Figura 22- MEV da superfície do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22



Legenda: (A) superfície do PEBD sem pré-tratamento em cultivo da bactéria *C. composti* com 5µm; (B) Controle sem bactéria, superfície do PEBD sem pré-tratamento com 5µm.

Fonte: Autoria própria.

No controle B (Figura 22B), que representa a superfície de PEBD nas mesmas condições, porém sem inoculação bacteriana, não se observam alterações estruturais relevantes. As superfícies permanecem lisas e homogêneas, o que reforça a ideia de que as modificações detectadas nas amostras inoculadas estão associadas à atividade biológica da cepa *C. composti*.

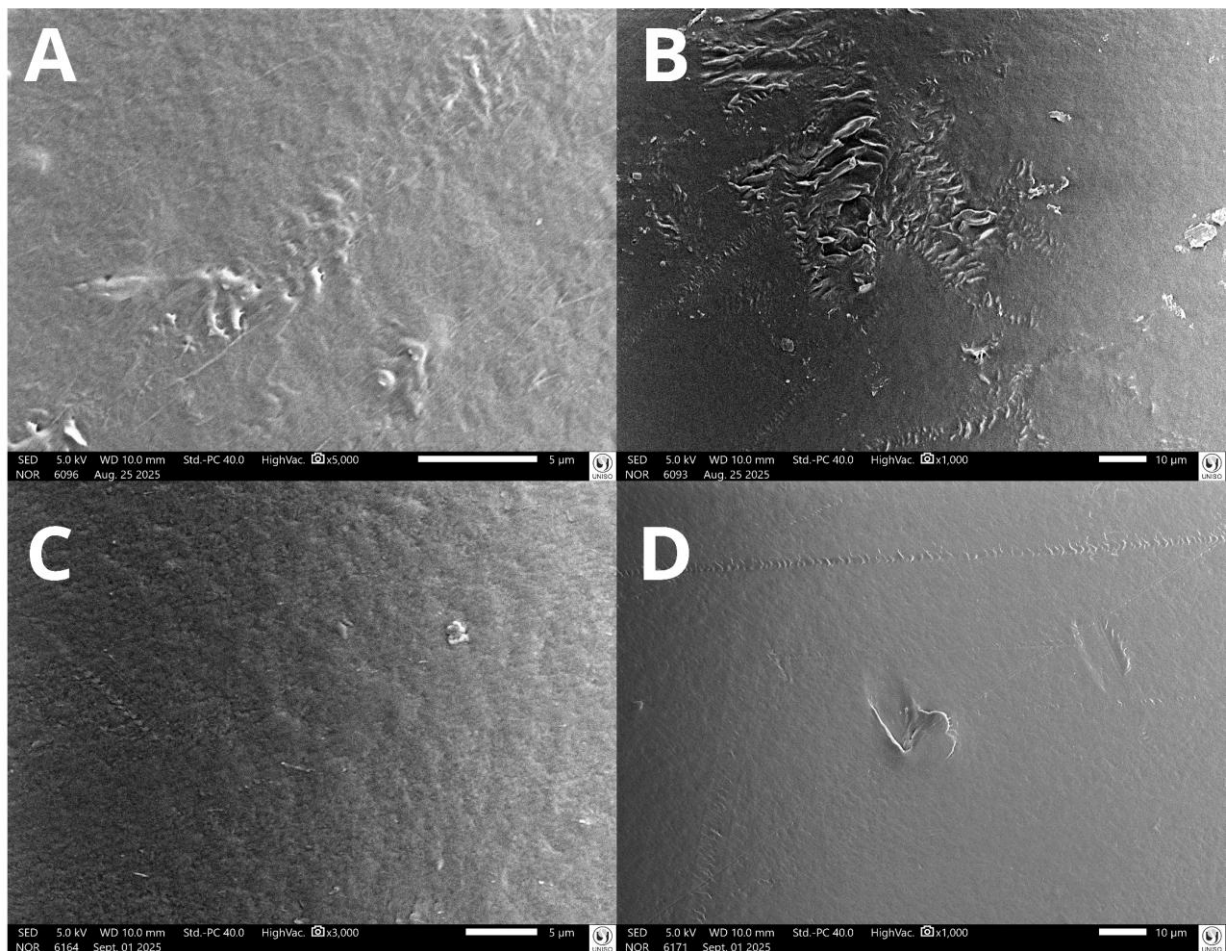
A presença de danos físicos localizados, como microfissuras, observados no painel A, sugere que, mesmo na ausência de pré-tratamento, a cepa foi capaz de produzir biofilme e interagir com o substrato hidrofóbico, promovendo adesão inicial e modificações na estrutura superficial do polímero. Esses resultados se assemelham aos obtidos por (Zhang et al., 2024), que observaram padrões semelhantes de degradação em filmes de PE expostos a *Microbacterium esteraromaticum*, destacando a importância de mecanismos como produção de

biossurfactantes, enzimas oxidativas ou secreção de matriz extracelular na interação microrganismo-polímero.

6.3.2 MEV do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22

As imagens obtidas por MEV (Figura 23) mostram a morfologia superficial do PEBD previamente submetido a tratamento de oxidação avançada, com e sem exposição à bactéria CR22.

Figura 23- MEV da superfície do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada, em cultivo com CR22 e controle.



Legenda: (A) Superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada, cultivada com *C. composti* (escala 5 μm); (B) Superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada, cultivada com *C. composti* (escala 10 μm); (C) Controle sem bactéria: superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada (escala 5 μm); (D) Controle sem bactéria: superfície de PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada (escala 10 μm).

Fonte: Autoria própria.

No painel A (Figura 23), observa-se uma superfície com aspecto irregular, apresentando fissuras e sulcos que sugerem alterações estruturais associadas tanto ao pré-tratamento quanto à ação microbiana. No painel B, essas alterações tornam-se ainda mais evidentes devido a

magnificação maior, com uma topografia mais desorganizada e rugosa, possivelmente relacionada à colonização bacteriana e à atividade enzimática sobre o polímero.

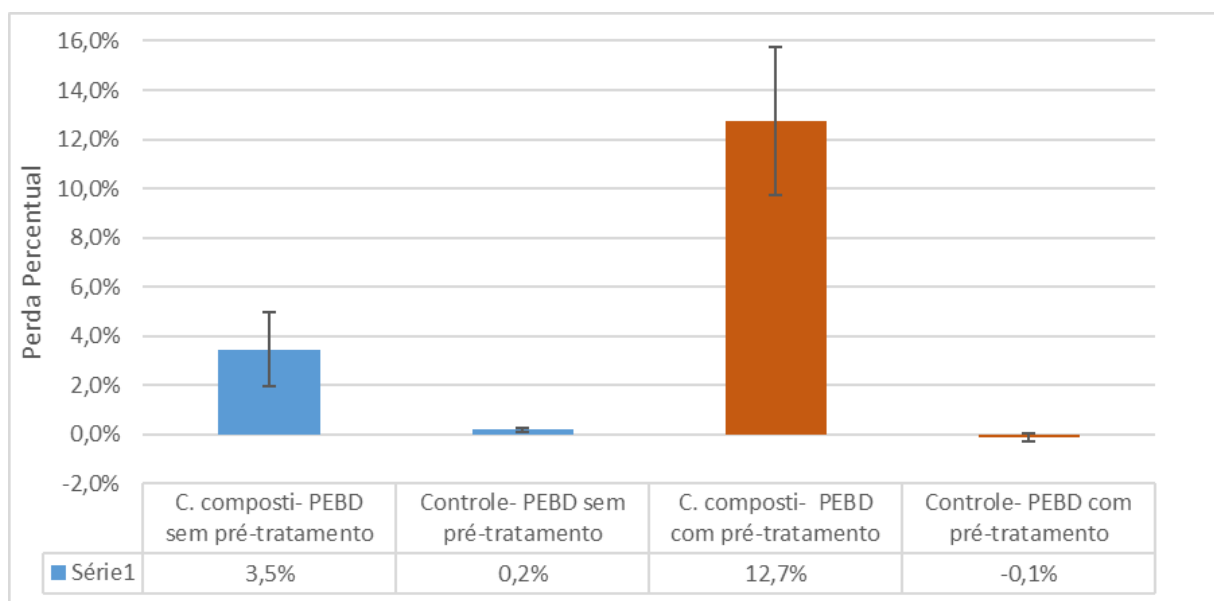
Em contrapartida, os painéis C e D, que representam os controles sem inoculação bacteriana, apresentam superfícies visivelmente mais lisas e homogêneas. Embora rugosidades discretas estejam presentes, possivelmente em decorrência do próprio tratamento oxidativo, não são observadas alterações morfológicas significativas nem estruturas compatíveis com atividade biológica.

Esses achados indicam que o pré-tratamento de oxidação avançada pode ter favorecido a adesão de *C. composti* e promovido alterações iniciais compatíveis com um processo de biodegradação do PEBD.

6.4 Análise da perda de massa percentual do PEBD

Os experimentos de biodegradação correspondem a concentrações de PEBD de aproximadamente 0,25% a 0,42% (p/v), com valor inicial de 0,1236 e final do cultivo de 90 dias de 0,1193. O isolado bacteriano *C. composti* demonstrou capacidade limitada de degradação do PEBD não tratado, resultando em perda média de massa de $3,5 \pm 1,5\%$ ao final do período experimental de 90 dias (Figura 24, em azul).

Figura 24- Percentual de perda de massa do PEBD



Legenda: Percentual de perda de massa do PEBD após 90 dias de incubação. Sem pré-tratamento, o cultivo com CR22 apresentou perda de $3,5 \pm 1,5\%$, sem alteração no controle negativo ($\alpha = 0,1$). Com pré-tratamento de oxidação, o cultivo com CR22 apresentou perda de $12,7 \pm 3\%$, também sem alteração no controle negativo ($\alpha = 0,05$) (Cohen, 2013).

Fonte: Autoria própria.

O controle negativo sem pré-tratamento, composto apenas pelo polímero incubado nas mesmas condições, mas sem microrganismos, não apresentou variações significativas de massa, confirmando que a perda observada nos tratamentos experimentais é atribuída exclusivamente à atividade microbiana (Figura 24, em azul).

Além disso, (Ali et al., 2023) relataram que *Pseudomonas sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de esgoto, foram capazes de degradar até 25 % de plástico após 120 dias de incubação, com confirmação da biodegradação por FTIR.

Observa-se na Figura 24, em laranja, que o cultivo com PEBD pré-tratado com o isolado *C. composti* resultou em uma perda média de massa de $12,7\% \pm 3$ indicando uma atividade significativa de biodegradação do polímero tratado. Em contraste, o controle negativo (contendo apenas o PEBD tratado, mas sem inoculação bacteriana), não apresentou alteração relevante na massa do material, o que confirma que a degradação observada no tratamento ativo foi de fato mediada pela ação microbiana.

Esses resultados reforçam o papel do pré-tratamento por oxidação (ozônio + peróxido de hidrogênio) como uma etapa importante para aumentar a biodisponibilidade do PEBD, tornando-o mais suscetível à degradação microbiana por *C. composti* (Mohammadi; Moussavi; Rezaei, 2022).

6.5 FTIR

6.5.1 FTIR do PEBD sem pré-tratamento e cultivado com CR22

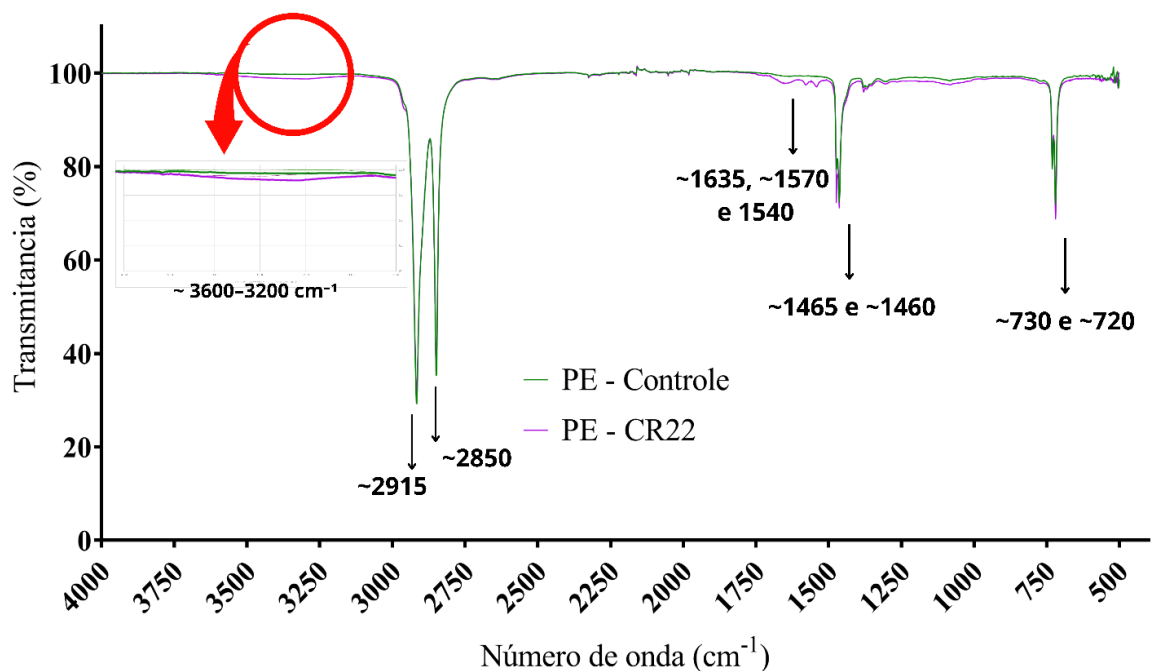
O FTIR foi utilizado para investigar possíveis alterações estruturais no PEBD sem pré-tratamento químico, após o cultivo com a bactéria CR22. A Figura 25 apresenta os espectros obtidos da amostra controle (PE– Controle) e da amostra exposta à bactéria (PE– CR22).

Os espectros de FTIR do PEBD tanto no controle quanto incubado com a bactéria CR22, apresentam as bandas típicas do PE sendo bandas intensas próximas de 2915 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , atribuídos ao estiramento assimétrico e simétrico das ligações C–H dos grupos metileno ($-\text{CH}_2-$), respectivamente. Esses picos estão associados às ligações C–H de grupos $-\text{CH}_2-$ em cadeias hidrocarbonadas saturadas, que compõem a estrutura alifática do PE (Restrepo-Flórez; Bassi; Thompson, 2014).

As bandas de deformação angular em torno de $1465\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$ e as bandas de *rocking* em $730\text{--}720\text{ cm}^{-1}$ também se mantiveram, representando as vibrações características das regiões cristalinas do PEBD (Figura 25).

No entanto, foram observadas pequenas diferenças nas regiões correspondentes a grupos oxigenados, especialmente na faixa de $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$, relacionada a grupos hidroxila (--OH), sugerindo que a bactéria CR22 promoveu modificações superficiais na química do polímero, indicativo de processos iniciais de oxidação (Figura 25).

Figura 25- FTIR do PEBD sem pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22



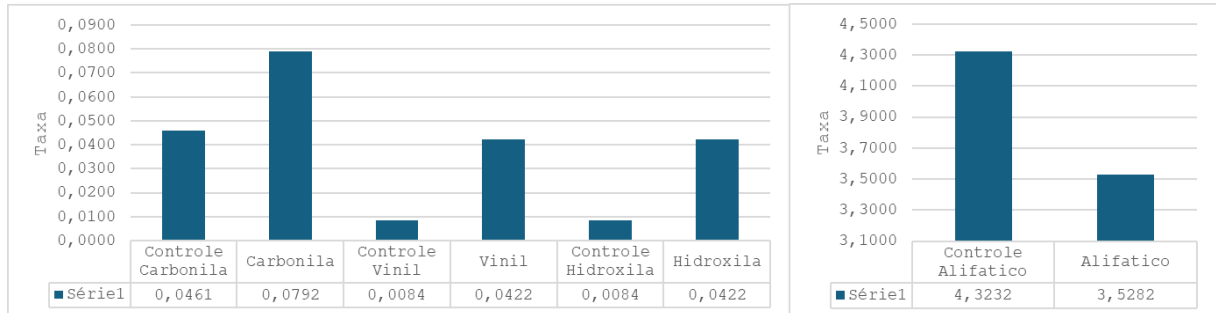
Legenda: FTIR do plástico PEBD, sem pré-tratamento de oxidação avançada, em cultivo com *C. composti*. A curva em rosa (PE-CR22) representa o PEBD incubado com a cepa *C. composti*, enquanto a curva em verde representa o PEBD controle, sem bactéria. Os picos em ~ 2915 e $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ correspondem às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico das ligações C-H dos grupos metileno ($\text{--CH}_2\text{--}$). As bandas em ~ 1465 e $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$ indicam flexão angular (*scissoring*) dos grupos metileno, enquanto os picos em ~ 730 e $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ estão associados à torção fora do plano (*rocking*) desses mesmos grupos. Os sinais adicionais em ~ 1640 , ~ 1535 e $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$ podem indicar pequenas modificações na carbonila.

Fonte: Autoria própria.

Foram observadas bandas adicionais nos espectros da amostra PE-CR22, destacadas na cor rosa, nos comprimentos de onda 1635 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , ausentes na amostra controle. A banda em 1635 cm^{-1} pode estar associada vibração de estiramento da ligação C=C em insaturações (alcenos) ou ainda ao estiramento da carbonila conjugada (C=O) em grupos cetona ou aldeído. As bandas observadas próximas a 1570 e 1540 cm^{-1} são atribuídas a grupos carbonila em carboxilatos (--COO^-) e outros compostos oxigenados formados pela oxidação do PEBD durante a biodegradação (Figura 25). Essas faixas indicam a introdução de grupos

funcionais oxigenados derivados da degradação biológica da CR22 no polímero. (Montazer; Najafi; Levin, 2020a; Oh; Stache, 2024).

Figura 26- Índice



Legenda: Gráficos de barras representando os índices espectrais calculados a partir de espectros de FTIR obtidos em duas regiões distintas da mesma amostra de PEBD sem pré-tratamento oxidativo, após cultivo com CR22 e controle. A análise foi conduzida de forma comparativa, avaliando-se a variação relativa das intensidades das bandas características. Ambas as aquisições apresentaram o mesmo padrão espectral para os diferentes grupos funcionais analisados. As colunas correspondem às bandas de carbonila (C=O), vinil (C=C), alifático (C-H) e hidroxila (O-H).

Fonte: Autoria própria.

A análise quantitativa dos índices derivados dos espectros de FTIR revelou modificações químicas importantes no PEBD sem pré-tratamento após incubação com a bactéria CR22, na Figura 26. O índice de carbonila (1715 cm^{-1}) apresentou aumento expressivo, passando de 0,0461 no controle para 0,0792 na amostra com CR22. Esse aumento significativo indica a formação de novos grupos carbonila na superfície do polímero, evidenciando a ocorrência de oxidação promovida pela atividade bacteriana (Albertsson; Karlsson, 1990; Oh; Stache, 2024; Roman et al., 2024).

O índice de hidroxila (3340 cm^{-1}) também aumentou de 0,0084 para 0,0422, indicando que a bactéria CR22 favoreceu a incorporação de grupos hidroxila no material, outro indicativo de oxidação superficial e modificação química do PEBD. O índice de vinil (1640 cm^{-1}) aumentou de 0,0084 para 0,0422, o que sugere a formação de insaturações e possíveis quebras parciais da cadeia polimérica, típicas de processos oxidativos avançados. Por outro lado, o índice alifático (2848 cm^{-1}) diminuiu de 4,3232 no controle para 3,5282 na amostra com CR22, indicando uma redução relativa dos grupos alifáticos CH_2 (Albertsson; Karlsson, 1990; Syranidou et al., 2023).

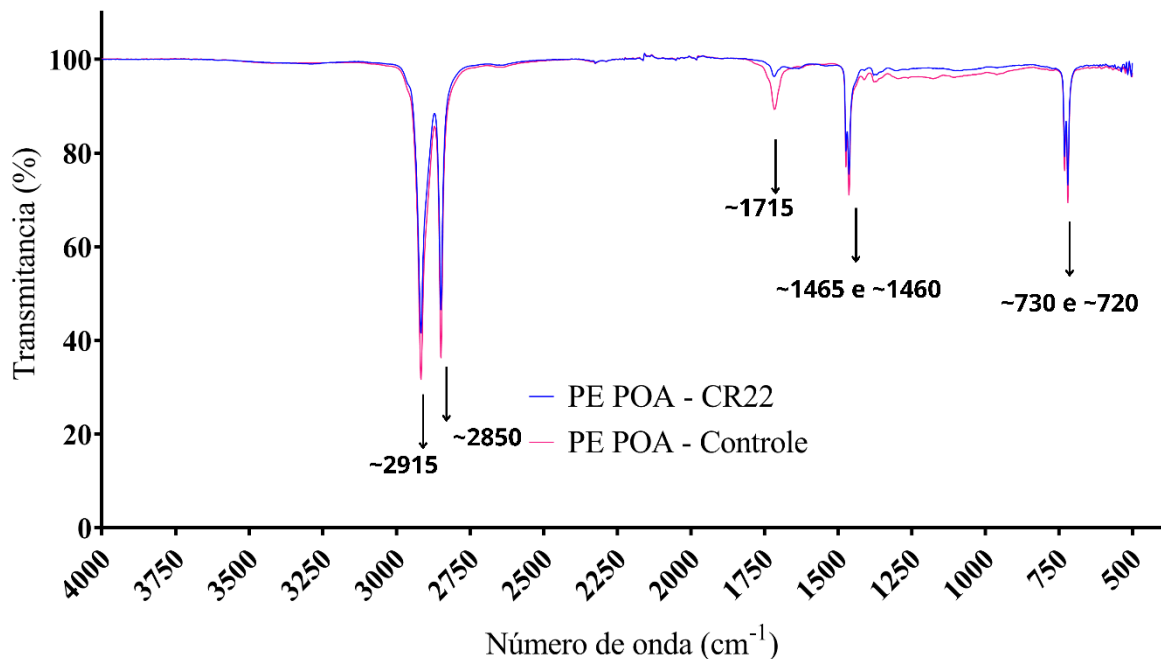
De forma integrada, os resultados mostram que a bactéria CR22 é capaz de promover uma oxidação e alterações químicas mais profundas no PEBD em comparação ao controle, evidenciando seu potencial capacidade de biodegradação. A elevação dos índices de carbonila,

hidroxila e vinil, associada à redução do índice alifático, demonstram a ocorrência de processos de oxidação, quebra da cadeia polimérica e degradação inicial da estrutura do polímero.

6.5.2 FTIR do PEBD com pré-tratamento e cultivado com CR22

A análise de FTIR das amostras de PEBD dos cultivos da CR22, previamente expostas ao pré-tratamento oxidativo com ozônio e peróxido de hidrogênio, revelou modificações importantes na estrutura química do material em comparação ao controle. Ainda foram identificadas bandas típicas do PEBD nos espectros de todas as amostras, especialmente nas regiões de 2915 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} (estiramento C–H dos grupos $-\text{CH}_2-$), 1460 cm^{-1} e 1465 cm^{-1} (deformações do tipo *scissoring*) e 730 cm^{-1} e 720 cm^{-1} (*rocking* do grupo $-\text{CH}_2-$), mas com intensidades notavelmente reduzidas nas amostras tratadas. A diminuição progressiva desses sinais, mais acentuada no PEBD em cultivo com a *C. composti* indica a ocorrência de modificações estruturais na matriz polimérica, sugerindo que o pré-tratamento facilitou o acesso das bactérias à superfície do PE (Figura 27).

Figura 27- FTIR do PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com CR22



Legenda: FTIR do plástico PEBD com pré-tratamento de oxidação avançada em cultivo com *C. composti*. A curva em azul (PE-POA-CR22) representa o PEBD com POA em cultivo com a cepa *C. composti*, enquanto a curva em rosa representa o controle (PEBD com POA, sem bactéria). Os picos em ~ 2915 e $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ correspondem às vibrações de estiramento C–H dos grupos metileno ($-\text{CH}_2-$). As bandas em ~ 1465 e $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$ indicam flexões angulares desses grupos, e os sinais em ~ 730 e $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos à torção fora do plano. A presença da banda em $\sim 1715\text{ cm}^{-1}$ indica a formação de grupos carbonila (C=O).

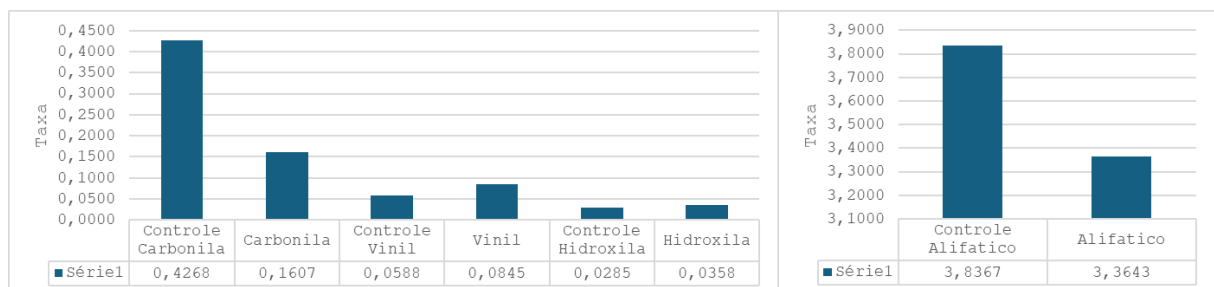
Fonte: Autoria própria.

A ação combinada do ozônio e do peróxido de hidrogênio tem sido amplamente relatada como eficaz na introdução de grupos oxigenados, como carbonilas e hidroxilas, na superfície de materiais poliméricos, tornando-os mais suscetíveis a processos subsequentes de degradação (Hu; Lim; Hu, 2023; Oh; Stache, 2024). Essas alterações físico-químicas favorecem a interação com microrganismos, uma vez que aumentam a polaridade superficial e, conseqüentemente, a adesão celular (Lucas et al., 2008; Restrepo-Flórez; Bassi; Thompson, 2014). Assim, a redução dos sinais relacionados aos grupos $-CH_2-$ pode estar associada tanto à degradação oxidativa inicial induzida pelo tratamento quanto à atividade microbiana durante a incubação.

Além da atenuação dos picos típicos do PEBD, observou-se, na amostras PE-POA-Controle, a formação de uma nova banda em 1715 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações $C=O$ (grupos carbonila). A presença dessa banda é um indicativo clássico de processos oxidativos em plásticos, sendo normalmente associada à formação de aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos ou ésteres, como produtos da degradação química (Montazer; Najafi; Levin, 2020a; Oh; Stache, 2024).

A análise dos índices calculados a partir das bandas específicas do FTIR (Figura 28) permitiu avaliar a evolução dos grupos funcionais no PEBD pré-oxidado após incubação nas condições controle e na presença da bactéria CR22.

Figura 28- Índices



Legenda: Gráficos de barras representando os índices espectrais calculados a partir de espectros de FTIR obtidos em duas regiões distintas da mesma amostra de PEBD com pré-tratamento oxidativo, após cultivo com CR22 e controle. A análise foi conduzida de forma comparativa, avaliando-se a variação relativa das intensidades das bandas características. Ambas as aquisições apresentaram o mesmo padrão espectral para os diferentes grupos funcionais analisados. As colunas correspondem às bandas de carbonila ($C=O$), vinil ($C=C$), alifático ($C-H$) e hidroxila ($O-H$).

Fonte: Autoria própria.

O índice de carbonila ($\sim 1715\text{ cm}^{-1}$) apresentou redução expressiva na amostra com a bactéria CR22, passando de aproximadamente 0,4268 no controle para 0,1607 (Figura 28). Como essa banda está associada ao estiramento $C=O$ de cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos, a diminuição do índice indica que parte das carbonilas formadas durante o pré-tratamento

oxidativo foi transformada ao longo da incubação, sugerindo degradação mediada pela bactéria (Albertsson; Karlsson, 1990; Oh; Stache, 2024; Roman et al., 2024).

O índice de hidroxila (3340 cm^{-1}) apresentou aumento na presença de CR22 (0,0338) em relação ao controle (0,0285). Esse acréscimo, indica enriquecimento relativo de grupos –OH, refletindo tanto a formação de novas hidroxilas durante a incubação quanto possíveis transformações de carbonilas previamente existentes. O índice de vinila (1640 cm^{-1}) aumentou de 0,0588 no controle para 0,0845 com CR22, sugerindo maior presença relativa de insaturações vinílicas após a incubação. Como grupos vinílicos podem se formar por β -cisão de carbonilas ou reorganização de segmentos parcialmente oxidados, o aumento observado indica que a bactéria promoveu transformações químicas na matriz polimérica, gerando insaturações e contribuindo para a desestabilização de grupos oxigenados. O índice alifático (2848 cm^{-1}) diminuiu de 3,8367 no controle para 3,3643 na amostra com CR22, indicando redução dos segmentos –CH₂– saturados (Albertsson; Karlsson, 1990; Syranidou et al., 2023).

A interpretação conjunta desses índices evidencia um padrão coerente de modificação funcional do PEBD na presença de CR22. Esses resultados indicam que a bactéria CR22 influenciou a dinâmica das espécies oxigenadas introduzidas pelo pré-tratamento, promovendo alterações químicas adicionais e caracterizando um comportamento de modificação microbiana do PEBD.

6.6 Biolog Ecoplate

Os resultados obtidos por meio da análise das fontes de carbono assimiladas pela cepa *C. composti*, utilizando a metodologia EcoPlate™, possibilitaram uma avaliação detalhada do perfil funcional de cada microrganismo. A partir da leitura das densidades ópticas em múltiplos tempos de incubação (0 a 144 horas), foi possível identificar quais classes de substratos foram preferencialmente metabolizadas, bem como o grau de seletividade ou de versatilidade metabólica de cada cepa.

Essa abordagem permitiu não apenas avaliar a atividade metabólica, mas também compreender como a CR22 responde a diferentes tipos de compostos presentes na placa, incluindo carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, polímeros, aminas e compostos fenólicos (Tabela 3). O uso combinado de ferramentas visuais (*heatmaps*) e simbólicas (tabela de intensidade com escala “+++” a “nulo”) contribuiu para a interpretação clara dos dados, fornecendo um panorama funcional abrangente.

A utilização de α -ciclodextrina e glicogênio, ambos carboidratos complexos, reforça a presença de enzimas como amilases ou ciclodextrinases, envolvidas na hidrólise de polissacarídeos estruturais (Bher et al., 2022). A metabolização progressiva desses substratos entre 72 h e 120 h (Tabela 6, em anexo) indica que sua assimilação ocorre após a adaptação inicial da cepa ao meio, possivelmente em resposta à disponibilidade de carbono de maior complexidade.

Tabela 3 Classificação da intensidade da utilização de substratos pela CR22 na EcoPlate

Fonte de carbono	Classificação da intensidade da utilização de substratos
POLÍMEROS	
Tween 40	+++
Tween 80	+++
α -Ciclodextrina	+
Glicogênio	+++
CARBOIDRATOS	
D,L- α -Glicerol Fosfato	+
N-Acetil-D-Glicosamina	+
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	
Ácido Itacônico	++
AMINOÁCIDOS	
L-Arginina	+

Fonte: Autoria própria.

A utilização de N-acetil-D-glicosamina aponta para a atividade de N-acetilglucosaminidases, enzimas envolvidas na degradação de glicoconjugados estruturais, como quitina e peptidoglicanos.

A metabolização do ácido itacônico, um ácido dicarboxílico com propriedades antimicrobianas, evidencia a capacidade da cepa de utilizar compostos com potencial efeito inibitório (Sriariyanun et al., 2019).

A assimilação de L-arginina, observada com picos principalmente a partir de 96 h e com pico em 144 h (Tabela 6, em anexo), indica o uso de rotas catabólicas de aminoácidos em estágios mais tardios do crescimento. A metabolização desse aminoácido pode envolver enzimas como a arginase ou a arginina descarboxilase, integradas a vias como o ciclo da ureia, a biossíntese de ornitina e a geração de energia. Esse padrão é coerente com o descrito por (Yu

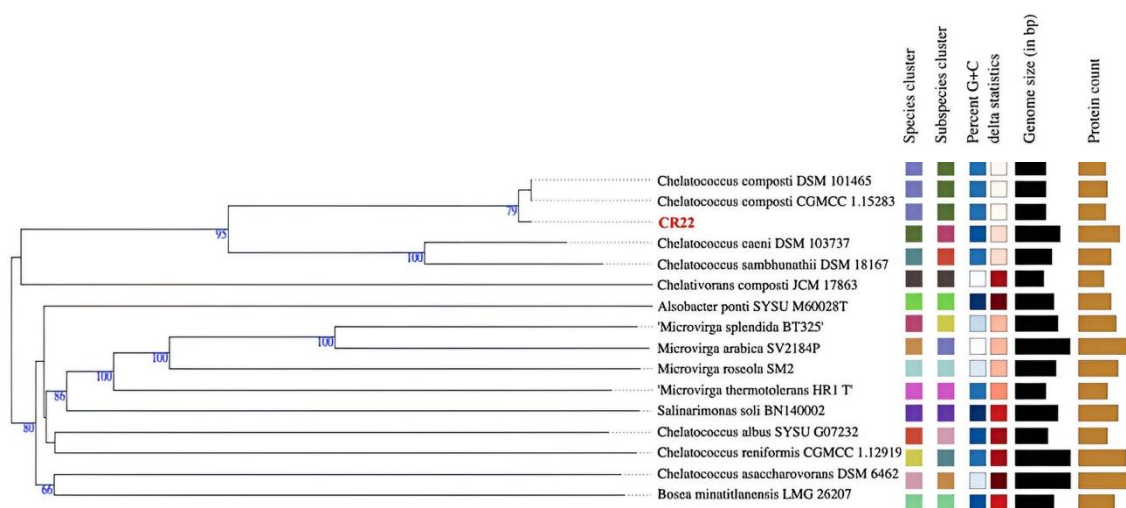
et al., 2021), que demonstraram a ativação de vias metabólicas específicas para conversão de aminoácidos em intermediários energéticos.

De maneira geral, o padrão observado evidencia um perfil metabólico versátil, com seletividade funcional marcada. A degradação de lipídios, carboidratos complexos e compostos nitrogenados evidencia o potencial da linhagem para aplicações biotecnológicas, como biorremediação, reciclagem de matéria orgânica e degradação de polímeros. Esses resultados reforçam o valor do método EcoPlate™ na caracterização funcional de microrganismos, conforme discutido por (Garland, 1997; Insam; Goberna, 2008), e demonstram a importância da diversidade funcional como indicador da plasticidade metabólica de bactérias ambientais.

6.7 Análise filogenética CR22

A análise no banco de dados NCBI, indicou alta similaridade com espécies do gênero *Chelatococcus* (dado não apresentado). Foram anotados 3.456 genes codificadores de proteínas e 42 tRNAs, com completude gênica superior a 99%, validada pela detecção de 105 dos 106 genes essenciais. A ANI revelou 99,4% de similaridade com *C. composti* (DSM 101465), corroborando sua identidade taxonômica.

Figura 29- Análise filogenética



Legenda: Análise filogenética baseada na comparação de genomas de cepas referência definidas ao nível de espécies e subespécies. Os números nos nós representam valores de suporte do *Bootstrap*, indicando a confiança nos dados preditos. As etiquetas laterais indicam o agrupamento das linhagens em espécies e subespécies, o conteúdo G+C genômico das linhagens, estatísticas delta (semelhança) entre as linhagens, tamanho total do genoma, número total de proteínas preditas. Resultado gerado com a ferramenta TYGS (<https://tygs.dsmz.de>).

Fonte: Autoria própria.

A identificação foi obtida por meio de análise filogenômica na plataforma TYGS (<https://tygs.dsmz.de>), utilizando genomas de referência e o método de máxima verossimilhança com suporte de bootstrap. Conforme demonstrado na Figura 26, a linhagem CR22 foi posicionada de forma consistente no gênero *Chelatococcus*, agrupando-se com *C. composti* DSM 101465 e confirmando sua classificação como pertencente a essa espécie (Figura 29).

6.8 Caracterização genômica da CR22

A CR22 foi submetida a sequenciamento genômico e foram obtidas 20 milhões de leituras de 150 pb, totalizando aproximadamente 3,0 Gbp, com qualidade Q30 superior a 93%.

A anotação funcional, realizada com Prokka e InterProScan, permitiu a classificação de 3.174 proteínas (91% do total) em categorias COG. No banco KEGG, foram identificadas 2.052 proteínas (59% das proteínas preditas), enquanto o banco Pfam revelou ao menos um domínio funcional em 91% das sequências (3.137 proteínas).

Tabela 4 Enzimas selecionadas da linhagem CR22 com potencial à degradação de polímeros plásticos.

Lócus do gene	Família Pfam	Descrição
JHIJADAK_00591	PF07731	Oxidase multicobre
JHIJADAK_01067	PF00465	Desidrogenase alcoólica contendo ferro
JHIJADAK_01166	PF00465	Desidrogenase alcoólica contendo ferro
JHIJADAK_01282	PF01557	Família hidrolase fumarilylacetoacetato
JHIJADAK_01369	PF01565	Domínio de ligação ao FAD
JHIJADAK_02029	PF00903	Superfamília dioxigenase
JHIJADAK_02199	PF13472	Família lipase/gdsl-acil-hidrolase
JHIJADAK_02202	PF00106	Desidrogenase de cadeia curta
JHIJADAK_02742	PF00903	Superfamília dioxigenase
JHIJADAK_02741	PF00561	Dobra hidrolase alfa/beta

Fonte: Autoria própria.

No genoma da *C. composti*, foram identificadas enzimas associadas à degradação de compostos recalcitrantes como o PE, indicado na Tabela 4. As desidrogenases participam da oxidação de metabólitos derivados do polímero, enquanto as oxidases FAD estão envolvidas na produção de ROS, contribuindo para a ruptura inicial da cadeia polimérica. As polifenol

oxidases e peroxidases demonstram capacidade de modificar quimicamente estruturas aromáticas e alifáticas, enquanto as oxidoreduases indicam a presença de reações redox que complementam o processo catabólico. Essa diversidade enzimática reflete um potencial metabólico adaptado à degradação de plásticos, especialmente do PE (Ibrahim et al., 2016; Pérez-García et al., 2025; Xu et al., 2014).

Diversas enzimas associadas à degradação de polímeros plásticos foram identificadas no genoma da cepa CR22. Entre elas, destacam-se desidrogenases, como JHIDAK_01166 e JHIDAK_01067, que participam da oxidação de álcoois primários gerados após a modificação inicial do PE. Também foram identificadas oxidases contendo domínios FAD, como a proteína JHIDAK_01369 fundamental para a oxidação não enzimática das cadeias do PE. Além disso, enzimas como polifenol oxidases e peroxidases, representadas por JHIDAK_00591 que facilitam a fragmentação das cadeias poliméricas. Por fim como JHIDAK_02202, sugere a atuação em reações redox específicas que complementam o processo de biodegradação.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a aplicação de pré-tratamento oxidativo avançado com ozônio e peróxido de hidrogênio no PEBD promove modificações físico-químicas significativas, tornando o polímero mais suscetível à colonização e degradação por microrganismos.

A atividade enzimática foi evidenciada nos ensaios com substratos modelo, como PCL, tributirina e BHET, reforçando o potencial biodegradador das cepas. A análise metabólica por EcoPlate revelou perfis metabólicos distintos entre as linhagens: a CR1 apresentou maior capacidade de metabolização de carboidratos complexos e compostos aromáticos, enquanto a CR22 demonstrou elevada atividade frente a compostos lipídicos, fosforilados e polímeros, sugerindo rotas metabólicas distintas.

As análises por MEV revelaram alterações morfológicas acentuadas na superfície do PEBD pré-tratado, com formação de fissuras, cavidades e biofilmes bacterianos. Esses efeitos foram corroborados por FTIR, que identificou a perda de grupos C–H e o aparecimento de bandas associadas a grupos carbonílicos, o que indica processos oxidativos ativos. O ensaio de perda de massa validou o impacto do pré-tratamento na biodegradação, com destaque para a CR22, com 12,7% (± 3) de perda percentual de massa, e para a CR1, com 3,5% ($\pm 0,6$).

A caracterização genômica confirmou a identidade das cepas e revelou a presença de genes associados à tolerância ao estresse oxidativo, à adesão a superfícies hidrofóbicas e à produção de enzimas oxidativas.

Do ponto de vista tecnológico, os resultados obtidos demonstram que a integração entre o pré-tratamento oxidativo e a aplicação de microrganismos constitui uma estratégia promissora para a implementação de processos de biodegradação em escala de biorreatores. O pré-tratamento com ozônio e peróxido mostrou-se essencial para acelerar a etapa inicial de oxidação, reduzindo o tempo necessário para que as bactérias iniciem a assimilação e, assim, melhore o desempenho microbiano. Esse avanço é estratégico para processos industriais, onde a redução de tempo de residência e o aumento da eficiência são fatores críticos.

A caracterização detalhada das cepas fornece os parâmetros biológicos necessários para futuras etapas de escalonamento. Esses dados são fundamentais para definir condições operacionais, como taxa de aeração, agitação, tempo de residência e regimes de alimentação, possibilitando o planejamento de cultivos controlados com resíduos plásticos. Assim, o estudo estabelece uma base tecnológica para a transição da biodegradação do PEBD de ensaios laboratoriais para sistemas reacionais de maior escala.

REFERÊNCIAS

- AL HOSNI, Asma S.; PITTMAN, J. K.; ROBSON, Geoffrey D. Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic. **Waste Management**, v. 97, p. 105–114, 1 set. 2019.
- ALBERTSSON, Ann-Christine; KARLSSON, Sigbritt. Polyethylene Degradation and Degradation Products. p. 60–64, 13 jul. 1990.
- ALI, Shakir *et al.* Characterization of plastic degrading bacteria isolated from sewage wastewater. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 5, p. 103628, 1 maio 2023.
- ARKATKAR, Ambika *et al.* Growth of Pseudomonas and Bacillus biofilms on pretreated polypropylene surface. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 6, p. 530–536, 1 set. 2010.
- ATANASOVA, Nikolina *et al.* Plastic Degradation by Extremophilic Bacteria. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 5610, v. 22, n. 11, p. 5610, 25 maio 2021.
- AUSTIN, Harry P. *et al.* Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 19, p. E4350–E4357, 8 maio 2018.
- BANKEVICH, Anton *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 1 maio 2012.
- BARDAJÍ, Danae Kala Rodríguez *et al.* A mini-review: current advances in polyethylene biodegradation. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 2, 1 fev. 2020.
- BEAUMONT, Nicola J. *et al.* Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 142, p. 189–195, 1 maio 2019.
- BERLIN HEIDELBERG, Springer-Verlag; HAKKARAINEN, Minna; ALBERTSSON, Ann-Christine. Environmental Degradation of Polyethylene. **Advances in Polymer Science**, v. 169, p. 177–200, 2004.
- BHER, Anibal *et al.* Biodegradation of Biodegradable Polymers in Mesophilic Aerobic Environments. **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 12165, v. 23, n. 20, p. 12165, 12 out. 2022.
- BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 1 ago. 2014.

BUCHHOLZ, Patrick C. F. *et al.* Plastics degradation by hydrolytic enzymes: The plastics-active enzymes database—PAZy. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 90, n. 7, p. 1443–1456, 1 jul. 2022.

CARR, Clodagh M.; CLARKE, David J.; DOBSON, Alan D. W. Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 11 nov. 2020.

CHEN, Longsheng; LIN, Zewei. Polyethylene: Properties, Production and Applications. **2021 3rd International Academic Exchange Conference on Science and Technology Innovation, IAECST 2021**, p. 1191–1196, 2021.

CHO, Jin Hee *et al.* Screening of a New Kosakonia Species for Polyethylene Biodegradation. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. e2411058, 2025.

COLE, Matthew *et al.* Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 2588–2597, 1 dez. 2011.

COUTINHO, Fernanda M. B.; MELLO, Ivana L.; SANTA MARIA, Luiz C. de. Polietileno: principais tipos, propriedades e aplicações. **Polimeros (Sao Carlos)**, v. 13, n. 1, p. 01–13, 2003.

DAMASIO, André *et al.* Editorial: Advances in the regulation and production of fungal enzymes by transcriptomics, proteomics and recombinant strains design. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. JUN, 2019.

DANSO, Dominik; CHOW, Jennifer; STREITA, Wolfgang R. Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 19, 1 out. 2019.

DING, Kuan *et al.* Catalytic microwave-assisted pyrolysis of plastic waste over NiO and HY for gasoline-range hydrocarbons production. **Energy Conversion and Management**, v. 196, p. 1316–1325, 15 set. 2019.

EDWARDS, Sabrina *et al.* Microbial Consortia and Mixed Plastic Waste: Pangenomic Analysis Reveals Potential for Degradation of Multiple Plastic Types via Previously Identified PET Degrading Bacteria. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5612, 1 maio 2022.

ELLIS, Lucas D. *et al.* Chemical and biological catalysis for plastics recycling and upcycling. **Nature Catalysis 2021 4:7**, v. 4, n. 7, p. 539–556, 22 jul. 2021.

FENG, Shanshan *et al.* Biodegradation mechanism of polycaprolactone by a novel esterase MGS0156: a QM/MM approach. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 12, p. 2332–2344, 16 dez. 2020.

FRANCO CAIRO, João Paulo L. *et al.* On the roles of AA15 lytic polysaccharide monoxygenases derived from the termite *Coptotermes gestroi*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 216, 1 mar. 2021.

GAMBARINI, Victor *et al.* PlasticDB: a database of microorganisms and proteins linked to plastic biodegradation. **Database**, v. 2022, 26 dez. 2022.

GAO, Y. *et al.* Isolation and characterization of a novel organic solvent-tolerant *Anoxybacillus* sp. PGDY12, a thermophilic Gram-positive bacterium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 2, p. 472–478, 1 fev. 2011.

GARLAND, J. L.; MILLS, A. L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 2351–2359, 1991.

GARLAND, Jay L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 24, n. 4, p. 289–300, 1 dez. 1997.

GEYER, Roland; JAMBECK, Jenna R.; LAW, Kara Lavender. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3, n. 7, 5 jul. 2017.

GHATGE, Sunil *et al.* Biodegradation of polyethylene: a brief review. **Applied Biological Chemistry** 2020 63:1, v. 63, n. 1, p. 1–14, 16 maio 2020.

GILAN, I.; HADAR, Y.; SIVAN, A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 97–104, 19 jul. 2004.

GOLDSTEIN, Joseph I. *et al.* Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis. **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis**, p. 1–550, 1 jan. 2017.

GUPTA, Kartikey Kumar; DEVI, Deepa. Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04398, 1 jul. 2020.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763–781, 14 jun. 2004.

- GUREVICH, Alexey *et al.* QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. **Bioinformatics**, v. 29, n. 8, p. 1072–1075, 15 abr. 2013.
- GYUNG YOON, Moon; JEONG JEON, Hyun; NAM KIM, Mal. Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 03, n. 04, 2012.
- HAIDER, Tobias P. *et al.* Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 58, n. 1, p. 50–62, 2 jan. 2019.
- HAN, Xu *et al.* Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.
- HARSHVARDHAN, Kumar; JHA, Bhavanath. Biodegradation of low-density polyethylene by marine bacteria from pelagic waters, Arabian Sea, India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 77, n. 1–2, p. 100–106, 15 dez. 2013.
- HERIS, Yousef Sefidi. Bacterial biodegradation of synthetic plastics: a review. **Bulletin of the National Research Centre 2024 48:1**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 5 set. 2024.
- HU, Jinyuan; LIM, Fang Yee; HU, Jiangyong. Ozonation facilitates the aging and mineralization of polyethylene microplastics from water: Behavior, mechanisms, and pathways. **Science of The Total Environment**, v. 866, p. 161290, 25 mar. 2023.
- HUECK, H. J. The biodeterioration of materials—an appraisal. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 48, n. 1–4, p. 5–11, 1 jan. 2001.
- IBRAHIM, Mohammad H. A. *et al.* Chelatococcus thermostellatus sp. nov., a new thermophile for bioplastic synthesis: comparative phylogenetic and physiological study. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2016.
- INSAM, Heribert; GOBERNA, Marta. Section 4 update: Use of Biolog® for the Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. **Molecular Microbial Ecology Manual**, p. 2755–2762, 2008.
- JEON, Hyun Jeong; KIM, Mal Nam. Isolation of a thermophilic bacterium capable of low-molecular-weight polyethylene degradation. **Biodegradation**, v. 24, n. 1, p. 89–98, 1 fev. 2013.
- KÁRPÁTI, Levente *et al.* One-Pot Depolymerization and Polycondensation of PET Based Random Oligo- and Polyesters. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 10, p. 2167–2181, 1 out. 2019.

KHOSHTINAT, Shiva. State-of-the-Art Review of Aliphatic Polyesters and Polyolefins Biodeterioration by Microorganisms: From Mechanism to Characterization. **Corrosion and Materials Degradation 2023, Vol. 4, Pages 542-572**, v. 4, n. 4, p. 542–572, 4 out. 2023.

KNOTT, Brandon C. *et al.* Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 41, p. 25476–25485, 13 out. 2020.

KRYSENKO, Sergii; WOHLLEBEN, Wolfgang. Polyamine and Ethanolamine Metabolism in Bacteria as an Important Component of Nitrogen Assimilation for Survival and Pathogenicity. **Medical Sciences**, v. 10, n. 3, p. 40, 1 set. 2022.

KUMAR SEN, Sudip; RAUT, Sangeeta. Microbial degradation of low density polyethylene (LDPE): A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 462–473, 1 mar. 2015.

KUMAR, Sumit *et al.* Insights into the metabolism pathway and functional genes of long-chain aliphatic alkane degradation in haloarchaea. **Extremophiles**, v. 24, n. 4, p. 475–483, 1 jul. 2020.

KYAW, Bhone Myint *et al.* Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by Pseudomonas Species. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 411–419, 1 set. 2012.

LOU, Yu *et al.* Biodegradation of Polyethylene and Polystyrene by Greater Wax Moth Larvae (*Galleria mellonella* L.) and the Effect of Co-diet Supplementation on the Core Gut Microbiome. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 2821–2831, 3 mar. 2020.

LU, Hongyuan *et al.* Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. **Nature**, v. 604, n. 7907, p. 662–667, 28 abr. 2022.

LUCAS, Nathalie *et al.* Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere**, v. 73, n. 4, p. 429–442, 1 set. 2008.

MISHRA, Aditi Arun Kumar *et al.* Untangling the adaptive strategies of thermophilic bacterium *Anoxybacillus rupiensis* TPH1 under low temperature. v. 28, n. 3, p. 1–27, 2024.

MOHAMMADI, Samira; MOUSSAVI, Gholamreza; REZAEI, Mohsen. Enhanced peroxidase-mediated biodegradation of polyethylene using the bacterial consortia under H₂O₂-biostimulation. **Polymer**, v. 240, 1 fev. 2022.

MONTAZER, Zahra; NAJAFI, Mohammad B. Habibi; LEVIN, David B. Challenges with Verifying Microbial Degradation of Polyethylene. **Polymers 2020, Vol. 12, Page 123**, v. 12, n. 1, p. 123, 5 jan. 2020.

MORAES, Eduardo C. *et al.* Lignolytic-consortium omics analyses reveal novel genomes and pathways involved in lignin modification and valorization. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 22 mar. 2018.

NZILA, Alexis. Current Status of the Degradation of Aliphatic and Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Thermophilic Microbes and Future Perspectives. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2018, Vol. 15, Page 2782, v. 15, n. 12, p. 2782, 7 dez. 2018.

OH, Sewon; STACHE, Erin E. Recent advances in oxidative degradation of plastics. . 15 jul. 2024, p. 7309–7327.

OTAKE, Yoshito *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride, and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 56, n. 13, p. 1789–1796, 27 jun. 1995.

PAIXÃO, Douglas Antonio Alvaredo *et al.* Microbial enrichment and meta-omics analysis identify CAZymes from mangrove sediments with unique properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, 1 ago. 2021.

PALM, Gottfried J. *et al.* Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

PALZA, Humberto; ARAVENA, Cristian; COLET, Madeleine. Role of the Catalyst in the Pyrolysis of Polyolefin Mixtures and Used Tires. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 3, p. 3111–3120, 16 mar. 2017.

PATEL, Isha; BELLO, Sarah; GUPTA, Radhey S. Phylogenomic and molecular marker based studies to clarify the evolutionary relationships amongst *Anoxybacillus* species and demarcation of the family *Anoxybacillaceae* and some of its constituent genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 74, n. 9, p. 006528, 17 set. 2024.

PÉREZ-GARCÍA, Pablo *et al.* Microbial plastic degradation: enzymes, pathways, challenges, and perspectives. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, 19 set. 2025.

REN, Liu *et al.* Biodegradation of Polyethylene by *Enterobacter* sp. D1 from the Guts of Wax Moth *Galleria mellonella*. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2019, Vol. 16, Page 1941, v. 16, n. 11, p. 1941, 31 maio 2019.

RESTREPO-FLÓREZ, Juan Manuel; BASSI, Amarjeet; THOMPSON, Michael R. Microbial degradation and deterioration of polyethylene - A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 88, p. 83–90, mar. 2014.

ROMAN, Ellen Karen Barreto *et al.* Plastic-degrading microbial communities reveal novel microorganisms, pathways, and biocatalysts for polymer degradation and bioplastic production. **Science of the Total Environment**, v. 949, 1 nov. 2024.

RONCA, Sara. Polyethylene. **Brydson's Plastics Materials: Eighth Edition**, p. 247–278, 1 jan. 2017.

RONKVIST, Åsa M. *et al.* Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). **Macromolecules**, v. 42, n. 14, p. 5128–5138, 28 jul. 2009.

SAMAD, Mohd Yusof A. *et al.* A plate assay for primary screening of lipase activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 9, n. 1, p. 51–56, 1 jan. 1989.

SARKER, Aniruddha *et al.* A review of microplastics pollution in the soil and terrestrial ecosystems: A global and Bangladesh perspective. **Science of The Total Environment**, v. 733, p. 139296, 1 set. 2020.

SCHULTZ, Júnia *et al.* Unraveling the Genomic Potential of the Thermophilic Bacterium *Anoxybacillus flavithermus* from an Antarctic Geothermal Environment. **Microorganisms**, v. 10, n. 8, p. 1673, 1 ago. 2022.

SEEMANN, Torsten. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SHAH, Aamer Ali *et al.* Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, p. 246–265, 1 maio 2008.

SIMÃO, Felipe A. *et al.* BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, 1 out. 2015.

SINGH, Avantika *et al.* Techno-economic, life-cycle, and socioeconomic impact analysis of enzymatic recycling of poly(ethylene terephthalate). **Joule**, v. 5, n. 9, p. 2479–2503, 15 set. 2021.

SMELTZER, M. S.; HART, M. E.; IANDOLO, J. J. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 2815–2819, 1992.

SOFO, Adriano; RICCIUTI, Patrizia. A Standardized Method for Estimating the Functional Diversity of Soil Bacterial Community by Biolog® EcoPlates™ Assay—The Case Study of a Sustainable Olive Orchard. **Applied Sciences 2019, Vol. 9, Page 4035**, v. 9, n. 19, p. 4035, 26 set. 2019.

SRIARIYANUN, Malinee *et al.* Itaconic acid: A promising and sustainable platform chemical? **Applied Science and Engineering Progress**, v. 12, n. 2, p. 75–82, 2019.

SYRANIDOU, Evdokia *et al.* Relationship between the Carbonyl Index (CI) and Fragmentation of Polyolefin Plastics during Aging. **Environmental Science & Technology**, v. 57, n. 21, p. 8130–8138, 30 maio 2023.

TAO, Xuanyu *et al.* Polyethylene Degradation by a Rhodococcous Strain Isolated from Naturally Weathered Plastic Waste Enrichment. **Environmental Science and Technology**, v. 57, n. 37, p. 13901–13911, 19 set. 2023.

TEH, J. W.; RUDIN, Alfred; KEUNG, John C. A review of polyethylene–polypropylene blends and their compatibilization. **Advances in Polymer Technology**, v. 13, n. 1, p. 1–23, 1 mar. 1994.

TRAMONTINA, Robson *et al.* Sustainable biosynthetic pathways to value-added bioproducts from hydroxycinnamic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 13, p. 4165–4185, 1 jul. 2023.

WANG, Hongzhe *et al.* Biofilm formation promoted biodegradation of polyethylene in *Gordonia polyisoprenivorans* B251 isolated from bacterial enrichment acclimated by hexadecane for two years. **Chemosphere**, v. 344, 1 dez. 2023.

WANG, M.; BONFIELD, W. Chemically coupled hydroxyapatite-polyethylene composites: Structure and properties. **Biomaterials**, v. 22, n. 11, p. 1311–1320, 1 jun. 2001.

WEI, Ren; OESER, Thorsten; ZIMMERMANN, Wolfgang. Synthetic polyester-hydrolyzing enzymes from thermophilic actinomycetes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 89, p. 267–305, 2014.

WEI, Ren; ZIMMERMANN, Wolfgang. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? **Microbial biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1308–1322, 1 nov. 2017.

WRÓBEL, Mariusz *et al.* Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. **Microbiological Research**, v. 267, p. 127251, 1 fev. 2023.

XU, Fuqian *et al.* Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: A good candidate for large-scale production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 9, p. 3965–3974, 30 jan. 2014.

YANG, Yu *et al.* Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 2. Role of Gut Microorganisms. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 20, p. 12087–12093, 20 out. 2015.

- YAO, Zhuang; SEONG, Hyeon Jeong; JANG, Yu Sin. Environmental toxicity and decomposition of polyethylene. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 242, 1 set. 2022.
- YOON, Seok Hwan *et al.* A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 10, p. 1281–1286, 1 out. 2017.
- YOSHIDA, Shosuke *et al.* A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). **Science**, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, 11 mar. 2016.
- YU, Shengzhu *et al.* Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for producing branched chain amino acids. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2021.
- YUN, Seung Do *et al.* Exploring a New Biocatalyst from *Bacillus thuringiensis* JNU01 for Polyethylene Biodegradation. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 10, n. 6, p. 485–492, 13 jun. 2023.
- YUSOFF, Durratul Fatini *et al.* Newly Isolated Alkane Hydroxylase and Lipase Producing *Geobacillus* and *Anoxybacillus* Species Involved in Crude Oil Degradation. **Catalysts** **2020**, Vol. 10, Page 851, v. 10, n. 8, p. 851, 1 ago. 2020.
- ZAHRA, Sahebnazar *et al.* Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. **Waste Management**, v. 30, n. 3, p. 396–401, 1 mar. 2010.
- ZAMPOLLI, Jessica *et al.* Insights into the biodegradation of polycaprolactone through genomic analysis of two plastic-degrading *Rhodococcus* bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1284956, 2023.
- ZAMPOLLI, Jessica *et al.* Insights into polyethylene biodegradative fingerprint of *Pseudomonas citronellolis* E5 and *Rhodococcus erythropolis* D4 by phenotypic and genome-based comparative analyses. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, p. 1472309, 12 dez. 2024.
- ZHANG, Tingting *et al.* Biodegradation of polystyrene and polyethylene by *Microbacterium esteraromaticum* SW3 isolated from soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 274, p. 116207, 1 abr. 2024.
- ZHOU, Yujie *et al.* Microplastics in soils: A review of methods, occurrence, fate, transport, ecological and environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 748, p. 141368, 15 dez. 2020.

ANEXOS

Tabela 5 Heatmap da atividade metabólica da bactéria *A. ruyensis* obtido com a EcoPlate™ ao longo de 144 horas

	0hr	24hr	48hr	72hr	96hr	120hr	144hr
Carbon Substrate							
Polymers							
Tween 40	0,0171	-0,04937	-0,06383	0,087633	-0,1004	-0,07377	-0,09023
Tween 80	0,0490333	-0,05497	-0,07193	-0,1086	-0,14343	-0,0873	0,0266
α-Cyclodextrin	-0,033733	0,1733	0,130067	0,112533	0,107067	0,146367	0,1654
Glycogen	0,0022333	0,169733	0,0962	0,396133	0,095967	0,135133	0,135433
Carbohydrates							
Glucose1-Phosphate	-0,003467	0,092867	0,1131	0,014667	0,0718	0,079633	-0,13517
D,L-α-Glycerol Phosphate	0,0034333	0,050333	0,0805	-0,02917	0,076867	0,095467	0,0829
D-Cellobiose	0	0,0649	0,1108	0,157333	0,0801	0,108933	0,102133
α-D-Lactose	-0,0289	0,0336	0,035733	-0,11253	0,064	0,078333	0,062533
β-MethylD-Glucoside	0,0220667	0,0103	0,027767	0,014833	0,0074	0,003133	0,0039
D-Xylose	0,0775	0,120733	0,177767	0,171333	0,144567	0,154333	0,1669
i-Erythritol	-0,0162	0,0798	0,067333	0,128533	0,0454	0,066767	0,0678
D-Mannitol	0,0008	0,133133	0,163167	0,143733	0,122867	0,1683	0,191433
N-Acetyl-D-Glucosamine	-0,003433	0,052033	0,1305	0,102667	0,075067	0,112933	0,134367
Carboxylic Acids							
Pyruvic Acid Methyl Ester	0,0227	0,1399	0,141433	0,152867	0,131433	0,152067	0,153
D-Glucosaminic Acid	0,0124333	0,163767	0,183567	0,1095	0,0968	0,120433	0,121133
D-Galactonic Acid γ-Lactone	0,0110667	0,0443	0,027267	0,028833	-0,0108	0,054433	-0,0744
D-Galacturonic Acid	0,0242667	-0,011	0,037433	-0,05927	-0,01237	0,014633	0,022133
γ-Amino Butyric Acid	-0,001933	0,056633	0,114133	-0,0056	0,033867	0,065267	0,0622
Itaconic Acid	0,0080667	0,1242	0,177433	0,226133	0,2057	0,248133	0,240667
α-Keto Butyric Acid	-3,33E-05	0,146233	0,259733	0,466967	0,2142	0,239033	0,255733
D-Malic Acid	0,0184667	0,081733	0,150133	0,1816	0,150067	0,173167	0,1497
Amino acids							
L-Arginine	0,0224333	0,0552	0,054367	0,019467	0,0486	0,052767	0,0464
L-Asparagine	-0,0397	-0,00253	0,042467	-0,06333	-0,01217	0,0141	0,013833
L-Phenylalanine	-0,020567	0,0229	0,0164	-0,0262	-0,0444	-0,0705	-0,0143
L-Serine	0,0023667	0,077233	0,160033	0,156567	0,165333	0,1837	0,178967
L-Threonine	-0,003267	0,0394	0,098267	0,218	0,087633	0,116233	0,122833
β-HydroxyGlycyl-L-Glutamic Acid	0,0079667	0,082933	0,160333	0,2103	0,141067	0,1504	0,145333
Amines							
Phenylethylamine	-0,0035	0,109367	0,155267	0,077367	0,135467	0,163833	0,1583
Putrescine	0,0124667	0,050433	0,0849	0,0582	0,0993	0,094433	0,096333
Phenolic Acids							
2-Hydroxy Benzoic Acid	-0,0013	-0,0657	-0,0343	-0,0628	-0,0852	-0,05023	-0,03493
4-Hydroxy Benzoic Acid	-0,049967	-0,03837	0,017333	-0,0112	-0,0597	-0,2418	-0,01473

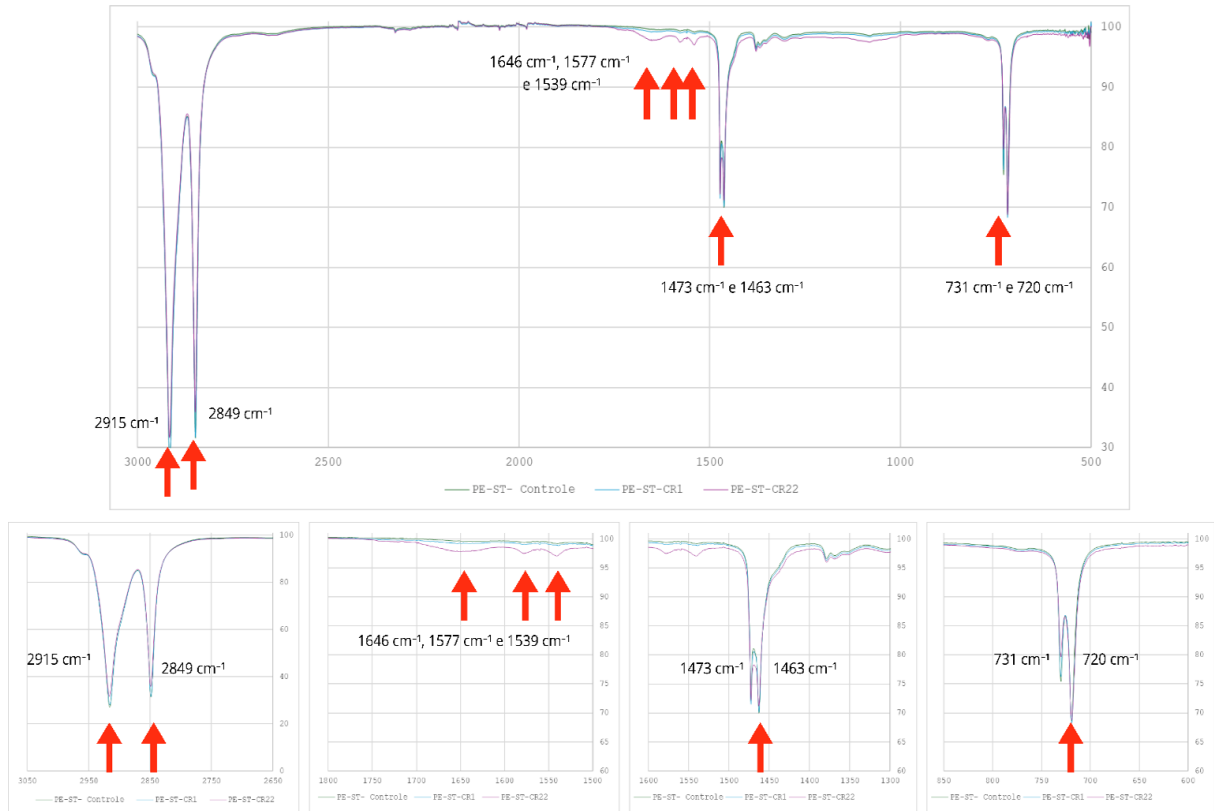
Fonte: Autoria própria.

Tabela 6 Heatmap da atividade metabólica da bactéria *C. composti* em EcoPlate™ ao longo de 144 horas.

Carbon Substrate	0hr	24hr	48hr	72hr	96hr	120hr	144hr
Polymers							
Tween 40	-0,0104	0,6423	0,544	0,5168	0,5583	0,454	0,412400027
Tween 80	-0,0252	0,5675	0,625333	0,645067	0,655493	-0,10417	0,26273336
α-Cyclodextrin	-0,0134	0,035233	0,086867	0,083467	0,110067	-0,03397	-0,079266608
Glycogen	0,003067	0,165133	0,4833	0,4915	0,3205	0,117967	0,019566695
Carbohydrates							
Glucose1-Phosphate	-0,02173	0,056867	0,090733	0,046367	0,010067	-0,1097	0,010200004
D,L-α-Glycerol Phosphate	-0,02197	0,0617	0,1248	0,120733	0,066367	-0,04737	-0,140299956
D-Cellobiose	-0,02483	0,056667	0,041367	-0,01243	-0,07937	-0,18763	-0,238299986
α-D-Lactose	-0,0227	0,077533	0,092133	0,057733	-0,0033	-0,08573	-0,148199975
β-MethylD-Glucoside	-0,0077	-0,01073	-0,0118	-0,04113	-0,01447	-0,0277	-0,020566622
D-Xylose	0,038133	-0,00237	-0,06123	-0,55293	-0,12547	-0,19867	0,078633368
i-Erythritol	-0,00877	-0,0205	-0,03313	-0,0331	0,069967	-0,03717	-0,118999938
D-Mannitol	-0,00897	0,018667	0,0332	0,0175	0,051667	-0,10193	-0,150266627
N-Acetyl-D-Glucosamine	-0,01317	0,063033	0,1	0,077167	0,031733	-0,02857	-0,12256664
Carboxylic Acids							
Pyruvic Acid Methyl Ester	-0,01557	-0,0338	-0,06447	-0,08487	0,009067	-0,06743	-0,103066623
D-Glucosaminic Acid	-0,02147	-0,0035	0,0393	-0,02117	-0,06353	-0,18073	-0,23726666
D-Galactonic Acid γ-Lactone	-0,00273	-0,01677	0,024767	-0,04383	-0,00813	-0,06443	-0,084399958
D-Galacturonic Acid	-0,00233	0,012167	-0,02387	-0,09453	-0,08087	-0,16227	-0,193899949
γ-Amino Butyric Acid	-0,01557	0,057567	0,088133	0,068467	0,063133	-0,02233	-0,128599962
Itaconic Acid	-0,02007	0,096567	0,153433	0,149567	0,137767	0,088667	-0,040533304
α-Keto Butyric Acid	-0,0147	-0,109	-0,18847	-0,60406	-0,2804	-0,8061	-0,32249999
D-Malic Acid	-0,02227	0,004833	0,0102	-0,00787	-0,07677	-0,20583	-0,281066616
Amino acids							
L-Arginine	-0,00517	0,065433	0,114267	0,061033	0,104867	0,051533	1,98161E-11
L-Asparagine	-0,0027	0,034033	0,021367	-0,01567	0,0296	-0,03323	4,22211E-10
L-Phenylalanine	-0,01023	0,024467	0,057733	0,006033	0,0709	0,010967	-0,300689971
L-Serine	-0,0084	0,046	0,0926	0,092933	0,0759	-0,02667	-0,339066584
L-Threonine	-0,01633	0,081233	-0,03837	-0,04877	0,0178	-0,09517	2,13267E-10
β-HydroxyGlycyl-L-Glutamic Acid	-0,0183	0,021467	0,0119	-0,0835	-0,1033	-0,194	3,7674E-10
Amines							
Phenylethylamine	-0,0212	-0,09123	-0,05113	-0,10817	-0,13787	-0,26657	3,70402E-10
Putrescine	-0,01607	0,018333	-0,01747	-0,0682	-0,11877	-0,2567	3,16783E-10
Phenolic Acids							
2-Hydroxy Benzoic Acid	-0,00407	-0,1331	-0,2307	-0,30527	-0,23757	-0,4479	-0,46206664
4-Hydroxy Benzoic Acid	-0,01553	-0,13813	-0,21893	-0,29367	-0,24657	-0,23163	-0,396933297

Fonte: Autoria própria.

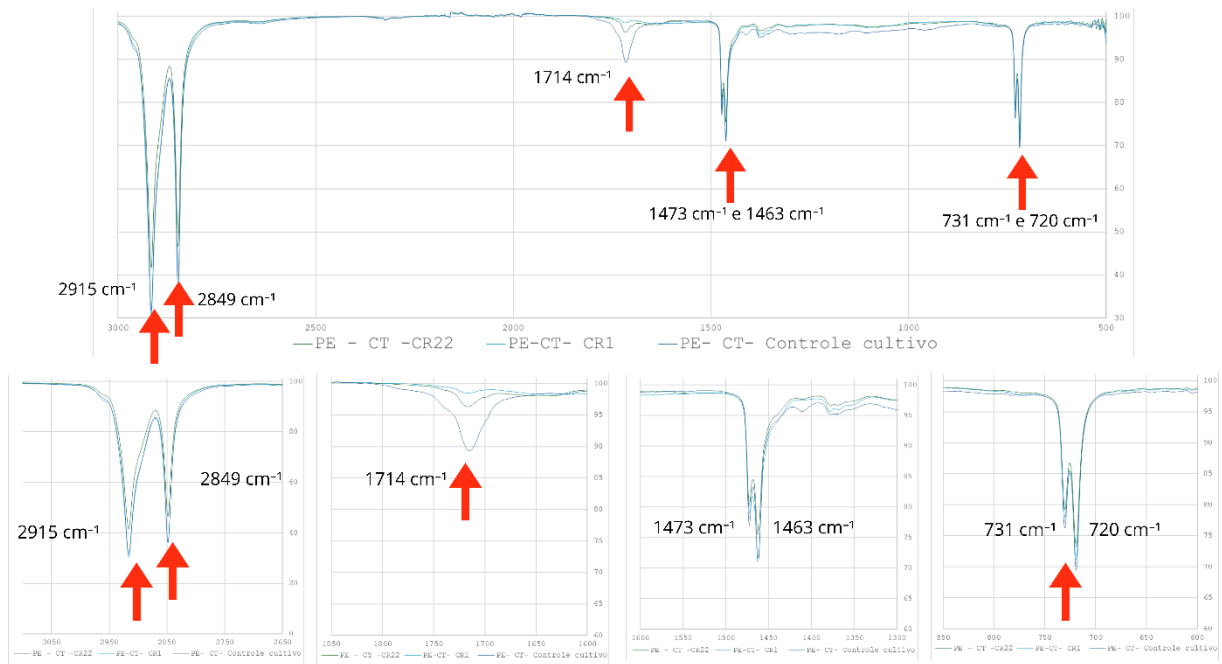
Figura 30- FTIR do PEBD sem pré-tratamento em cultivo com a CR1 e CR22



Legenda: Magnificações do FTIR do plástico PEBD sem tratamento de oxidação avançada em cultivo com *C. composti* e *A. rufipes*. Legenda: PE-CR22 em rosa (PEBD, sem tratamento de oxidação avançada, com *C. composti*); PE- controle em verde (PEBD, sem tratamento de oxidação avançada, sem bactéria); PE-CR1 em azul (PEBD, sem tratamento de oxidação avançada, com *A. rufipes*).

Fonte: Autoria própria.

Figura 31- FTIR do PEBD sem pré-tratamento em cultivo com a CR1 e CR22



Legenda: Magnificações do FTIR do plástico PEBD com tratamento de oxidação avançada em cultivo com *C. composti* e *A. rufipes*. Legenda: PE-CT- CR22 em verde escuro (PEBD, com tratamento de oxidação avançada, com *C. composti*); PE- CT controle em azul escuro (PEBD, com tratamento de oxidação avançada, sem bactéria); PE-CT-CR1 em azul claro (PEBD, com tratamento de oxidação avançada, com *A. rufipes*).

Fonte: Autoria própria.

APENDICE

Biotecnologia

Agência

Pesquisadores brasileiros encontram bactéria capaz de transformar lixo plástico em bioplástico

30 de janeiro de 2025

Nomeado BR4, o microrganismo decompõe o PET, produzindo PHB – um biopolímero de alta qualidade que pode ser empregado na fabricação de embalagens sustentáveis e em aplicações biomédicas

José Tadeu Arantes | Agência FAPESP – Estudo brasileiro obteve resultados promissores na utilização de microrganismos para a degradação de plásticos e a produção de bioplásticos, avançando também no entendimento de enzimas e vias bioquímicas envolvidas no processo. Os detalhes foram **descritos** no periódico *Science of The Total Environment*.





A reportagem publicada pela Agência FAPESP destaca principalmente a bactéria BR4 como responsável pela degradação e produção de bioplástico. No entanto, a cepa CR22 (*C. composti*), que é o foco desta dissertação de mestrado, também é mencionada na matéria, o que evidencia seu reconhecimento e relevância científica. Essa citação reforça a importância de pesquisas voltadas à biotransformação de resíduos plásticos por bactérias com potencial biodegradador. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/pesquisadores-brasileiros-encontram-bacteria-capaz-de-transformar-lixo-plastico-em-bioplastico/53808>