

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

INDUÇÃO HALOFÍLICA DE COMUNIDADE MICROBIANA PARA
BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS EM AMBIENTES MARINHOS

SETEMBRO

2023

VALÉRIA DE SOUZA IVO

INDUÇÃO HALOFÍLICA DE COMUNIDADE MICROBIANA PARA
BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS EM AMBIENTES MARINHOS

Trabalho de Conclusão de Curso do
Programa de Graduação em Licenciatura em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Renato Nallin
Montagnolli

ARARAS

2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

VALÉRIA DE SOUZA IVO

INDUÇÃO HALOFÍLICA DE COMUNIDADE MICROBIANA PARA
BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS EM AMBIENTES MARINHOS

Monografia apresentada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Data da defesa: 5 de setembro de 2023

Resultado: APROVADA

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnoli
Universidade Federal de São Carlos

Me. Camila Gruber Chiaregato
Universidade de São Paulo

Me. Biana Pelissari Gadanhoto
Universidade Federal de São Carlos

Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Aos meus pais, por, mesmo que não compreendam o que de fato eu pesquiso, me apoiam, me motivam a dar o meu melhor.

Ao meu orientador Renato, por todo o suporte e direcionamento. A Biana e os colegas de laboratório, pela ajuda em momentos de dúvida.

Aos bons amigos que fiz durante a minha trajetória na graduação, Aline e Gabi.

As pessoas que passaram por minha vida e que contribuíram de alguma forma com a minha evolução tanto acadêmica quanto pessoal.

E por fim, a mim, por não desistir diante de tantos obstáculos.

Obrigada.

RESUMO

O desenvolvimento de tecnologias para o combate ao microplástico no ambiente marinho, contribuem para atingir as metas da Década do Oceano na Agenda 2030. Nesse contexto, essa pesquisa explora a eficiência de degradação do microplástico (5 mm) do tipo polipropileno (PP) pelos halofílicos induzidos do solo simulando as condições marinhas (salinidade 3,5%) como uma alternativa otimizada de despoluição, avaliando a degradação microbiana pela evolução de CO₂, visto que os microrganismos de solo possuem uma plasticidade nutricional podendo buscar fontes alternativas de alimento e quando capazes de sobreviver a ambientes com alta salinidade são classificados como microrganismos halofílicos, sendo essa classe com maior propensão a degradar polímeros. Já o uso do PP como material a ser degradado, deve-se ao fato de ser um dos materiais plásticos não biodegradáveis mais produzidos mundialmente e sua presença nos oceanos também é a maior. Diante disso, as quatro bactérias foram selecionadas do solo coletado nas dependências da UFSCar-CCA (Araras) e induzidas ao meio simulado marinho. Essas bactérias compuseram os ensaios respirométricos de biodegradação, com duração de 56 dias, em que foram realizadas titulações semanais para medir a produção de CO₂, sendo este o principal método escolhido para avaliar a biodegradação do PP. O material foi submetido a dois tratamentos: um com exposição à UV (PPt UV) e o outro sem tratamento (PPi). Testes subsequentes verificaram a interação e as transformações no polímero, tal como a (i) colorimetria, (ii) a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), (iii) microscopia eletrônica de varredura (MEV), (iv) o percentual de perda de massa, (v) ensaios de consumo de substrato em meio sólido para avaliar a presença de microrganismos incrustados no PP após a biodegradação, e (vi) testes de ecotoxicidade com *Lactuca sativa*. Os resultados da biodegradação pela produção de CO₂, indicaram atividade para todos os quatro isolados, identificados como AS1, AS3, AS4 e AS5, sendo as linhagens AS1 e AS4 as com maior efetividade para degradar o PP. Os dados referente a biodegradação do PP pela linhagem AS1 quando consome o PPt (UV) e o PPi, obtém uma produção superior de CO₂, sendo um diferencial de 28,3% e 20%, respectivamente, a mais comparado com o grupo controle em que se encontra a linhagem AS1 consumindo somente o meio de cultura e quando comparado os dados do PPt (UV) e do PPi associados a linhagem AS4 é possível observar um aumento de 17% a mais quando o PP sofre tratamento UV. Outro dado interessante é a toxicidade presente no substrato resultante da biodegradação do PP sobre todas as linhagens, provando que deve-se explorar os caminhos de degradação deste polímero a fim de desenvolver melhores estudos. Portanto, a partir desse experimento, a avaliação da biodegradação do PP pelos microrganismos de solo induzidos ao meio marinho, trouxe significativos resultados de biodegradação, principalmente das linhagens AS1 e AS4, obtendo uma degradação oxidativa ainda maior quando o PP é tratado com UV, revelam serem microrganismos com grande potencial biotecnológico para degradação de PP em águas marinhas. Essa pesquisa ainda contribui para discussões mais aprofundadas sobre os mecanismos de adaptação dos microrganismos e suas múltiplas funcionalidades, além de propor estudos sobre a toxicidade dos subprodutos da biodegradação com outros organismos-testes.

Palavras-chave: Oceano; Microrganismos de solo; Indução; Biodegradação; Polipropileno

ABSTRACT

The development of technologies for combating microplastics in the marine environment contributes to achieving the goals of the Ocean Decade in the 2030 Agenda. In this context, this research investigates the degradation efficiency of 5mm polypropylene (PP) microplastics by halophilic microorganisms induced from soil under simulated marine conditions (salinity 3.5%) as an optimized alternative for depollution. The study evaluates microbial degradation by monitoring the evolution of CO₂. The four colonies selected were obtained from soil collected at UFSCar-CCA (Araras) and were induced in the simulated marine environment. These bacteria were selected for respirometric assays lasting 56 days. Weekly titrations were conducted to measure CO₂ production, which served as the primary mechanism for assessing PP biodegradation in two states: one treated with UV initially and the other untreated. Subsequent tests investigated polymer interactions and transformations using colorimetry, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and weight loss percentage. Substrate consumption assays followed to assess the presence of microorganisms embedded in PP after biodegradation, along with ecotoxicity tests involving *Lactuca sativa*. The results of biodegradation, as indicated by CO₂ production, were positive for all four colonies—AS1, AS3, AS4, and AS5—with AS1 and AS4 demonstrating the highest affinity for PP degradation. The data on the biodegradation of PP by the AS1 strain when it consumes PPt (UV) and the PPI, obtained a higher production of CO₂, with a difference of 28.3% and 20%, respectively, compared with the control group in which the AS1 strain consumed only the culture medium and when comparing the PPt (UV) and PPI data associated with the AS4 strain, it is possible to observe a 17% increase when the PP UV-treated. Another interesting finding is the toxicity of the substrate resulting from the biodegradation of PP on all the strains, proving that the degradation pathways of this polymer should be explored in order to develop better studies. Therefore, from this experiment, the evaluation of PP biodegradation by soil microorganisms induced into the marine environment brought significant biodegradation results, mainly from the AS1 and AS4 strains, obtaining even greater oxidative degradation when the PP is UV-treated, revealing that they are microorganisms with great biotechnological potential for PP degradation in marine waters. This research also contributes to more in-depth discussions on the adaptation mechanisms of microorganisms and their multiple functionalities, as well as proposing studies on the toxicity of biodegradation by-products with other test organisms..

Keywords: Ocean; Soil microorganisms; Induction; Biodegradation; Polypropylene

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do polipropileno	20
Figura 2. Etapas de montagem dos ensaios de indução halofílica aplicado às comunidades microbianas de solo	26
Figura 3. Conjunto elétrico da câmara de fotodegradação, consiste de (A) reator eletrônico para lâmpada fluorescente tubular 15W ultravioleta, (B) um par de soquetes para lâmpada T8 e (C) uma lâmpada tubular fluorescente T8 germicida UV-c 15W de 45 cm.	27
Figura 4. Montagem da caixa de fotodegradação. Caixa de fotodegradação, feita de caixa de isopor de 45 L, com 40 cm de comprimento, 30,5 cm de largura e 36 cm de altura é composta de (A) uma tampa revestida de papel alumínio e instalado o reator eletrônico com a extensão e (B), com uma vareta de ferro de 50 cm na transversal e papel alumínio no seu interior.....	27
Figura 5. Instalação da caixa de fotodegradação (A) instalação da lâmpada UV-c com o aparato eletrônico na caixa de isopor com o polímero de polipropileno sob um recipiente de vidro e um recipiente de vidro com sal grosso para reter a umidade e (B) caixa de fotodegradação fechada e ligada na tensão 110w.....	28
Figura 6. Pesagem do microplástico PP em balança analítica.....	32
Figura 7. Diâmetro do polímero PP medido com o auxílio de uma régua	33
Figura 8. Modelo respirométrico modificado. (A) recipiente fechado hermeticamente (sistema semi-fechado), (B) ambiente simulado marinho (solução marinha; plástico; inóculo - fundo do frasco maior - seta azul) e um frasco menor (seta preta) pendurado por um barbante na abertura do recipiente maior, com o reagente hidróxido de potássio (KOH).....	34
Figura 9. Avaliação da turbidez pela escala nefelométrica de McFarland	35
Figura 10. Titulação com HCl do CO ₂ associado ao KOH coletados dos ensaios respirométricos, com o auxílio de uma bureta.....	36
Figura 11. Delimitação da disposição dos fragmentos de PP das triplicatas, coletados do grupo experimental (respirômetros FM e SM), posterior a biodegradação, em três zonas referente a cada inóculo para ensaios de consumo de substrato em placa.....	38
Figura 12. Ensaio de ecotoxicidade com sementes de <i>Lactuca sativa</i> contendo: o papel filtro, 10 sementes de <i>Lactuca sativa</i> , solução controle: água destilada estéril e solução substrato: meio líquido retirado do grupo experimental do ensaio respirométrico.....	39
Figura 13. Crescimento em placa de Petri das quatro colônias de bactérias selecionadas pelos ensaios de adaptação da microbiota nativa, sendo (A) AS1, (B) AS3,(C) AS4 e (D) AS5.....	40
Figura 14. Tempo total de descoloração nos ensaios colorimétricos. Eixo X representa os ensaios com os dados dos controles: branco, CM, Cpp, C1, C2, C3 e C4, bem como das amostras MO1, MO2, MO3 e MO4. O eixo Y mostra em minutos o tempo médio que cada ensaio quadruplicado levou para passar de azul para incolor. A composição dos frascos de colorimetria são: ensaios controle: branco (meio: solução marinha); CM (dcpip + meio); CI (meio + dcpip + as colônias AS1, AS3, AS4 e AS5); Cpp (dcpip + meio + poluente) e as amostras de tratamento identificadas como, MO (dcpip + meio + poluente + as colônias AS1, AS3, AS4 e AS5).....	42

Figura 15. Dados da produção acumulada de CO ₂ do grupo controle C1 (somente solução marinha), C2 (solução marinha + PPt (UV)) e C3 (solução marinha + PPi)	43
Figura 16. Dados da produção acumulada de CO ₂ do grupo controle C4, composta pela solução marinha associados as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.....	44
Figura 17. Dados da produção acumulada de CO ₂ do grupo experimental, especificamente dos espirômetros FM, composto pelo PPt (UV) e dos respirômetros SM, composto pelo PPi, ambos associado às linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.....	44
Figura 18. Dados comparativos do acúmulo de CO ₂ da colônia AS4 associado ao PPt (UV) e PPi.....	46
Figura 19. Dados da produção de CO ₂ da linhagem AS1 associada ao grupo controle C4 (solução marinha + linhagem AS1) e grupo experimental, nos ensaios FM e SM, que representam a biodegradação do PPt (UV) e do PPi, respectivamente.....	46
Figura 20. Espectro FTIR das amostras de PP, sendo PPi (PP sem tratamento/puro); PPt (UV) (PP tratado com UV); AS1-PPi (PP sem tratamento associado a linhagem AS1); AS1-PPt (UV) (PP tratado com UV associado a linhagem AS1); AS4-PPi (PP sem tratamento associado a linhagem AS4); AS4- PPt (UV) (PP tratado com UV associado a linhagem AS4)	48
Figura 21. Imagens do MEV da superfície do fragmento de PPi (23-A) e do PPt (UV) (23-B), em magnificação x1000.....	51
Figura 22. Imagens do MEV da superfície do fragmento de PP biotratado, referente a linhagem AS1 associado ao PPi (24-A) e do PPt (UV) (24-B), em magnificação x1000.....	52
Figura 23. Imagens do MEV da superfície do fragmento de PP biotratado, referente a linhagem AS4 associado ao PPi (25-A) e do PPt (UV) (25-B), em magnificação x1000.....	52
Figura 24. Diâmetros (mm) da colônia microbiana representados em barra conforme medidos ao longo de oito dias. Os dados representam a média entre as triplicatas de cada linhagem incrustada nos fragmentos de PPt (UV), coletados do grupo experimental, nos ensaios respirométricos (FM 22-33), referentes aos ensaios em triplicatas das linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.....	54
Figura 25. Diâmetros (mm) da colônia microbiana representados em barra conforme medidos ao longo de oito dias. Os dados representam a média entre as triplicatas de cada linhagem incrustada nos fragmentos de PPt (UV), coletados do grupo experimental, nos ensaios respirométricos (SM 34-45), referentes aos ensaios em triplicatas das linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.....	55
Figura 26. Ilustração da formação radial de crescimento microbiano em placa de Petri.....	57
Figura 27. Porcentagem de perda de peso da média das triplicatas de cada inóculo, após biodegradação, referente as porções coletadas do grupo experimental, especificamente dos respirômetros FM (22-33) e dos respirômetros SM (34-45), em que as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 estão associados ao PPt (UV) e PPi, respectivamente.....	57
Figura 28. Germinação total das sementes de <i>Lactuca sativa</i> nos ensaios do grupo controle.....	58
Figura 29. Germinação da semente da <i>Lactuca sativa</i> no substrato coletado do respirômetro FM-22, associado a linhagem AS1.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aumento gradual das concentrações de NaCl nos ensaios propostos.....	25
Tabela 2. Composição e concentração dos materiais para o teste de colorimetria.....	31
Tabela 3. Composição e nomenclatura dos ensaios de biodegradação pelo método respirométrico, sendo, os grupos controles os respirômetros C1-4 e os grupos experimentais o FM: inóculos 1,2,3 e 4 + PP com tratamento UV PPt (UV), SM: inóculo 1, 2, 3 e 4 + PP sem tratamento UV (PPi). Todos os ensaios foram feitos em triplicata. As numerações aplicadas sequencialmente indicam cada sistema respirométrico individual.....	33
Tabela 4. Caracterização das quatro linhagens de bactérias de forma visual/macrocópica (formato/coloração) e por microscopia.....	41
Tabela 5. Velocidade de crescimento radial (VCR), que se expressa pelo coeficiente angular da reta obtida da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo. Estão representadas as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 associadas PPt (UV) e PPi.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl microlitro

µm micrómetro

AS1 linhagem de bactéria número 1 bioprospectada do solo e induzida ao meio simulado marinho

AS3 linhagem de bactéria número 2 bioprospectada do solo e induzida ao meio simulado marinho

AS4 linhagem de bactérias número 3 bioprospectada do solo e induzida ao meio simulado marinho

AS5 linhagem de bactérias número 4 bioprospectada do solo e induzida ao meio simulado marinho

BaCl₂ cloreto de bário

BaCO₃ carbonato de bário

C carbono

C1 grupo controle no ensaio respirométrico composto somente pela solução marinha

C2 grupo controle no ensaio respirométrico composto pela solução marinha e o PPt (UV)

C3 grupo controle no ensaio respirométrico composto pela solução marinha e o PPI

C4 grupo controle no ensaio respirométrico composto pela solução marinha associada as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5

CI grupo controle no teste de colorimetria composto por solução marinha, DCPIP e pelo inóculo (microrganismo 1, 2, 3 ou 4)

CM grupo controle no teste de colorimetria composto somente de meio de cultura (solução marinha)

Cpp grupo controle no teste de colorimetria composto pela solução marinha, DCPIP e o polipropileno

CO₂ gás carbônico

COI - Comissão Oceanográfica Intergovernamental

DCPIP 2,6-diclorofenol-indofenol

DDE substância química 2,2 bis(p-clorofenil)- 1,1-dicloroetileno, dicloro- difenil-dicloroetileno

ONU - Organização das Nações Unidas

FTIR Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

FTIR-ATR Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplado a técnica de Reflectância Total Atenuada

HCl ácido clorídrico

KOH hidróxido de potássio

G gramas

G/L gramas por litro

G/mL gramas por mililitros

MEV microscopia eletrônica de varredura

MO grupo experimental composto pela solução marinha, DCPIP, polipropileno e os inóculos (microrganismo 1,2, 3 ou 4)

MP microplástico

NaCl cloreto de sódio

NP nonilfenol

ODS Objetivos do Desenvolvimento Sustentável

PP Polipropileno

PPi polipropileno in natura (puro)

PPt (UV) polipropileno tratado com UV

PE polietileno

PS poliestireno

PVC policloreto de vinila

PCB substância química bifenilas policloradas

PCP substância química fenciclidina

PAH substância química hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

RPM rotação por minuto

Respirômetro FM composto por solução marinha, PPt (UV) e as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 (cada uma em um respirômetro, sendo em triplicatas)

Respirômetro SM composto por solução marinha, PPi e as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 (cada uma em um respirômetro, sendo em triplicatas)

TOC The Ocean Cleanup

UV ultravioleta

VCR velocidade de crescimento radial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 DÉCADA DO OCEANO: PERSPECTIVAS E METAS.....	15
2.2 MICROPLÁSTICOS: DISTRIBUIÇÃO NOS OCEANOS E SUAS CONSEQUÊNCIAS.....	17
2.2.1 POLIPROPILENO (PP).....	19
2.3 USO DE MICRORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE POLÍMERO.....	20
2.3.1 INDUÇÃO HALOFÍLICA.....	22
2.4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO E INTERAÇÃO MICRORGANISMO- PLÁSTICO.....	23
3 OBJETIVO GERAL.....	23
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 INDUÇÃO HALOFÍLICA E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA.....	24
4.1.1 COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	24
4.1.2 ENSAIOS DE ADAPTAÇÃO DA MICROBIOTA NATIVA.....	24
4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA.....	25
4.2 FOTODEGRADAÇÃO DO MICROPLÁSTICO POLIPROPILENO.....	26
4.2.1 MONTAGEM DO EQUIPAMENTO DE FOTODEGRADAÇÃO.....	26
4.2.2 ANÁLISE COM FTIR-ART.....	29
4.2.3 ANÁLISE COM MEV.....	29
4.3 MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	30
4.3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES.....	30
4.3.2 MONTAGEM DA COLORIMETRIA.....	30
4.4 MÉTODO RESPIROMÉTRICO DE BARTHA E PRAMER.....	31
4.4.1 PREPARO DO POLIPROPILENO	32
4.4.2 MONTAGEM DOS RESPIRÔMETROS.....	33
4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO BACTERIANO NO RESPIRÔMETRO.....	35
4.4.4 MONITORAMENTO DE CO ₂ PRODUZIDO.....	35
4.4.5 QUANTIFICAÇÃO CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CO ₂	36
4.4.6 AVALIAÇÃO DE DETERIORAÇÃO DO POLÍMERO.....	36
4.5 ENSAIO DE CONSUMO DE SUBSTRATO EM PLACA.....	37

4.6 TESTE DE ECOTOXICIDADE.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA.....	40
5.2 MÉTODO COLORIMÉTRICO.....	41
5.3 MONITORAMENTO DE CO ₂ PRODUZIDO.....	43
5.4 ANÁLISE FTIR.....	48
5.5 ANÁLISE MEV.....	51
5.6 ENSAIO DE CONSUMO DE SUBSTRATO EM PLACA.....	54
5.7 AVALIAÇÃO DE DETERIORAÇÃO DO POLÍMERO.....	57
5.8 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO SUBPRODUTO.....	58
6 PRODUÇÃO DIDÁTICA.....	61
7 CONCLUSÃO	63
8 REFERÊNCIA.....	64

1 INTRODUÇÃO

O sistema oceânico, nas últimas décadas, ganhou mais visibilidade e com isso a intensificação de estudos científicos, com grandes descobertas, tal como seu importante papel nas condições climáticas e na grande gama de recursos biotecnológicos, por exemplo, que contribuíram positivamente com o setor econômico mundial. Com tudo, esse olhar mais abrangente para os oceanos revelou sérios problemas ambientais associados às ações humanas e o uso inadequado desses recursos naturais. Os estudos mostram que esses problemas causam desequilíbrio no ambiente marinho que interferem drasticamente no bom funcionamento desse ecossistema e conseqüentemente no Planeta Terra.(HATJE; CUNHA; COSTA, 2018; Millenium Ecosystem Assessment, 2005)

Além das mudanças climáticas que tem desestabilizado a resiliência dos oceanos, um dos maiores poluentes já registrados são as partículas micrométricas de plástico, conhecido como microplástico (FAUZIAH *et al.*, 2018). Sua relação com o ambiente marinho é a pior possível, podendo ser encontrado na camada superficial, na zona pelágica, na zona bentônica, no sedimento oceânico, bem como na biodiversidade marinha (EVERAERT *et al.*, 2018). Com a saturação de microplástico no território oceânico, a busca por métodos para minimizar e reduzir a quantidade deste poluente tem sido um dilema para a maioria dos países. O fato de serem micrométricos torna difícil a retirada dos detritos e com a constante fragmentação de meso-macro-plásticos a quantidade tende a aumentar.

Por ser uma preocupação global, em 2016 a Comissão Oceanográfica Intergovernamental da UNESCO (COI) fez uma campanha para chamar a atenção a pauta oceânica e em dezembro de 2017 na 72ª sessão da Assembleia Geral das Nações Unidas foi proclamado a criação da Década das Nações Unidas da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável, que se iniciou em 2021 e possui metas e objetivos para serem cumpridos até 2030 que está inserido na "Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável" (COI/UNESCO, 2019). Esses objetivos e estratégias que buscam o combate dos microplástico exploram, principalmente o desenvolvimento de tecnologias com o uso de Inteligência Artificial, uso de embarcações modificadas para a captura de fragmentos plásticos *in situ* e mais recentemente, porém ainda em estudo, potenciais biotecnológicos para degradação de microplásticos (NONNATO, 2021; TOC, 2022; HABIB *et al.*, 2020).

No que tange a degradação biótica de polímeros, estudos da plastisfera, ecossistema formado pela colonização de detritos plásticos por microrganismos, mostram o quão variável pode ser a microbiota, sendo formado por fungos, bactérias e até seres patogênicos (XIANG

et al., 2023). As discussões sobre o conjunto microbiano que compõe a plastisfera, a formação de biofilmes, a evolução e seleção de genes microbianos e seu conjunto enzimático, são recentes e demandam mais pesquisas para a compreensão da biodegradação de polímeros (OBERBECKMANN; LABRENZ, 2020; HOWARD *et al.*, 2023).

A partir disso, a atual pesquisa avalia o uso de microrganismos para otimização da biodegradação de microplásticos, com foco na seleção de colônias adaptadas de solo a um ambiente com suas propriedades físico-químicas semelhantes ao da água do mar, considerando que os microrganismos de solo possuem uma plasticidade nutricional, ou seja são capazes de buscar fontes alternativas de nutrientes (NEVES *et al.*, 1992), além disso quando adaptadas ao meio marinho simulado são consideradas microrganismos halofílicos, que segundo a literatura é a classe de microrganismos com mais propensão a degradar polímeros (KANEKAR *et al.*, 2012), sendo então organismos interessantes, no que se refere a associação dessas microrganismos com o microplástico podendo rapidamente contribuir para uma reorganização metabólica, favorecendo a biodegradação deste polímero.

Outro ponto a ser considerado nesta pesquisa é o tipo de polímero. O polipropileno (PP) é um polímero não biodegradável (JONES, 2020), em sua composição existem aditivos químicos que o tornam difíceis de biodegradar, porém tendem a fotodegradação, além disso, é um dos polímeros mais presentes nos oceanos. Portanto há uma grande necessidade de desenvolver pesquisas que possam trazer importantes contribuições, no que se refere a degradação biótica e estudos sobre as toxinas que podem ser liberadas após sua degradação, sendo assim a atual pesquisa tem como foco a biodegradação do PP por microrganismos bioprospectados do solo em meio simulado marinho, para somar esforços no combate ao microplástico nos oceanos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DÉCADA DO OCEANO: PERSPECTIVAS E METAS

A Década das Nações Unidas da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável, que se iniciou em 2021, se encontra dentro da “Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável” (COI/UNESCO, 2020), nessa agenda, foram definidos, em 2015, 17 objetivos e 169 metas, adotadas pela Organização das Nações Unidas (ONU), entrando em vigor em 2016 (IPEA, 2018). Dos Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável (ODS) o referente ao oceano é o Objetivo 14: “Conservação e uso sustentável do oceano, dos mares e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável”

(GONÇALVES, 2021) e a meta 14.1 de: "Até 2025, prevenir e reduzir significativamente a poluição marinha de todos os tipos, especialmente a advinda de atividades terrestres, incluindo resíduos marinhos e a poluição por nutrientes" (Nações Unidas Brasil, 2023) ela prevê ações para o combate ao plástico marinho.

O movimento pela Década do Oceano se iniciou em 1960 com a incorporação dessa temática nas pautas das Conferências da ONU, os estudos dos oceanos garantiu o descobrimento de sua importância no clima e nas atividades antropológicas (TURRA; PINHO; ANDRADE, 2021). Ações em prol ao oceano foram elaboradas, tal como a IV Conferência Internacional sobre o Lixo Marinho, em 2011, em Honolulu, Havaí, que elaborou dois documentos importantes, o Compromisso de Honolulu e as Estratégias de Honolulu (TURRA, *et al.*, 2020). O compromisso de Honolulu se refere a intenção de grupos diversos na união para combater o problema dos resíduos nos mares e a Estratégia de Honolulu "tem por objetivo servir como instrumento de gestão para reduzir os impactos causados por esses resíduos, por meio de ações que controlem suas fontes marinhas e terrestres e que diminuam a quantidade de resíduos já existentes no meio ambiente" (TURRA *et al.*, 2020).

Em referência ao lixo marinho, as estratégias de Honolulu, traz três objetivos, objetivo A: reduzir a entrada de resíduos no ambiente marinho por fontes terrestres (7 estratégias), objetivo B: reduzir entrada de resíduos no ambiente marinho por fontes marinhas (6 estratégias) e objetivo C: reduzir os impactos dos resíduos que já estão no ambiente marinho (6 estratégias) (UNEP; NOAA, 2011). A redução de resíduo sólido, principalmente o plástico do ambiente marinho se traduz no objetivo C2: "desenvolver e promover o uso de tecnologias e métodos para localizar e remover de forma eficaz, acúmulos de resíduos nos mares" (OLIVEIRA, 2013) que busca engajamento social, investimento na remoção de resíduos e desenvolvimento de novas tecnologias tendo como desafio maior a remoção dos microplásticos (TURRA, *et al.*, 2020).

As ações internacionais contribuíram para que o Brasil também se posicionasse para projetar as metas da Década do Oceano em suas pautas e nas ações de pesquisa, bem como na divulgação científica no país, sendo o MCTI (Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovações), representante do país na COI, criou o programa Ciência no Mar para fortalecer as atividades da ciências oceânicas nacionalmente (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2021), porém o fomento à pesquisa marinha partem, em sua grande maioria, de organizações governamentais.

A priorização dos recursos para a agenda marinha reflete em um investimento abaixo do ideal para se garantir estudos de qualidade no conhecimento do território oceânico, bem como no seu uso sustentável e conservação (TURRA; PINHO; ANDRADE, 2021). Apesar dos desafios de fomento e também de recursos humanos, os esforços dentro do país devem ser destacados e divulgados para que se possa ter futuramente um aumento nos investimentos e projetos significativos no combate aos resíduos marinhos.

No cenário global, estratégias para a redução de resíduos plásticos no ambiente marinho estão sendo desenvolvidos e um grande agente na ação de remoção de resíduos plásticos do oceano é o The ocean cleanup (TOC) que contempla o Objetivo C2 da Estratégia de Honolulu, e teve eficácia no ajuntamento dos resíduos e retirada dos plásticos localizados nas grandes manchas de lixo oceânico através de um sistema de arrasto. Na estrutura do TOC, dois navios ficam conectados por um sistema que "é composto por uma longa barreira em forma de U que guia o plástico para uma zona de retenção em sua extremidade" (TOC, 2022), ao serem puxados para dentro do navio ocorre uma seleção dos materiais plásticos, em que alguns vão ser reutilizados na fabricação de produtos, como óculos de sol e a outra parte é a não reutilizável, ambos seguem para terra firme para sua próxima destinação (TOC, 2022).

Este é um exemplo dentre muitos outros, porém isso não resolve o problema com os microplásticos, já que sua dimensão não permite a remoção do mesmo por esse método, portanto ainda há muito o que fazer para desenvolver mecanismos eficientes na remoção e destinação destes resíduos plásticos no ecossistema oceânico, esforços conjuntos das nações devem ser incentivados para garantir resultados promissores.

2.2 MICROPLÁSTICO: DISTRIBUIÇÃO NOS OCEANOS E SUAS

CONSEQUÊNCIAS

Os microplásticos têm causado grandes problemas no ambiente marinho, implicando até na instabilidade do ecossistema e no seus serviços ecossistêmicos. O resíduo plástico no mar foi realmente considerado um problema quando o navegador Charles Moore, em 1997, percorreu o Pacífico Norte, no Giro Subtropical, e se deparou com um grande amontoado de resíduos plásticos, fazendo a primeira observação significativa da quantidade de componentes plásticos nos oceanos e dando início a mobilização em prol dessa causa (MOORE; PHILLIPS, 2011). Essa distribuição superficial que Charles esbarrou em sua viagem, está associada à circulação oceânica que permite o acúmulo, em maior quantidade, em locais onde se formam os giros oceânicos, construindo as famosas "ilhas de plástico" (HALE *et al*, 2020), estima-se

que pelo menos 5,25 trilhões de partículas de plástico pesando 268.940 toneladas flutuam em mar (ERIKSEN *et al.*, 2014).

Nos últimos anos tem aumentado o número de pesquisas para quantificar e dimensionar o lixo plástico nos oceanos e através disso foi reconhecido que os menores fragmentos são os que mais causam grandes desequilíbrios no ecossistema marinho, se destacando os microplásticos (FAUZIAH *et al.*, 2018). Para nomear os diferentes fragmentos, a dimensão da partícula plástica é dividido em cinco tamanhos, sendo considerado nanoplástico aqueles menores que 0,001 mm; microplástico de escala bem pequena 0,001-0,02 mm, a de menor escala entre 0,1-0,02 mm e o de maior escala entre 1-5 mm; mesoplástico entre 5-25 mm e o macropástico identificado como superior a 25 mm (KERSHAW *et al.*, 2019).

Em relação ao microplástico, ele pode ser classificado como primário e secundário, o microplástico primário é aquele que foi fabricado no tamanho correspondente ao micro e o secundário se forma quando pedaços maiores se fragmentam devido a ações abióticas como a radiação solar e bióticas como a fragmentação pela interação microbiana ou de outras espécies no sistema marinho (NIHEI *et al.*, 2020) isso pressupõe que os resíduos plásticos que chegam ao oceano, ao longo do tempo vão se fragmentando e migram para dimensões de tamanho cada vez menores, justificando a abundância de microplástico nas diferentes zonas oceânicas.

Essa quantidade exorbitante de polímeros no ambiente marinho se dá pelo descarte indiscriminado de fontes terrestres, provenientes dos resíduos industriais, residenciais, hospitalares, comerciais e industriais, podendo chegar ao mar pela rede fluvial e pelo esgoto, bem como pelas praias, onde lixo plástico é descartado constantemente (ALJARADIN, 2020). As fontes marinhas estão atreladas a aquicultura, maricultura, pesca e transporte marítimo (ZAMORA *et al.*, 2020), outros microplásticos vêm transportados pelo vento e/ou por fenômenos naturais como tsunamis. Estudos mostram também que os microplásticos primeiramente ficam imersos por um tempo e por sofrer fotodegradação, abrasões mecânicas, interações químicas e biológicas podem ter sua estrutura degradada e/ou modificada e serem movidos para o fundo ou arrastados para as praias e áreas rasas, ainda é incalculável a quantidade existente no sedimento e no bioma marinho (MONTAGNER *et al.*, 2021).

Em se tratando da sua interação com a porção biótica, o microplástico por possuir uma superfície hidrofóbica adsorve substâncias nocivas (FONTES *et al.*, 2019), que podem ser identificadas muitas vezes como PBTs substâncias persistentes, bioacumulativas e tóxicas tendo a sua meia vida na água mais de 60 dias (PEDERSEN *et al.*, 2017). Um levantamento

de poluentes adsorvidos pelo tipo PP, destaca os PCPs, PCB, PAHs, DDEs, nonilfenol (NP) e fenantrene (ALIMI *et al.*, 2018). A ingestão dessas partículas plásticas juntamente com as toxinas tais como hidrocarbonetos e metais pesados (CAIXETA *et al.*, 2018) pela fauna marinha traz complicações no trato gastrointestinal. Fragmentos menores que um milésimo de milímetro (nanoplásticos) são capazes de atingir órgãos como fígado, rins e cérebro (JONES, 2019). Ambas as substâncias são poluentes com alta resistência à degradação e tem capacidade bioacumulativa e de biomagnificação, afetando todos os níveis da cadeia trófica (ARAÚJO; CAVALCANTI, 2016).

2.2.1 POLIPROPILENO (PP)

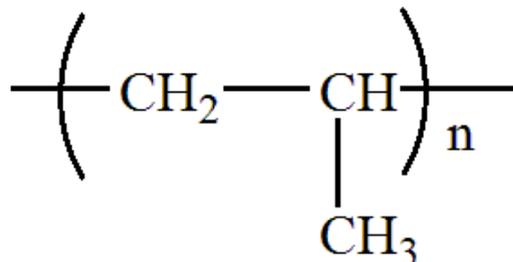
Existem diversos tipos de plásticos produzidos anualmente, já que os diversos arranjos moleculares podem originar uma variedade quase infinita de polímeros (IWANICKI, 2020). A estrutura molecular do PP está ilustrada na Figura 1. A resina de PP é termoplástica, ou seja, se funde por aquecimento e se solidifica por resfriamento, sendo um processo reversível (IWANICKI, 2020). Ele possui uma cadeia linear formada por monômeros de mesma natureza (homopolímeros), unidos por fortes ligações químicas (GLASER, 2019) e sua densidade é de 0,94-0,97 à uma temperatura de 23/4°C, com cristalinidade de 50% e vida útil de 10-600 anos (GLASER, 2019).

O PP é o segundo polímero mais produzido no mundo, em 2019 teve uma produção de 22,3% para material de uso único, ficando atrás somente do polietileno (PE). Seu uso é amplo, sendo usado na fabricação de vários eletrodomésticos, bem como utensílios, autopeças, embalagens, fibras têxteis e outros (IWANICKI, 2020). Acerca dos tipos mais abundantes nos oceanos, o PP é o mais presente seguido do polietileno (PE), o policloreto de vinila (PVC) e o poliestireno (PS) (SOBRAL; FRIAS; MARTINS, 2011). O PP, ao chegar no oceano de início permanece na superfície, pois possui baixa densidade, posteriormente, assim como os outros polímeros, pode ir para o fundo oceânico, devido às movimentações oceânicas e o incrustamento biótico que o torna mais pesado, levando-o ao fundo (NERLAND *et al.*, 2014).

A presença de microplásticos (MPs) na superfície do mar é de $1.81 \times 10^{15} \text{ m}^3$ sendo os microplásticos do tipo PE e PP os mais abundantes (EVERAERT *et al.*, 2018), já que, por possuírem baixa densidade são capazes de flutuar tendo uma distribuição de 0,925 g/cm³ e 0,91 g/cm³ respectivamente (NERLAND *et al.*, 2014). Rossatto *et al.* (2023) ao comparar coletas oceânicas em diferentes partes do mundo, mostra que compostos plásticos de PP, tem

o maior percentual em mares e oceanos (17,65%), águas costeiras (10,81%), baías (20%) e estuários (25%), devido ao grande descarte do mesmo.

FIGURA 1: Estrutura molecular do polipropileno



Fonte: wikipédia

2.3 USO DE MICRORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE POLÍMEROS

A biorremediação corresponde a um processo de tratamento que faz uso de microrganismos capazes de degradar e transformar compostos orgânicos em compostos menos complexos (LIMA *et al.*, 2015). Na biodegradação de materiais poluentes, a intenção é transformá-los em matéria orgânica mais rápida que em outras condições (ASHTER, 2016). Esse é um método ecologicamente favorável, já que a degradação por microrganismos é um processo natural. Os agentes microbianos são seres diminutos e em termos de números de espécie, a diversidade biológica no solo é composta de centena ou milhares de fungos e bactérias (BARDGETT; USHER; HOPKINS, 2005), sem contar com a microbiota presente na água, nos seres vivos e em habitats extremos.

Muitas espécies microbianas possuem aparatos bioquímicos e enzimáticos que sintetizam compostos poluentes de origem diversa. Suas reações bioquímicas buscam como fonte de energia o carbono (C) esse elemento químico é como um combustível para a realização de uma série de processos metabólicos para obter energia (LOPEZ; CARDOSO, 2016). Os microrganismos possuem rotas metabólicas diversas, podendo degradar diferentes compostos, as ações enzimáticas usadas na degradação biótica primária, resulta na produção de CO₂, nova biomassa e água em condições aeróbicas e metano em condições anaeróbicas (ASHTER, 2016). Alguns desses processos podem gerar subprodutos mais tóxicos do que os originais devido a reestruturação dos átomos e isso pode implicar na produção de um poluente mais agressivo, no entanto, as interações entre espécies microbianas podem fornecer uma solução para esse problema já que o subproduto de um pode ser fonte de energia para outro,

essa relação simbiótica é essencial para os vários ciclos biogeoquímicos e o equilíbrio dos ecossistemas (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016).

No que se refere a degradação biótica de polímero, o mesmo ocorre quando o microrganismo se encontra em um sistema que tenha uma macromolécula que não pode ser absorvida pela célula, mas com a sinalização para a produção de enzimas específicas que são lançadas no meio se faz a quebra em monômeros que serão disponibilizados como fonte de carbono para o crescimento microbiano (COSTA *et al.*, 2015). Para a biodegradação causar modificações químicas ou físicas é necessário condições específicas de umidade, temperatura, luminosidade, nutrientes e minerais (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006), sendo dividida em quatro etapas: biodeterioração (1) que é a formação de biofilmes e excreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que se acumulam nas fendas formadas pela degradação abiótica; biofragmentação (2) que é a quebra em monômeros pelas enzimas finalizando a ruptura dos poros e ligações químicas do polímero; assimilação (3) que é a interiorização dos monômeros pela célula e a mineralização (4) que é degradação do monômero que foi transportado para o interior por oxidação deixando como possível produto final CO₂ e H₂O (ALMEIDA *et al.* 2021).

O termo biodeterioração também é usado para descrever a ação microbiana sobre a superfície de um polímero, já que consiste na formação de um biofilme, que na realidade é uma matriz de biopolímero excretado pelos microrganismos que pode causar uma mudança estrutural ou morfológica (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Segundo Rogers *et al* (2020) as interações microrganismo-plástico alteram as características dos poluentes ao longo do tempo. Quando se refere a essas interações, outro termo ligado a isso é a plastisfera, que descreve o “ecossistema formado por microorganismos que colonizam detritos plásticos”(XIANG *et al*, 2023). De acordo com Rogers *et al.* (2020) “A interação entre microorganismos, ciclos biogeoquímicos e microplásticos pode determinar o destino ambiental do plástico marinho”. Os estudo da plastisfera trouxe algumas observações acerca da composição microbiana neste sistema, indicando que pode haver uma seleção de microrganismos que se agregam a massa polimérica devido a localização e que pode haver uma sucessão microbiana em detritos plásticos de acordo com sua origem e tempo de exposição no ambiente (XIANG *et al*, 2023), é necessário maiores estudos.

Em relação à biodegradação do polipropileno, também são poucos os estudos realizados, experimentos com fungos, tais como *P. Chysosporium* e *Engyodontium album* e outros como *Bacillus* e *Pseudomonas* demonstraram que pode haver degradação chegando a

uma perda de peso de até 0,65% e associado com tratamento térmico (UV) misturado com elementos metálicos podem chegar a 18,8% de perda de peso (KRUEGER *et al.*, 2015). Estudos, ainda apontam fatores que podem afetar a biodegradação de polímeros como um todo, sendo eles a morfologia e estrutura polimérica podendo influenciar na velocidade da biodegradação, o peso molar que determina sua propriedade física, sendo muito restritivo, podendo favorecer ou não o crescimento do microrganismo, seu formato, tamanho e aditivos presentes em sua constituição podem também limitar a ação microbiana e o grau de cristalinidade é outro ponto restritivo, já que a ligação microbiana no polímero ocorre em seções amorfas (locais com arranjos desordenados na estrutura) na superfície (ASHTER, 2016; GLASER, 2018).

Segundo Rogers *et al.* (2020) “As interações entre microrganismos e microplásticos alteram as características dos poluentes ao longo do tempo”, podendo indicar biodegradação. O processo de biodegradação abrange vários caminhos, considerando os diferentes tipos de polímeros, porém o crescente potencial para degradar essas moléculas, promove a evolução de bactérias eficientes na degradação de microplásticos (OBERBECKMANN; LABRENZ, 2020).

2.3.1 INDUÇÃO HALOFÍLICA

Os microrganismos halofílicos possuem grande potencial biotecnológico sendo considerado o melhor candidato para a biorremediação em águas salinas (KANEKAR *et al.*, 2012) podendo adotar estratégias enzimáticas capazes de biodegradar compostos recalcitrantes como o plástico (PIUBELI, 2011). Eles são seres capazes de sobreviver em ecossistemas hipersalinos, incluindo os organismos procariotos e eucariotos com capacidade de balancear a pressão osmótica do ambiente e a resistir aos efeitos de desnaturalização (KANEKAR, *et al.*, 2012). Segundo Kanekar, *et al.* (2012) os “halofílicos podem sobreviver e crescer em ambientes que limitam o crescimento da maioria dos outros organismos”, sendo assim os microrganismos halofílicos são candidatos interessantes, já que a adaptação, bem como a limitação nutritiva podem resultar em direcionar seu potencial de busca por nutrientes nas condições existentes no ambiente em que está, tornando-o um organismo com alto potencial biotecnológico.

2.4 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE BIODEGRADAÇÃO E INTERAÇÃO MICRORGANISMO-PLÁSTICO

Análises de biodegradação em polímeros são realizadas para verificar a interação do microrganismo com o plástico. Métodos físico-químicos são empregados com a finalidade de avaliar o grau de degradação do material, fornecendo dados consistentes, porém ainda não padronizados, já que para atingir todos os parâmetros ambientais deve-se haver mais estudos (VIEIRA, 2021). Entre os diversos testes e avaliação de biodegradação, o método de liberação de CO₂ pelo método respirométrico de Bartha e Pramer, topografia da superfície do polímero por microscopia eletrônica de varredura (MEV), identificação dos grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e ensaios ecotoxicológicos para avaliar a toxicidade do subproduto biológico, fazem parte de uma gama de normas que podem ser exploradas (ROGERS *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2015; FRANCHETTI, MARCONATO, 2006).

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a efetividade da indução halofílica de microrganismos de solo na biodegradação e na detoxificação de microplásticos de polipropileno tratados com UV em meio simulado marinho.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar microrganismos do solo capazes de sobreviver a um ambiente simulado marinho e caracterizá-los quanto a sua resposta de crescimento;
- Tratar o PP com UV em um fotodegradador construído e avaliar a sua influência na forma estrutural por FTIR e MEV;
- Analisar a interação dos isolados halofílicos induzidos com o PP, através da atividade metabólica, pelo método colorimétrico com indicador redox;
- Avaliar a influência do tratamento com UV e sem tratamento na biodegradabilidade do PP em meio simulado marinho por meio da evolução de CO₂ pelo método respirométrico;
- Dimensionar crescimento microbiano em ágar marinho, usando como única fonte de carbono o PP;
- Avaliar de forma estrutural o PP, após a biodegradação, através do FTIR e MEV;
- Avaliar a ecotoxicidade do subproduto de biodegradação provenientes do teste de respirometria para *Lactuca sativa*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INDUÇÃO HALOFÍLICA E CARACTERIZAÇÃO MICROBIANA

Microrganismos coletados do solo foram induzidos a se adaptar em condições físico-químicas semelhantes aos encontrados nos oceanos, utilizando um meio simulado marinho para testes em laboratórios. Para caracterizar e descrever as bactérias selecionadas, observações visuais e microscópicas foram realizadas.

4.1.1 COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

Os microrganismos utilizados neste experimento foram obtidos de uma amostra de solo coletada em uma mata dentro do *campus* da UFSCar de Araras nas proximidades das coordenadas 22° 18' 23.78"S 47° 23' 12.28"O, obtidas a partir do Google Earth. Essa área é predominantemente ocupada por nitossolos (YOSHIDA; STOFT, 2016). A amostragem de solo seguiu o método de coleta de solo da Embrapa (2012), em que o local da coleta foi delimitado e retirado, antes da coleta, a parte superior do solo (folhas secas, galhos) e com o auxílio de uma pá de jardinagem, em uma profundidade de 20 centímetros foram coletados 50 gramas de terra e colocado em saco plástico e armazenado em geladeira.

O solo foi peneirado usando uma peneira com malha 60 e abertura de 250 mm. Os grãos peneirados foram então pesados em uma balança analítica da marca Shimadzu. Uma quantidade de 5 gramas de solo foi diluída em 100 mL de água destilada estéril em um frasco Erlenmeyer (250 mL) e colocado sob agitação por 48 horas no Agitador Orbital Shaker da marca Tecnal, modelo TE-4200, a 22°C e 160 rpm.

4.1.2 ENSAIOS DE ADAPTAÇÃO DA MICROBIOTA NATIVA

O método de adaptação por exposição à concentração tem o intuito de modificar o caldo microbiano separado do solo seco a concentrações gradativamente maiores de cloreto de sódio (NaCl) até a quantia de 35 gramas por litro (g/L). O meio de cultura utilizado foi o caldo nutriente, contendo em sua formulação, em g/L, extrato de levedura (1 g), extrato de carne (2 g), peptona (5 g) e cloreto de sódio (5 g). Após a esterilização dos materiais e soluções, todas as etapas foram feitas dentro do fluxo laminar (em triplicatas) em cada fase do experimento.

A Tabela 1 ilustra as quantidades do aumento gradual das concentrações de NaCl, em que, a transferência de 1,0 mL do caldo microbiano com uma pipeta (1000 µl) para 9,0 mL da solução que contém caldo nutriente mais 0,075 g de cloreto de sódio em um tubo de ensaio, foi a primeira rodada de testes. Os tubos de ensaio contendo essa mistura foram

colocados sob agitação por 48 horas em temperatura de 22°C, a turbidez nos frascos indica crescimento microbiano. Selecionando o frasco com maior turbidez foi coletado 1 mL para ser pipetado em um tubo de ensaio com 9 mL da solução com 0,15 g de NaCl, fazendo o mesmo procedimento nos tubos com 0,225 g de NaCl até chegar aos tubos com 0,3 g de cloreto de sódio em 10 mL. Como o caldo nutriente já possui em sua formulação uma quantidade de 0,05 g de cloreto de sódio para 10 mL de solução, a amostra final ficou com 0,35 g de cloreto de sódio para 10 mL de solução. A quantificação de NaCl foi baseada na quantidade de salinidade que se encontra na água do mar, por essa razão há a necessidade de reajustar a concentração, para se adequar às condições de salinidade marinha, sendo a soma das concentrações de sais presentes no mar igual a 3,5%.

TABELA 1 - Aumento gradual das concentrações de NaCl nos ensaios propostos

Sequência de ensaios de adaptação	NaCl	Água destilada
1	0,075 g	10 mL
2	0,150 g	10 mL
3	0,225 g	10 ml
4	0,300 g	10 ml

fonte: autoria própria

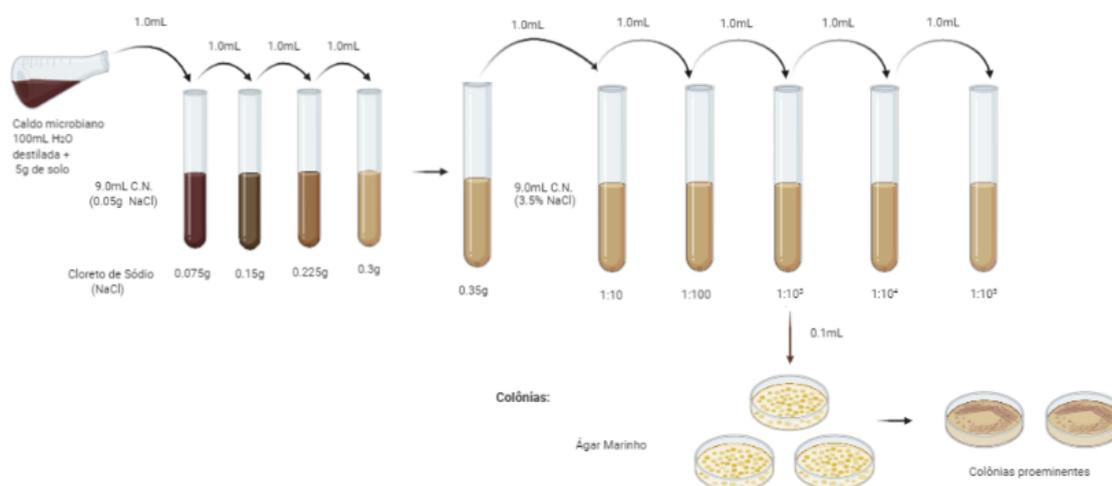
4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA

Após o aumento gradual da salinidade até chegar ao valor encontrado no ambiente marinho preparou-se um meio de cultura para se fazer a seleção e identificação dos microrganismos capazes de sobreviver em um ambiente salino. O meio de cultura há ser utilizado é denominado Ágar Marinho da fabricante Himedia. Na sua formulação contém os principais sais encontrados nesse ecossistema, sendo quantificado em gramas por litro, o cloreto de sódio (24 g), cloreto de cálcio (0,1 g), cloreto de potássio (0,7 g), cloreto de magnésio (5,3 g) e o sulfato de magnésio (7 g) e como fonte nutricional temos o extrato de levedura (5 g), extrato de carne (3 g) e o peptona (5 g), além do ágar (15 g) como agente solidificador.

Ao pesar os componentes do ágar marinho e autoclavar a 210°C por 20 minutos e vertido em placa de Petri, foi realizado a transferência com a pipeta de 0,1 mL da amostra do tubo denominado como 0,35 g de NaCl (meio salino), na placas de Petri (em triplicadas),

fazendo o espalhamento da solução com o auxílio da alça de Drigalski e deixado na incubadora por 48 horas em temperatura de 22°C, após esses período foram selecionadas as colônias proeminentes com o auxílio da alça de inoculação e colocadas na incubação, novamente, por 48 horas em temperatura de 22°C. A esquematização do procedimento de indução halofílica até o crescimento em placa de Petri se encontra na Figura 2.

FIGURA 2 - Etapas de montagem dos ensaios de indução halofílica aplicado às comunidades microbianas de solo.



Fonte: Autoria própria. Criado em BioRender.com

Posteriormente, foi realizada a contagem de colônias com o auxílio da lupa no intervalo de 48 horas e duas semanas, sendo selecionadas as quatro colônias proeminentes e com o microscópio óptico, utilizando a técnica de coloração de Gram, fez-se a caracterização dessas colônias.

4.2 FOTODEGRADAÇÃO DO MICROPLÁSTICO POLIPROPILENO

Para fazer a fotodegradação do microplástico PP seguiu-se o tutorial de Mena *et al.* (2020), para a construção de uma câmara de fotodegradação, porém fazendo a substituição por materiais mais acessíveis, para realizar o tratamento com UV dos microplásticos de polipropileno. Os microplásticos ficaram em exposição UV, dentro da caixa fechada, por aproximadamente 304 horas (13 dias).

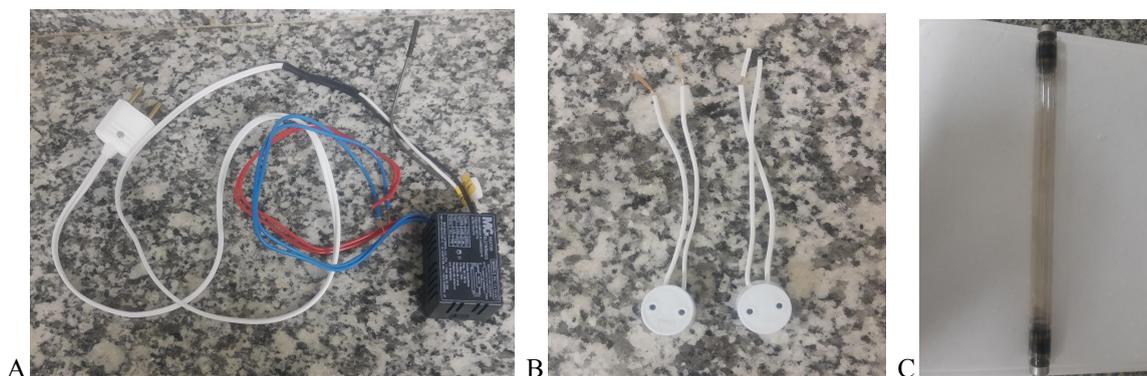
4.2.1 MONTAGEM DO EQUIPAMENTO DE FOTODEGRADAÇÃO

Para tornar mais acessível foram utilizados materiais de fácil acesso, tais como uma caixa de isopor que substituiu o de madeira usada no tutorial, papel alumínio para conter e

propagar a irradiação dos raios UV e um suporte para colocar a lâmpada UV, que pode ser de madeira ou algum material feito de ferro, que foi o usado no experimento.

Para o conjunto elétrico foi utilizado um reator eletrônico para lâmpada fluorescente tubular 15W ultravioleta (Figura 3- A), um par de soquetes para lâmpada T8 (Figura 3 - B) e uma lâmpada tubular fluorescente T8 germicida UV-c 15W de 45 cm (Figura 3 - C).

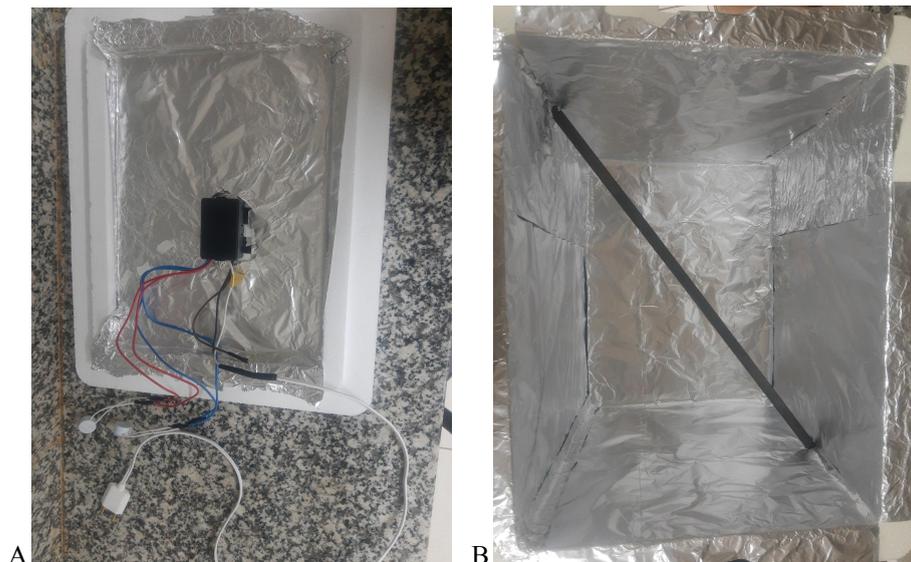
FIGURA 3: Conjunto elétrico da câmara de fotodegradação, consiste de (A) reator eletrônico para lâmpada fluorescente tubular 15W ultravioleta, (B) um par de soquetes para lâmpada T8 e (C) uma lâmpada tubular fluorescente T8 germicida UV-c 15W de 45 cm



Fonte: autoria própria

Para a caixa de fotodegradação foi escolhido uma caixa de isopor de 45 L, com 40 cm de comprimento, 30,5 cm de largura e 36 cm de altura, em que, o conjunto eletrônico com a extensão foi preso sob a tampa da caixa de isopor revestida de papel alumínio (Figura 4 - A) e dentro da caixa foi colocado uma vareta de ferro de 50 cm na transversal e papel alumínio no seu interior (Figura 4 - B).

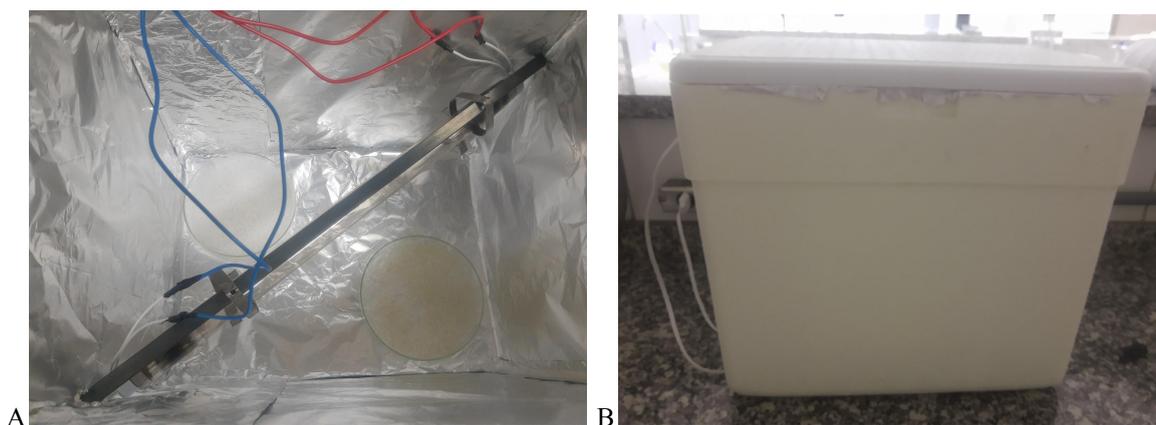
FIGURA 4: Montagem da caixa de fotodegradação. Caixa de fotodegradação, feita de caixa de isopor de 45 L, com 40 cm de comprimento, 30,5 cm de largura e 36 cm de altura é composta de (A) uma tampa revestida de papel alumínio e instalado o reator eletrônico com a extensão e (B), com uma vareta de ferro de 50 cm na transversal e papel alumínio no seu interior.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 5-A, mostra a instalação da lâmpada UV-c com o aparato eletrônico na caixa de isopor com o polímero de polipropileno (19 g) sob um recipiente de vidro posicionado na parte inferior e um recipiente de vidro com sal grosso (15 g) para reter a umidade, na parte superior. Na Figura 5-B a caixa de fotodegradação fechada e ligada na tensão 110w.

FIGURA 5: Instalação da caixa de fotodegradação (A) instalação da lâmpada UV-c com o aparato eletrônico na caixa de isopor com o polímero de polipropileno sob um recipiente de vidro e um recipiente de vidro com sal grosso para reter a umidade e (B) caixa de fotodegradação fechada e ligada na tensão 110w.



Fonte: autoria própria

Para fim de melhor compreensão, às citações relacionadas ao PP que sofreu fotodegradação com UV, foram representadas pela sigla PPt (UV) e o PP que não sofreu tratamento UV, recebeu a sigla PPi.

4.2.2 ANÁLISE COM FTIR-ATR

Os espectros de absorção de infravermelho foram obtidos pelo equipamento de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplado à técnica de reflectância total atenuada (FTIR-ATR) de modelo Tensor II da marca Bruker e o software usado foi o OPUS 7.5, que foi cedido para realização da análise, pela UFSCar-CCA (Araras). Inicialmente, para análise, foram selecionados dois fragmentos de PP de aproximadamente 5 milímetros, sendo um o PPt (UV) e o outro o PPi. O material permaneceu em sua forma original, pois através do modo ATR é possível analisar o material em sua forma sólida. Nessa técnica, a amostra é pressionada sob o cristal que incide uma luz infravermelha que reflete e se propaga pelo material, formando uma onda estacionária perpendicular à reflectância total do material, em função da profundidade de penetração e comprimento de onda. A análise de FTIR das amostras de polipropileno foram expressadas em espectros com uma resolução de 4 cm, com 64 varreduras em um intervalo de 4000 a 520 cm^{-1} . As bandas de absorção de luz formadas no final do processo são expressadas em gráfico, em que cada banda condiz com um grupo químico.

4.2.3 ANÁLISE COM MEV

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada no laboratório LabMiCaM - UFSCar- Araras, com o equipamento microscópio da marca Thermo Fisher prima E e o equipamento auxiliar Leica ACE200 para preparar a amostra. Foram separadas duas amostras, a primeira do polipropileno tratado com UV e a segunda sem o tratamento. Essas amostras, primeiramente, passaram por um processo de metalização, com o auxílio do equipamento Leica ACE200, em que receberam uma camada de 10 nanômetros de ouro. Após a metalização das duas amostras, elas foram colocadas no equipamento microscópico para receberem os feixes de elétrons obtendo as imagens em magnificação x1000.

4.3. MÉTODO COLORIMÉTRICO

A colorimetria é uma técnica que verifica reações de oxirredução, por um indicador redox, que são fundamentais na biodegradação de hidrocarbonetos por microrganismos capazes de utilizá-lo como fonte de carbono, caracterizando a atividade metabólica total, não somente do substrato selecionado (CHINELLATO, 2023). O indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é um composto químico que ao ser reduzido muda da cor azul para incolor. Isso ocorre devido a mudança na estrutura molecular do DCPIP, em que, a ligação dupla entre o nitrogênio (aceptor de elétrons no centro) e o carbono passa a ser simples, podendo ser utilizado para caracterizar processos de biodegradação (MONTAGNOLLI, 2011; VERNON; ZAUGG, 1960)

4.3.1 SOLUÇÕES E REAGENTES

Os reagentes utilizados foram a solução marinha, o caldo nutriente modificado e o indicador DCPIP (1 g/1 L). Para a formulação da solução marinha utilizou os componentes presentes no ágar marinho descritos no item 4.1.3, na mesma proporção, porém foi retirado o meio solidificante (ágar). Já o caldo nutriente padrão descrito no item 4.1.2, sofreu uma modificação na quantidade de cloreto de sódio (NaCl) passando de 5 g/L para 35 g/L, concentração de NaCl a 3,5%.

Foram utilizados os 4 inóculos obtidos pelos meios descritos no item 3.1 crescidos em caldo nutriente modificado para garantir uma maior multiplicação após 24 horas sob agitação (100 rpm) em temperatura de 22°C.

4.3.2 MONTAGEM DA COLORIMETRIA

Para a montagem da colorimetria foram utilizados 44 tubos de ensaio vedados, sendo quadruplicado cada ensaio. Na Tabela 2 estão as concentrações e componentes utilizados no teste de colorimetria, em que foram separados quatro controles identificados como, CM (dcpip + meio); CI (meio + dcpip + inóculo: 1, 2, 3 e 4); Cpp (dcpip + meio + poluente) e as amostras de tratamento identificadas como, MO (dcpip + meio + poluente + inóculo: 1, 2, 3 e 4).

TABELA 2 - Composição e concentração dos materiais para o teste de colorimetria

sistema colorimétrico	VOLUME (mL)						PP (g)
	meio SM	DCPIP	inóculo 1	inóculo 2	inóculo 3	inóculo 4	
Branco	10	-	-	-	-	-	-
CM	9,6	0,4	-	-	-	-	-
Cpp	9,6	0,4	-	-	-	-	0,5
CI1	8,6	0,4	1,0	-	-	-	-
CI2	8,6	0,4	-	1,0	-	-	-
CI3	8,6	0,4	-	-	1,0	-	-
CI4	8,6	0,4	-	-	-	1,0	-
MO1	8,6	0,4	1,0	-	-	-	0,5
MO2	8,6	0,4	-	1,0	-	-	0,5
MO3	8,6	0,4	-	-	1,0	-	0,5
MO4	8,6	0,4	-	-	-	1,0	0,5

Fonte: autoria própria.

Neste teste, quando muda de azul para incolor houve atividade metabólica dos microrganismos, e que o fluxo de elétrons da cadeia respiratória reduziu o DCPIP. A alteração na estrutura da molécula do indicador redox (DCPIP) causa a descoloração, e o tempo de descoloração é o parâmetro quantitativo usado para essa análise nos diferentes tratamentos propostos (Tabela 2).

4.4 MÉTODO RESPIROMÉTRICO DE BARTHA E PRAMER

Para avaliar a biodegradação do PP pelas bactérias selecionadas, foram feitos testes quantitativos de produção de CO₂ por meio do método respirométrico de Bartha e Pramer, descrita na norma NBR 14283-99 (ABNT, 1999). Nesse sistema, o poluente é adicionado em um recipiente (reator) semi-fechado que contém o meio de cultura e o inóculo (agente microbiano). Para medir a variação de CO₂ produzido semanalmente é utilizado uma substância alcalina como o hidróxido de potássio (KOH) que reage com o CO₂ do sistema e na sequência é precipitado em carbonato de bário (BaCO₃) pela adição de cloreto de bário (BaCl₂) que posteriormente vai ser titulado com ácido clorídrico (HCl) determinando a quantidade de gás carbônico liberado na biodegradação. De início houve também a quantificação do polímero seguido da montagem dos respirômetros. (ASHTER, 2016; COSTA, 2009)

4.4.1 PREPARO DO POLIPROPILENO

Para calcular a quantidade de microplásticos no oceano segue os cálculos de Kershaw *et al.* (2019), em que a quantidade de lixo plástico nos oceanos pode ser expressada como número ou massa (g ou kg) dividido por unidade de distância (m, km), área (m², km²) ou volume (L¹, m³), exemplo, número de partículas/m³ de água no oceano. Portanto, a massa é a densidade multiplicada pelo volume sendo a densidade do material plástico PP de 0,91 g/cm³ que convertido para mL ficará 0,91 g/mL e o volume médio é de 1.125 μm que convertido será 0,011125. Com esses dados o valor da massa será igual a 0,01012375 g/mL.

Para os testes usando o método Respirométrico de Bartha vão ser utilizados 100 mL de solução, então se um mililitro de água contém 0,01012375 g de microplástico PP em 100 mL terá 1,012375 g.

Para viabilizar os testes nos respirômetros a quantidade de 1 g de PP foi pesada em balança analítica (Figura 6) para cada 100 mL de solução.

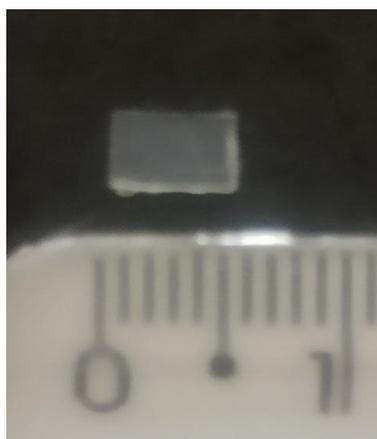
FIGURA 6: Pesagem do microplástico PP em balança analítica



Fonte: autoria própria

O polímero PP foi obtido de uma embalagem plástica transparente de textura lisa e pouco maleável, que foi cortada com o auxílio da tesoura para chegar a um diâmetro de 1-5 mm mensurado com uma régua (Figura 7), este diâmetro está condizente com a medida de classificação de um microplástico trazido por KERSHAW *et al.* (2019).

FIGURA 7: Diâmetro do polímero PP medido com o auxílio de uma régua



Fonte: autoria própria

4.4.2 MONTAGEM DOS RESPIRÔMETROS

No método respirométrico foram utilizados 45 respirômetros com ensaios triplicados, separados em grupo controle e grupo experimental. Foram vinte e um respirômetros como controle (1-21), o primeiro controle contendo somente solução marinha identificado como C1 (1-3), segundo controle contendo solução marinha (SM) mais polipropileno tratado com UV (PPt UV), identificado como C2 (4-6) e o terceiro controle contendo solução marinha e PPI, identificado como C3 (7-9) e por último os controles contendo solução marinha mais os inóculos 1, 2, 3 e 4, identificado como C4 (10-21). Para o grupo experimental (testes de biodegradação), foram doze respirômetros compostos pela solução marinha, e os inóculos 1, 2, 3 e 4 (em triplicatas) e o PPt (UV), identificados como respirômetro FM (22-33) e os outros doze respirômetros foram compostos pela solução marinha, e os inóculos 1, 2, 3 e 4 e o PPI, identificados como respirômetro SM (34-45). A Tabela 3 descreve a quantidade usada de cada elemento em um respirômetro, assim como o valor exato do reagente KOH 2,0 M, componente necessário para medição de CO₂ através da titulação semanal.

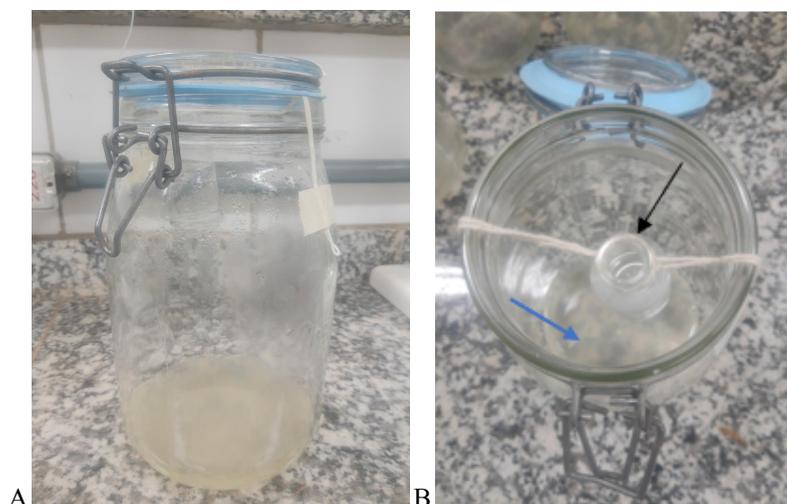
TABELA 3 - Composição e nomenclatura dos ensaios de biodegradação pelo método respirométrico, sendo, os grupos controles os respirômetros C1-4 e os grupos experimentais o FM: inóculos 1,2,3 e 4 + PP com tratamento UV PPt (UV), SM: inóculo 1, 2, 3 e 4 + PP sem tratamento UV (PPI). Todos os ensaios foram feitos em triplicata. As numerações aplicadas sequencialmente indicam cada sistema respirométrico individual.

RESPIRÔMETRO	COMPONENTES (mL)			PP (g)	
	SM	KOH	Inóculos 1, 2, 3 e 4*	PPt (UV)	PPi
C1 (1-3)	100	10	-	-	-
C2 (4-6)	100	10	-	1,0	-
C3 (7-9)	100	10	-	-	1,0
C4 (10-21)	99	10	1,0	-	-
FM (22-33)	99	10	1,0	1,0	-
SM (34-45)	99	10	1,0	-	1,0

Legenda: composição dos ensaio respirométrico (*) com os inóculos 1, 2, 3 e 4 foram colocados cada um em um recipiente, fazendo triplicatas. (autoria própria)

A Figura 8-A ilustra um sistema respirométrico modificado, em que o recipiente é fechado hermeticamente, formando um ambiente fechado não estéril. Essa modificação foi necessária, pois no sistema convencional o meio de cultura líquido se misturou com o KOH, então para evitar isso foi preciso trocar o recipiente, fazendo as adaptações ilustradas na Figura 8-B, onde é possível observar o fundo do frasco que simula o ambiente marinho (solução marinha; plástico; inóculo) e um frasco pendurado por um barbante na abertura do recipiente maior, com o reagente hidróxido de potássio (KOH), que possibilita a retirada e contabilização do CO₂ acumulado da biodegradação em um intervalo de tempo.

FIGURA 8: Modelo respirométrico modificado. (A) recipiente fechado hermeticamente (sistema semi-fechado), (B) ambiente simulado marinho (solução marinha; plástico; inóculo - fundo do frasco maior - seta azul) e um frasco menor (seta preta) pendurado por um barbante na abertura do recipiente maior, com o reagente hidróxido de potássio (KOH)



Fonte: (autoria própria)

4.4.3 QUANTIFICAÇÃO DE INÓCULO BACTERIANO NO RESPIRÔMETRO

Para se ter uma quantidade satisfatória de microrganismos no respirômetro utilizou a escala nefelométrica de McFarland. Ela possui uma série de 11 tubos numerados de 0,5 até 10, que indica a contagem de microrganismo na amostra pela turbidez, quanto maior o número na escala, maior a turbidez, sendo possível verificar visualmente a concentração aproximada do inóculo, por comparação entre os tubos de McFarland e os de cultura bacteriana.

A Figura 9, ilustra a comparação, feita com o tubo de McFarland na escala 10 com uma das colônias selecionadas. Foram preparados quatro tubos de ensaios com 10 mL de solução salina (água destilada estéril e 0,085 g de NaCl) e com a alça de inoculação foram coletados (4x) uma quantidade de cada uma das quatro colônias de bactérias selecionadas, citadas no item 4.1.3 e colocadas cada uma em um dos tubos de ensaio e agitados até formar uma solução homogênea e turva (imagem a direita), chegando a escala 10, que, de acordo com a turbidez padrão da escala nefelométrica de McFarland chega ao um número aproximado de 30×10^8 de bactérias em solução (imagem a esquerda).

FIGURA 9: Avaliação da turbidez pela escala nefelométrica de McFarland



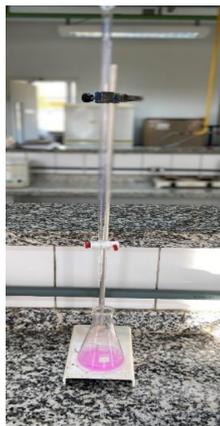
Fonte: autoria própria

4.4.4 MONITORAMENTO DE CO₂ PRODUZIDO

Para acompanhar a biodegradação foram realizadas titulações semanais, totalizando 8 semanas (56 dias). Sendo preparados previamente, para cada respirômetro, um recipiente (Erlenmeyer de 100 mL) contendo 1 mL da solução de cloreto de bário (BaCl₂ 1,0 M) e 3 gotas do reagente fenolftaleína. Para a retirada do KOH 0,2 M primeiramente é aberta a tampa hermética do respirômetro e depois é coletado com uma pipeta de 10 mL o KOH presente no frasco menor pendurado dentro do respirômetro como ilustrados na Figura 7-B, e depositado

no erlenmeyer juntamente com o BaCl_2 1,0 M e a fenolftaleína e acrescido mais 30 mL de água destilada sem CO_2 que foram inseridos 10 mL (3x) no frasco menor para lavar o KOH presente ali. O conteúdo no frasco erlenmeyer foi titulado posteriormente com o HCl 1,0 M, com o auxílio de uma bureta, obtendo assim o valor de degradação do poluente (Figura 9).

FIGURA 10: Titulação com HCl do CO_2 associado ao KOH coletado dos ensaios respirométricos, com o auxílio de uma bureta



Fonte: autoria própria

4.4.5 QUANTIFICAÇÃO DA CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CO_2

Todos os dados coletados com as titulações foram registrados em Excel, para representar os resultados na forma de gráficos.

Para o cálculo do valor de CO_2 produzido, usou a Equação 1 conforme a fórmula matemática da Norma Técnica NBR 14283 (ABNT, 1999):

$$\text{MOL CO}_2 = (\text{A}-\text{B}) \times 50 \times f_{\text{HCl}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que o (A) é o volume (mL) de HCl 0,1 N usado para titular o branco, o (B) corresponde ao volume (mL) usado para titular o tratamento, o 50 é o valor para transformar equivalente em mol de gás carbônico e o f_{HCl} é o fator HCl 0,1N.

4.4.6 AVALIAÇÃO DE DETERIORAÇÃO DO POLÍMERO

Para a observação da fragmentação do polímero após os ensaios respirométricos foi utilizado a técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier acoplado a Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), seguindo a técnica descrita nos itens 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente. A escolha do fragmento de PP para análise foi baseado nos resultados do método respirométrico, sendo

coletado dos respirômetros do grupo experimental que demonstraram resultados expressivos na produção de CO₂. Outro método de avaliar a degradação foi pela pesagem dos microplásticos PP para verificar se houve perda de massa, em todos os ensaios com bioaugmentação do grupo experimental.

Antes de iniciar a pesagem do PP residual fez-se a separação dos microrganismos incrustados nas partículas plásticas, para isso, primeiramente fez-se a filtração do poluente dos respirômetros e após isso colocou por 30 minutos no álcool 70° deixando secar no fluxo laminar por duas horas.

Para calcular a porcentagem de perda de massa do PP usou-se as fórmulas descritas por Auta *et al.* (2017). A perda de massa pela degradação é avaliada em termos de porcentagem pela Equação 2:

Porcentagem de perda de peso

$$= \frac{(\text{peso inicial do polímero} - \text{peso final do polímero}) \times 100}{\text{peso inicial do polímero}}$$

(Equação 2)

Os dados resultantes da porcentagem de perda de massa do PPI e do PPT (UV) foram colocados na Calculadora ANOVA unidirecional, incluindo Tukey HSD da Social Science Statistics (disponível em: <https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx>) para verificar se esses valores são ou não significativos.

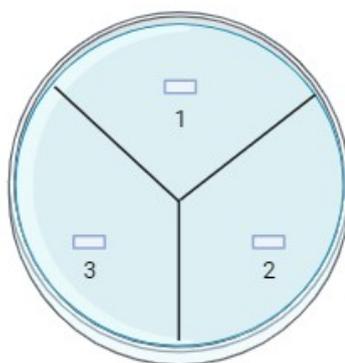
4.5 ENSAIO DE CONSUMO DE SUBSTRATO EM PLACA

Para a realização desse experimento foi utilizado o método de ensaio de zona limpa descrito por Howard *et al.* (2023), porém com algumas modificações, com o intuito de verificar se houve incrustação dos microrganismos selecionados no PP e se está ocorrendo consumo do mesmo. De início foi realizado um plaqueamento dos fragmentos de PP retirado dos respirômetros do grupo experimental após 56 dias de tratamento biológico em ágar marinho sem o componente nutricional, ou seja o PP foi a única fonte de carbono presente no meio. Para o meio de cultura foi utilizado o ágar marinho descrito no item 4.1.3, em sua proporção para um litro de solução, porém sem os componentes, extrato de levedura, extrato de carne e peptona, mantendo além dos minerais o ágar.

O meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 20 minutos e vertido em placas de Petri. Para os ensaios foram selecionados os um fragmento de PP de cada triplicata, dos respirômetros do grupo experimental, denominados FM (22-33) e SM (34-45). Dentro do fluxo laminar após verter o meio de cultura foi coletado dos respirômetros, com auxílio de

uma pinça esterilizada, um fragmento de PP de cada uma das triplicatas e depois de delimitar três zonas de crescimento no ágar, incrustou cada fragmento em uma zona referente a cada um dos quatro inóculos dos respirômetros FM, contendo PPt (UV) e do respirômetros SM, contendo PPi (Figura 11). Em seguida as placas foram vedadas com parafilm e colocadas em BOD em temperatura de 22°C, sem interferência luminosa. A coleta de dados foi realizada durante oito dias, sendo medido o diâmetro, com o auxílio de uma paquímetro, do crescimento microbiano ao redor dos fragmentos de PP, em três ângulos de 90°, uma vez ao dia.

FIGURA 11: Delimitação da disposição dos fragmentos de PP das triplicatas, coletados do grupo experimental (respirômetros FM e SM), posterior a biodegradação, em três zonas referente a cada inóculo para ensaios de consumo de substrato em placa



Fonte: Autoria própria. Criado em BioRender.com

Ainda foi medido a velocidade de crescimento radial (VCR) que se expressa pelo coeficiente angular da reta obtida da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo, quanto maior a inclinação da reta, maior é sua velocidade de crescimento radial. O VCR pode ser calculada, utilizando a Equação 3 (COLLA *et al*, 2008):

$$r(t) = b + VCR.t$$

(Equação 3)

onde:

b= diâmetro inicial

r=raio (mm);

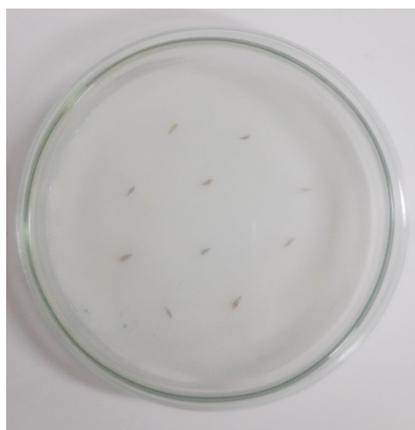
t= tempo (dias);

VCR= velocidade de crescimento radial (cm.d⁻¹).

4.6 TESTE DE ECOTOXICIDADE

Para o teste de ecotoxicidade seguiu-se o RAS (Regras para Análise de Sementes) produzido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009), fazendo a germinação sobre papel. De início foram autoclavadas 27 placas de Petri juntamente com o papel filtro que foi cortado em 10 centímetros de diâmetro para preencher toda a superfície da placa. As soluções utilizadas para os ensaios, em triplicatas, são, água destilada estéril para o grupo controle e o substrato coletado dos 12 respirômetros FM (22-33) e dos 12 respirômetros SM (34-45), do grupo experimental, como consta no item 4.4.2. No controle foi colocado com o auxílio de uma pipeta a quantidade de 1,5 mL de água destilada estéril sob o papel filtro e em seguida colocado 10 sementes de *Lactuca sativa* (Figura 12), para a coleta do substrato do grupo experimental foi realizado o mesmo procedimento. As sementes são da variedade alface grandes lagos (americana), da fabricante ISLA, livre de agrotóxicos, do lote 161434-000, com 100% de pureza e 98% de taxa de germinação. As placas foram enroladas em plástico filme PVC e armazenadas em uma bandeja envolvida por um saco preto para evitar interferência de luminosidade. As placas foram incubadas em temperatura de 22°C e teve duração de 5 dias.

FIGURA 12: Ensaio de ecotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* contendo: o papel filtro, 10 sementes de *Lactuca sativa*, solução controle: água destilada estéril e solução substrato: meio líquido retirado do grupo experimental do ensaio respirométrico.



Fonte: autoria própria

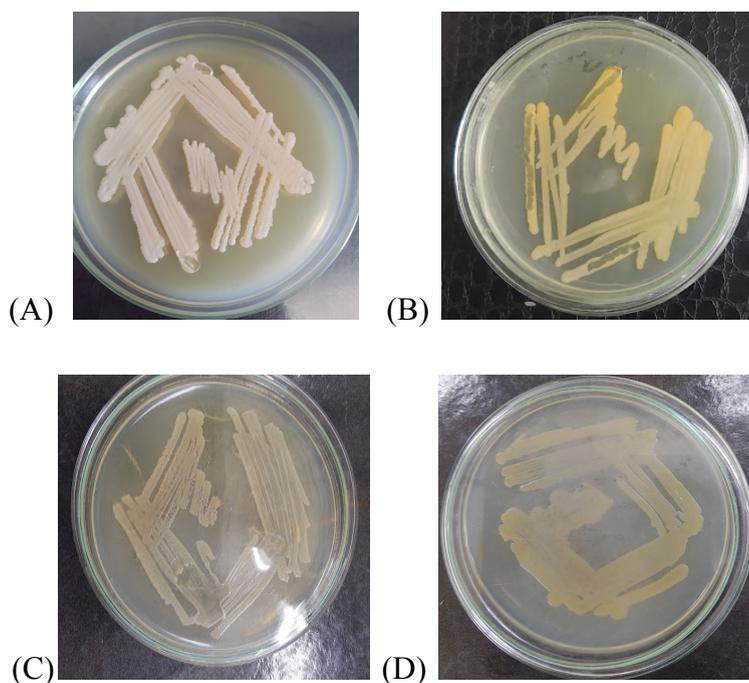
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, a pesquisa se propôs a descobrir meios de biodegradar o microplástico de polipropileno em um meio simulado marinho. A partir dos métodos realizados ao longo do experimento, obteve-se os resultados que serão detalhados a seguir. Os resultados dessa pesquisa foram divididos em cinco seções: caracterização da microbiota; método colorimétrico; monitoramento de CO₂ produzido; análise com FTIR; análise com MEV, ensaio de consumo de substrato em placa, avaliação da deterioração do polímero e avaliação toxicológica do subproduto.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA

As colônias prospectadas do solo e induzidas ao meio simulado marinho, após 48 horas de incubação foram identificadas com o auxílio de uma lupa, usando o método de contagem de colônias, 197 colônias brancas. Após duas semanas havia diferentes colônias nas placas, das quais quatro foram selecionadas (Figura 13). Elas foram nomeadas de AS1, AS3, AS4 e AS5 e observaram-se as características macroscópicas (formato e coloração) e microscópicas destacadas na Tabela 5.

FIGURA 13: Crescimento em placa de Petri das quatro colônias de bactérias selecionadas pelos ensaios de adaptação da microbiota nativa, sendo (A) AS1, (B) AS3, (C) AS4 e (D) AS5



Fonte: autoria própria

TABELA 4 - Caracterização das quatro linhagens de bactérias de forma visual/ macroscópica (formato e coloração) e por microscopia

COLÔNIAS	FIGURA 13	COLORAÇÃO	CARACTERÍSTICAS	
			Formato	Microscopia
AS1	(A)	Branca	Formato: Circular, elevado, borda inteira.	Microscopia: Bactéria bacillus gram negativo
AS3	(B)	Rosé	Formato: Circular, elevado, borda inteira.	Microscopia: Bactéria Cocos Gram negativa
AS4	(C)	Bege	Formato: Circular, elevado, borda inteira.	microscopia: Bactéria Cocos gram negativa
AS5	(D)	Amarela	Formato: Circular, elevado, borda inteira.	Microscopia: Bactéria Cocos gram negativa

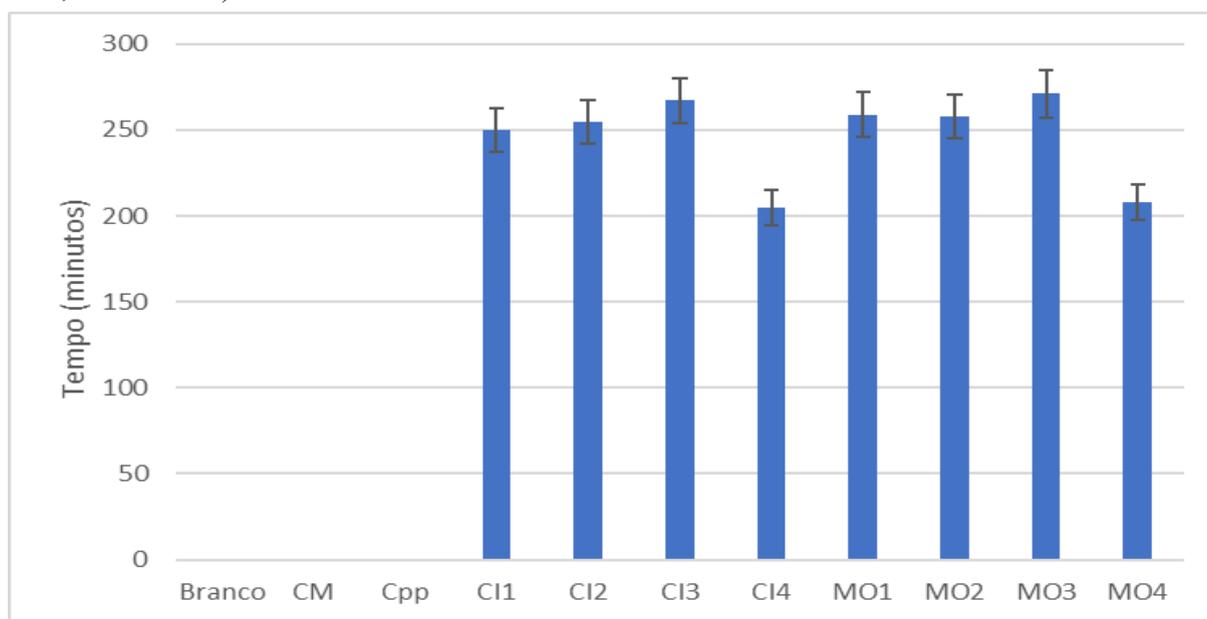
Fonte: autoria própria

A adaptação da microbiota nativa, nos ensaios de adaptação, se mostrou eficaz, sendo expressada em horas de crescimento. Diante desses resultados, observou-se que os microrganismos de solo se adaptaram facilmente às condições de salinidade, indicando que o meio pode influenciar o comportamento microbiano, para suportar condições contrárias à sua matriz original (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). A sua capacidade de suportar condições extremas de salinidade, como trazido por Kanekar *et al* (2012), foi pertinente para a rápida adaptação ao meio simulado marinho.

5.2 MÉTODO COLORIMÉTRICO

O resultado do teste de colorimetria com indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), que teve como objetivo avaliar a interação entre as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 e o PP antes de sofrer qualquer tratamento, observando a descoloração em função do tempo, sendo esse o fator que determina quais dos microrganismos têm maior interação com o PP. Os dados da colorimetria estão representados na Figura 14.

FIGURA 14 - Tempo total de descoloração nos ensaios colorimétricos. Eixo X representa os ensaios com os dados dos controles: branco, CM, Cpp, C1, C2, C3 e C4, bem como das amostras MO1, MO2, MO3 e MO4. O eixo Y mostra em minutos o tempo médio que cada ensaio quadruplicado levou para passar de azul para incolor. A composição dos frascos de colorimetria são: ensaios controle: branco (meio: solução marinha); CM (dcpip + meio); CI (meio + dcpip + as colônias AS1, AS3, AS4 e AS5); Cpp (dcpip + meio + poluente) e as amostras de tratamento identificadas como, MO (dcpip + meio + poluente + as colônias AS1, AS3, AS4 e AS5).



Fonte: autoria própria.

As amostras contendo o DCPIP sem a presença de microrganismos (os controles) não apresentaram descoloração, validando o experimento. Já aquelas com a presença do inóculo AS1, representados pela Figura 14 (CI1) e (MO1), do inóculo AS3 representados pela Figura 14 (CI2) e (MO2), AS4 representados pela Figura 14 (CI3) e (MO3) e AS5 representados pela Figura 14 (CI4) e (MO4), constataram uma interação metabólica. O inóculo AS5 (MO4) foi o que descoloriu mais rápido, chegando a uma diferença de 51 minutos em relação a AS1 (MO1), 50 minutos do inóculo AS3 (MO2) e 63 minutos do inóculo AS4 (MO3), porém quando se compara os três primeiros inóculos (AS1, AS3, e AS4) o intervalo de tempo é menor, sendo de 1 minuto entre o AS1 e o AS3 e um intervalo maior, entre o AS4, de 22 e 23 minutos, comparados com o AS1 e AS3, respectivamente.

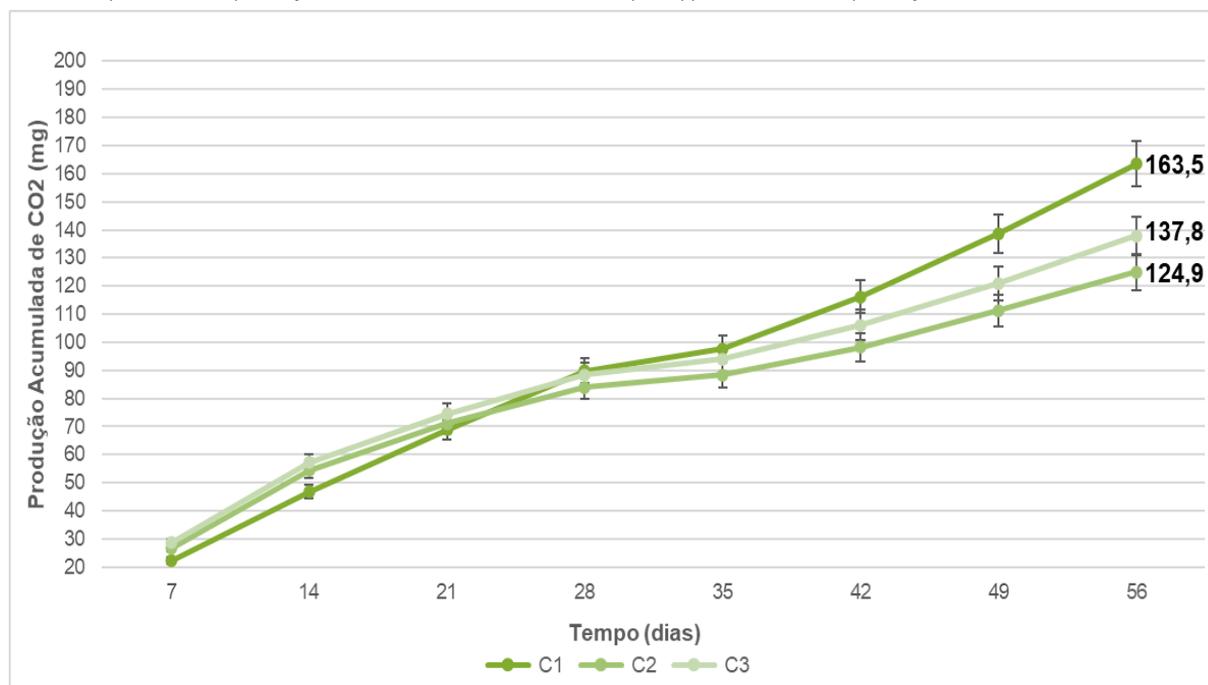
A análise de interação microrganismo-plástico com a colorimetria indicou que o tempo de descoloração do AS5 foi menor (208 min), seguido do AS3 (258 min), AS1 (259 min) e AS4 (271 min). Embora o AS5 tenha indicado uma descoloração mais rápida, ou seja uma interação maior com o PP, não é possível afirmar ao certo que foi de biodegradação, uma

vez que o indicador redox considera apenas atividade metabólica. Entretanto, a colorimetria indicou que houve interações positivas entre todos os isolados com o PP.

5.3 MONITORAMENTO DE CO₂ PRODUZIDO

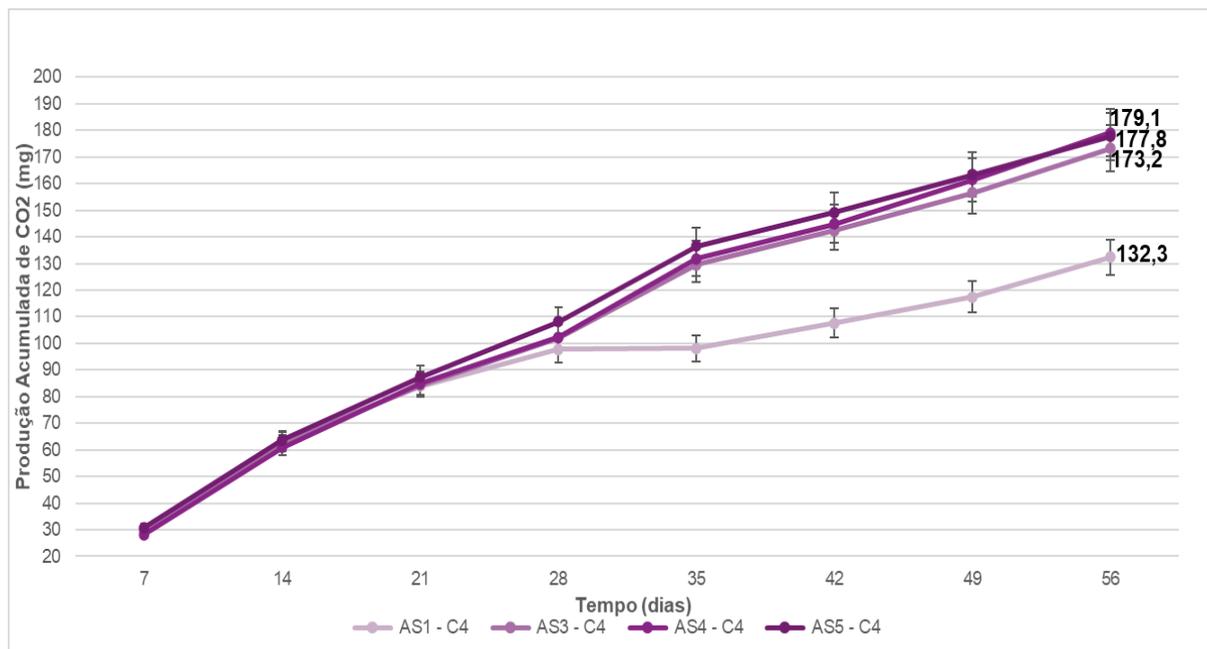
O teste de eficiência da biodegradação foi avaliado pela produção de CO₂ durante 56 dias, realizando titulações semanais (8 semanas) dos respirômetros catalogados na Tabela 3 do item 4.4.2. A partir desses dados é possível analisar qual linhagem selecionada degrada mais o PP e qual dos dois tratamentos é favorável à biodegradação. Os dados da média acumulada de CO₂, ou seja a somatória seguida da média da produção de CO₂ semanal das triplicatas de cada uma das quatro linhagens ao longo do experimento (com desvio padrão), estão representados nas figuras abaixo, em que, o do grupo controle C1, C2 e C3 estão ilustrados na Figura 15 e do grupo controle C4 na Figura 16 e do grupo experimental, representados pelos ensaios FM e SM na Figura 17. A observação desses dados devem ser realizados pela comparação entre o grupo controle e do grupo experimental, podendo assim discutir sobre os fatores que possibilitaram a biodegradação do PP.

FIGURA 15: Dados da produção acumulada de CO₂ do grupo controle C1 (somente solução marinha), C2 (solução marinha + PPt (UV)) e C3 (solução marinha + PPI)



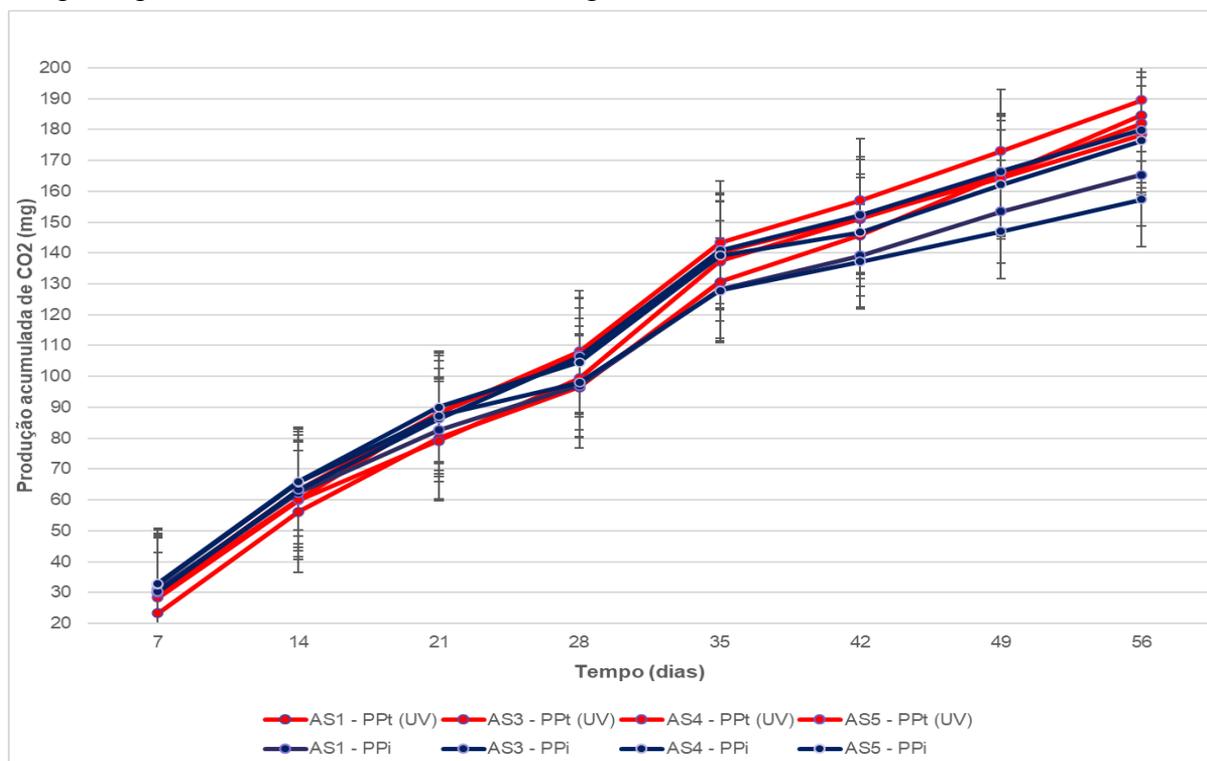
Fonte: autoria própria

FIGURA 16: Dados da produção acumulada de CO₂ do controle C4, composto pela solução marinha associados as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5



Fonte: autoria própria

FIGURA 17: Dados da produção acumulada de CO₂ do grupo experimental, especificamente, dos respirômetros FM, composto pelo PPt (UV) e dos respirômetros SM, composto pelo PPI, ambos associado as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5



Legenda: Os valores finais de cada linhagem associado ao tratamento PPt (UV) são: AS1 (184,5 mg); AS3 (182 mg); AS4 (189,5 mg); AS5 (178,3 mg) e para o tratamento PPI são: AS1 (165,3 mg); AS3 (179,9 mg); AS4 (157,3 mg); AS5 (176,4 mg) (autoria própria)

Os dados mostram uma curva crescente em todos os ensaios. Ao observar os dados da Figura 15, que se refere aos controles que contém, somente meio simulado marinho (C1), o que possui o PPI somado ao meio simulado marinho (C2) e o PPt (UV) com o meio simulado marinho (C3), teve liberação de CO₂, ao longo do experimento, mesmo não sendo inserido nenhum agente biológico no respirômetro, constatando assim, que houve uma contaminação do respirômetro C1, sendo consumido o percentual nutricional do meio, mesmo escasso, gerando a curva crescente, chegando a um acúmulo final de 163,5 mg de CO₂ produzido. Nos respirômetros C2 e C3 (Figura 15) o crescimento exponencial pode ser explicado pela microbiota já presente nos polímeros inseridos nos ensaios, sendo possível haver um consumo do substrato presente no meio fornecendo os valores de acúmulo final 124,9 mg e 137,8 mg respectivamente de CO₂ produzido no sistema respirométrico.

Na Figura 16 consta os valores acumulados dos ensaios com o meio simulado marinho juntamente com as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 (C4), sendo plotado a média acumulada das triplicatas de cada um dos ensaios. Observamos que as linhagens AS3, AS4 e AS5 tiveram um crescimento acentuado durante os 56 dias, chegando ao acúmulo final de 173,2 mg, 179,1 mg e 177,8 mg, respectivamente. Em relação a linhagem AS1, após 28 dias do início do experimento houve um declínio da produção de CO₂, em comparação com os demais, atingindo tendência de estabilidade no valor, após 56 dias, de 132,3 mg.

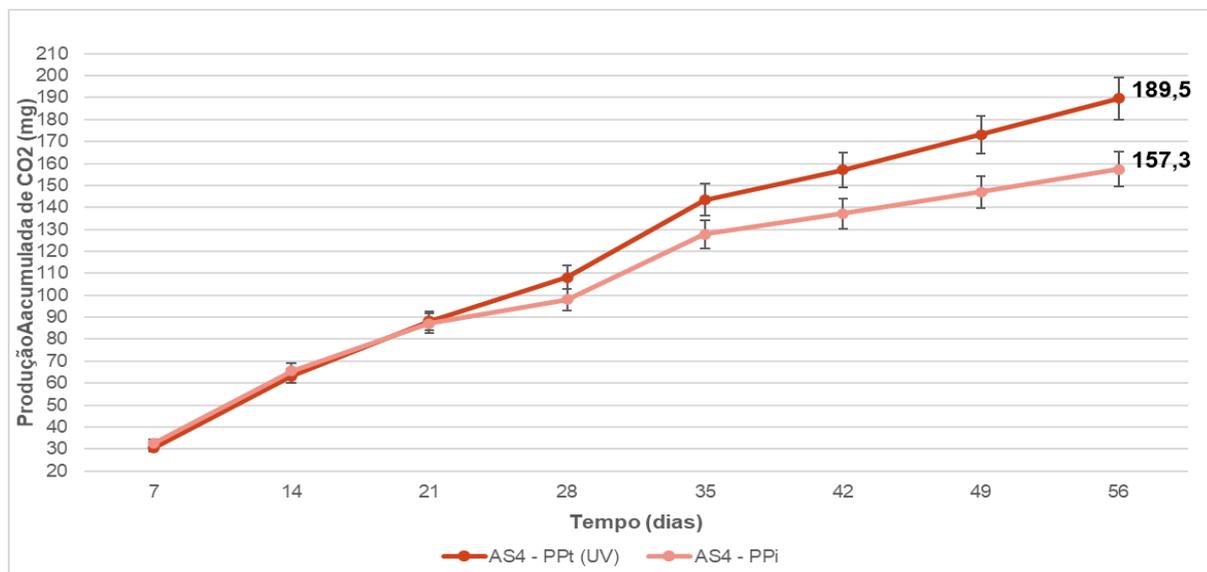
Nos ensaios de bioaugmentação (uso de microrganismos específicos para degradação de resíduos orgânicos), do grupo experimental com o PPt (UV), ilustrados na Figura 17, contempla a produção de CO₂ acumulada dos respirômetros, com as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5, no meio simulado marinho. Todos ultrapassaram a faixa de 150 mg de CO₂, especificamente, a linhagem AS1 e AS3 teve um acúmulo de 184,6 mg e 182 mg, respectivamente, o AS5 de 178,3 mg e o AS4 com o maior valor, de 189,5 mg.

Ainda a Figura 17 traz os dados da produção de CO₂ com o PPI, na companhia dos inóculos AS1, AS3, AS4 e AS5 incorporados no meio simulado marinho (respirômetros SM). Quando observamos os dados vemos que o inóculo AS3 se destaca com o maior acúmulo, no valor de 179,9 mg de CO₂ produzido, seguido do AS5 com 176,4 mg, o AS1 com 165,3 mg e com menor valor o AS4 com 157,3 mg.

Quando analisamos os quatro dados representando a produção de CO₂ no sistema respirométrico, vemos que duas linhagens se destacam, a linhagem AS1 e a AS4. Avaliando a evolução de CO₂ da linhagem AS4 na Figura 17, que se refere ao PPt (UV) e ao PPI, vemos que teve uma maior produção de CO₂ quando o PP sofre degradação abiótica do que com o que não sofreu, como destacado na Figura 18. Em se tratando do PPt (UV) anterior a

degradação biótica, houve uma produção acumulada de 189,5 mg e o PPI teve uma produção de 157,3 mg, uma diferença de 17%. É possível observar também que a diferenciação da produção começa após 21 dias do início do experimento.

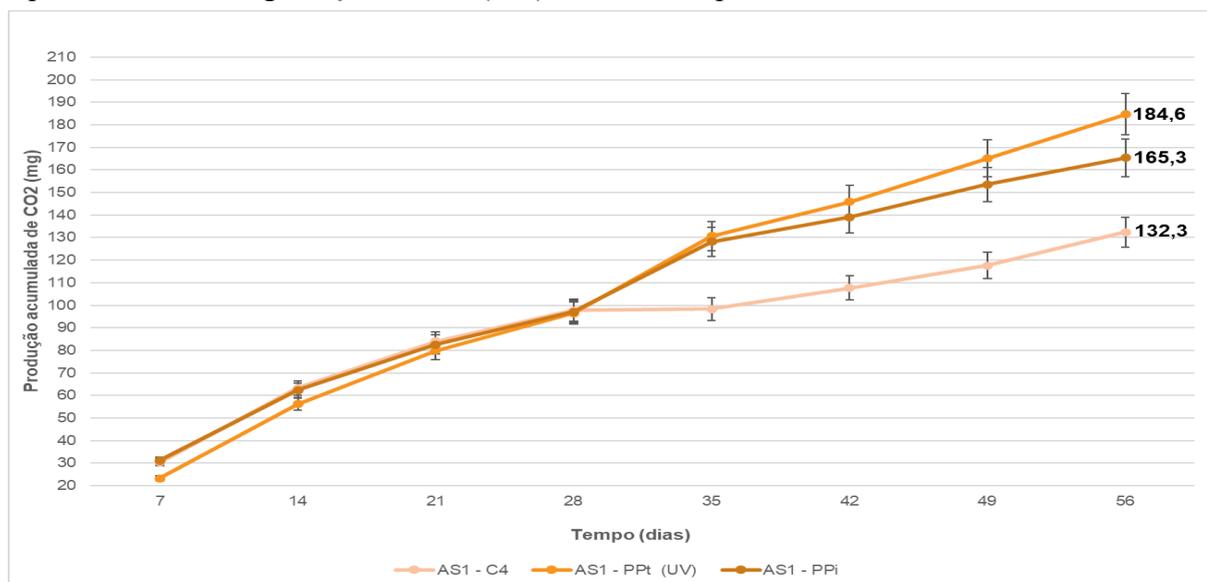
FIGURA 18: Dados comparativos do acúmulo de CO₂ da linhagem AS4 associado ao PPt (UV) e PPI



Fonte: autoria própria

No que se refere a linhagem AS1, foi comparado o dados do controle C4 (Figura 16) com os do grupo experimental, representados pela biodegradação do PPt (UV) e do PPI (Figura 17) pela linhagem AS1, vemos então uma diferença na produção de CO₂, ilustrada na Figura 19.

FIGURA 19: Dados da produção de CO₂ da linhagem AS1 associada ao grupo controle C4 (solução marinha + linhagem AS1) e grupo experimental nos ensaios FM e SM, que representam a biodegradação do PPt (UV) e do PPI, respectivamente



Fonte: autoria própria

Analisando os dados da Figura 19 vemos que o valor acumulado da linhagem AS1 no controle C4 fica abaixo de 150 mg de CO₂ produzido e nos ensaios FM e SM estão acima dessa faixa. Observamos também que a partir de 28 dias do início do experimento começa a ocorrer a discrepância nos dados, entre os ensaios e o controle, chegando a uma taxa de 28,3%, comparando a linhagem AS1 do controle C4 com o do ensaio dos respirômetros FM com o PPt (UV) e um aumento de 20%, comparado com o ensaio dos respirômetros SM com o PPI, após 56 dias de titulações semanais. Em relação aos valores acumulados de CO₂ da linhagem AS1 nos ensaios com o PPt (UV) e o PPI, é possível observar um aumento, sendo um diferencial de 10,5% a mais para o PPt (UV).

Diante dos resultados do teste de respirometria, é evidente que houve produção de CO₂ por todas as linhagens selecionadas, ressaltando uma maior interação da linhagem AS1 com o PP, quando comparado com o meio de cultura, após 56 dias do início do experimento, com um aumento de 28,3% e o PPI um aumento de 20% na produção de CO₂ em relação ao grupo controle, em que a linhagem AS1 está consumindo somente o meio de cultura (C4), isso sugere que essa linhagem teve uma pré-disposição a degradar o PP, ou seja a produção de CO₂ superior observada determina que a linhagem AS1 tem um maior estímulo a consumir o nutriente presente no meio quando o mesmo é o PP, isso abre um leque de possibilidades quando pensamos em bioprospectar microrganismos para degradar polímeros, ressaltando que o utilizado nesta pesquisa é considerado um polímero não biodegradável, trazendo então, uma perspectiva mais ampla ao se pesquisar os diferentes caminhos e microrganismos capazes de biodegradar o PP.

Outro ponto a ser destacado é que quando o PP é tratado com UV a uma produção maior de CO₂ quando comparado com o PP sem tratamento, isso é observado tanto na linhagem AS1 quanto na AS4. Os dados da linhagem AS4, ao longo do tempo do experimento, mostram que o ensaio com o PPt (UV) comparado com o PPI teve um aumento de 17% na produção de CO₂. Esses dados indicam que houve uma maior biodisponibilidade do PP quando se fez um tratamento abiótico de deterioração, que no caso foi com luz UV, significando então uma maior atividade enzimática, sendo a biodegradação enzimática resultante da secreção de enzimas que quebram o polímero em moléculas menores, estando associado também às interações entre os microrganismo e a superfície polimérica (DE PAOLI, 2008; CAVALCANTI, 2017).

Portanto, essas duas linhagens têm uma maior tendência de biodegradar o PP, principalmente quando o PP sofre deterioração com luz UV. Esse fator abiótico de degradação do polímero está presente no ambiente marinho, logo podemos dizer que os polímeros

flutuantes, tal como o PP, quando fotodegradados pela luz solar possuem uma biodisponibilidade maior para serem colonizados e possivelmente biodegradados por microrganismos, isso também pode ser uma fator interessante de se trabalhar quando se considera a degradação de polímeros de forma *ex situ*, em biorreatores, utilizando microrganismos selecionados, tal como esses citados acima, que possuem uma maior predisposição a biodegradar, nesse caso, o tipo PP.

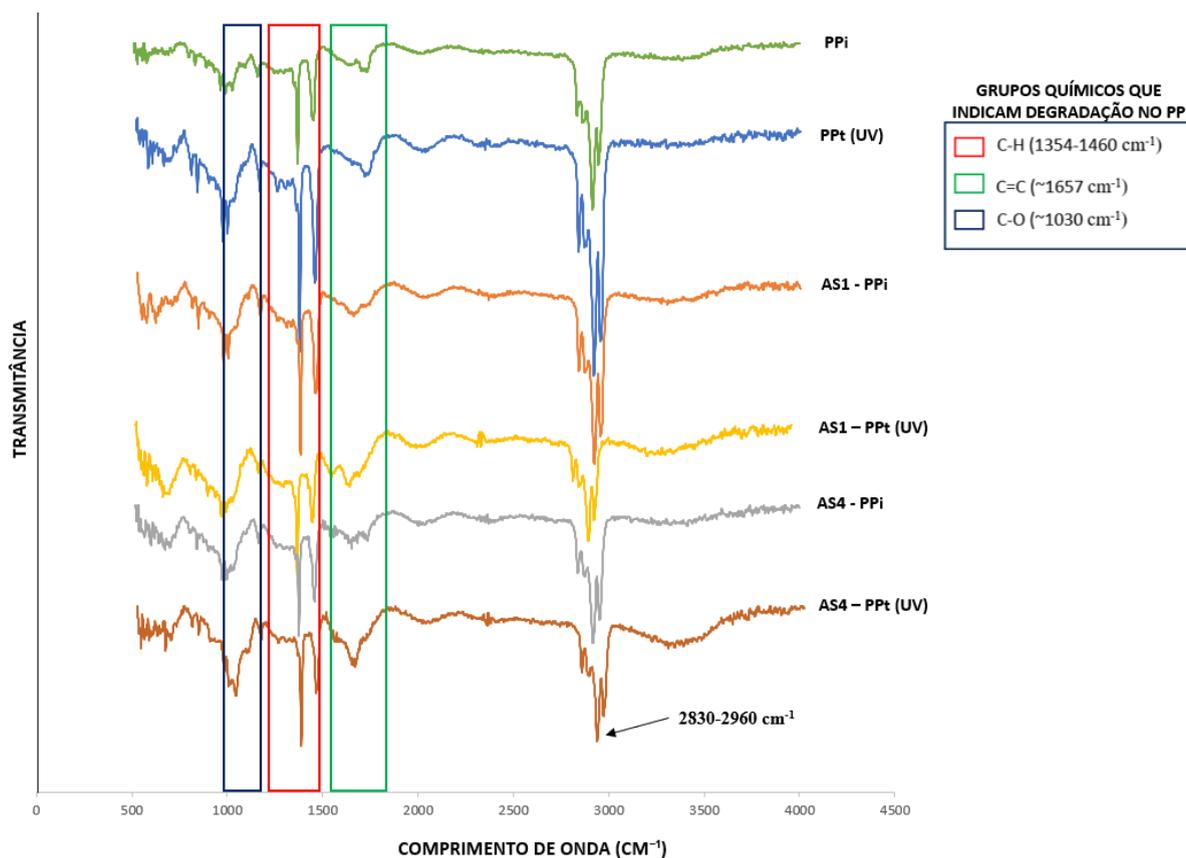
Um detalhamento das alterações na estrutura química do material, induzidas pela biocatálise, pode ser observada pelo FTIR (KRUEGER *et al*, 2015), diante disso, os dados de maior destaque nos ensaios respirométricos, seguiram para as análises físico-químicas por MEV e FTIR, sendo as amostras de polipropileno associadas aos inóculos AS1 e AS4.

5.4 ANÁLISE COM FTIR

Na avaliação estrutural do PP, pela análise de FTIR, a interpretação do espectro foi realizada de acordo com bibliotecas espectrais presentes no manuscrito de Paiva *et al* (2015), que define os valores de adsorção de infravermelho por compostos orgânicos, podendo assim descobrir que grupos químicos estão presentes e a relação entre eles dentro do espectro. O objetivo deste ensaio é observar os grupos metila (C-H), o grupo carboxílico (C-C) e o grupo éster (C-O), acompanhando sua evolução entre os diferentes tratamentos e observando se houve interação intermolecular com a vizinhança espectral (essa observação que determina se a banda é intensa ou não dentro do espectro de cada amostra). Essas bandas do espectro são as que indicam se ocorreu degradação do PP, segundo os autores citados nesta seção.

Os dados da porcentagem (%) de absorção de luz estão em transmitância (eixo X) e o comprimento de ondas, indicando a frequência em cm^{-1} (eixo Y). O espectro do grupo controle, em que se encontram o PPt (UV) e PPi, estão ilustrados na Figura 20 A-B. O espectro referente ao grupo experimental, em que se encontram as amostras de PPt (UV) e PPi que demonstraram maior biodegradação, nos ensaios respirométrico, que foram as associadas ao inóculo AS1 estão na ilustrados na Figura 21 (A-B) e os associados a colônia AS4 estão representados na Figura 22 (A-B).

FIGURA 20: Espectro FTIR das amostras de PP, sendo PPi (PP sem tratamento/puro); PPt (UV) (PP tratado com UV); AS1-PPi (PP sem tratamento associado a linhagem AS1); AS1-PPt (UV) (PP tratado com UV associado a linhagem AS1); AS4-PPi (PP sem tratamento associado a linhagem AS4); AS4- PPt (UV) (PP tratado com UV associado a linhagem AS4)



Fonte: autoria própria

Em todos os espectros (Figura 20) é possível ver a região de impressão digital do composto orgânico, referente ao comprimento de onda 900-1300 cm^{-1} (BOSCARO, 2011; MENA *et al.* 2020). Em cada amostra, observa-se quatro bandas de absorção na região entre 2960-2830 cm^{-1} , que caracteriza ligações C-H presentes em hidrocarbonetos alcanos, como é o caso do PP (ROUILLON *et al.*, 2016). Esse intervalo de banda (2960-2830 cm^{-1}) representa o estiramento dos grupos CH/CH₂/CH₃, sendo intensa e estreita. O grupo CH se encontra entre as bandas 2890-2880 cm^{-1} , as ligações CH₂ da cadeia principal e o grupo metila (CH₃), encontradas na região de comprimento de onda 2960-2850 cm^{-1} , sendo a última com estiramento assimétrico, próximo a banda 2945 cm^{-1} (ANDREASEN, 1999; CAVALCANTI, 2017; SILVA; NUNES; RABELLO, 2016).

Ainda no espectro de FTIR (Figura 20), está em destaque a banda 1354-1460 cm^{-1} , que também está representada em todas as amostras (destacado pelo quadrado em vermelho), essa banda mostra a deformação angular simétrica *scissoring* ($\sim 1456 \text{ cm}^{-1}$) do grupo CH₃ (HALE *et al.*, 2020; ANDREASEN, 1999; BOWER; MADDAMS, 2010), sendo uma banda grande e estreita dentro do espectro, referente a amostra de PPt (UV) e da amostra de PPI associado à linhagem AS1 e mesmo a banda sendo média e estreita na amostra de PPI

associado a linhagem AS4 e da amostra de PPt (UV) associado às linhagens AS1 e AS4, ainda são expressivas, indicando degradação, sendo nas duas primeiras mais evidente.

É possível ainda observar o estiramento de C-O entre as bandas 1000-1300 cm^{-1} (destacado pelo quadrado azul - Figura 20), apresentando duas ou mais bandas dentro do intervalo de frequência (cm^{-1}), sendo de tamanho médio, porém mais intensas e largas nos espectros das amostras em que está o espectro representado somente pelo PPt (UV) e das amostras de PPt (UV) associado às linhagens AS1 e AS4.

Outra banda que se destaca na no espectro de FTIR, é a do grupo carbonila (C=O), que está entre 1630-1850 cm^{-1} . Esse grupo é representado pela carboxila (C=C) que está no comprimento de onda 1680-1620 cm^{-1} (destacado pelo quadrado verde - Figura 20), essa ligação absorve apenas fracamente na mesma região do espectro que a carbonila (C=O), ambas sofrem estiramento da ligação (CHANDRA *et al*, 2020). No espectro é possível identificar o grupo C=C na banda em um tamanho médio, porém mais intensas e largas nos espectros das amostras de PPt (UV) associado às linhagens AS1 e AS4.

Avaliando as análises químicas por FTIR, a região de espectro que indicam degradação oxidativa do PP, como destacado na Figura 20, é aquela formada pelo grupo metila (C-H) entre 1354-1460 cm^{-1} (destacado pelo quadrado em vermelho - Figura 20), sendo o principal parâmetro quantitativo de degradação química, segundo Rouillon *et al* (2016). Tendo como indicativo de decomposição, em maior propensão, o carbono terciário (GEWERT; PLASSMANN; MACLEOD, 2015). Ao observar esse grupo dentre as amostras analisadas por FTIR, as que apresentam esse grupo químico, sendo os com maior intensidade no comprimento de onda dentro do seu espectro, foi o PP que sofreu somente degradação por luz UV, dos amostras de PPi associados às linhagens AS1 e AS4 e das amostras de PPt (UV) associados às linhagens AS1 e AS4, diante desses dados é possível ver que está havendo um início de degradação oxidativa, indicando que tanto o tratamento com UV somado a biodegradação e ambos sozinhos podem desencadear um processo de degradação na superfície do PP, levando a resultados bem promissores a longo prazo.

Outro dado que reforça a degradação do PP, que corroboram com os observados por Freitas (2019) e Phan *et al* (2022), é a síntese de carboxila (C=C), já que está por não fazer parte da composição do PP, quando formada devido a irradiação UV, facilita ataques microbiológicos posteriores (CHANDRA *et al*, 2020). Esse grupo C=C, se encontra na frequência próxima a 1657 cm^{-1} (destacado pelo quadrado verde - Figura 20), nos espectros das amostras PPt (UV) associado às linhagens AS1 e AS4 com maior intensidade. Outro grupo oxidativo presente, em maior intensidade nas duas amostras citadas anteriormente, é o

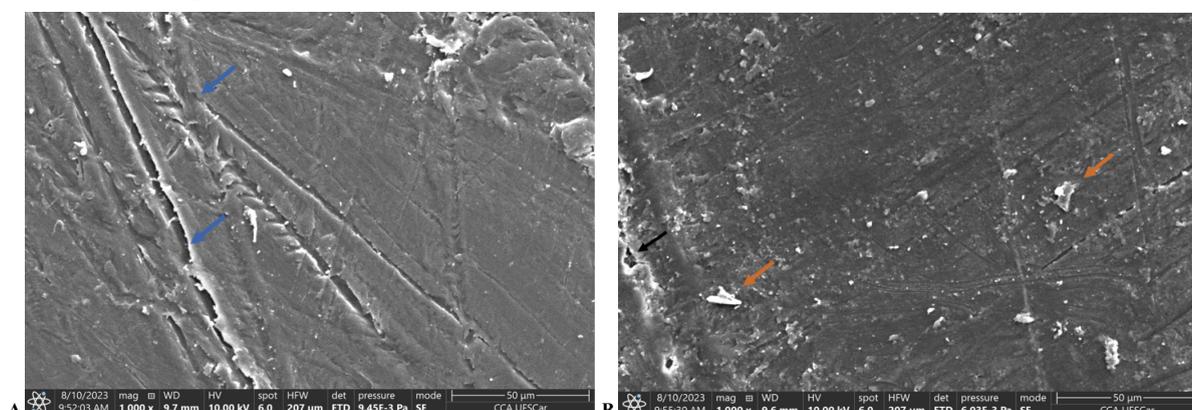
C-O (estiramento) próxima a banda 1030 cm^{-1} (destacado pelo quadrado azul - Figura 20), que dentro do espectro de infravermelho está associado ao grupo funcional ester. O surgimento desse grupo, na biodegradação do PP, segundo Fotopoulou e Karapanagioti (2017) é por conta da fotodegradação anterior ao tratamento biótico, que diminuiu a hidrofobicidade, facilitando o acesso dos microrganismos ao PP.

Portanto, diante dos dados do FTIR, observou-se uma maior degradação oxidativa no PPt (UV) associado às linhagens AS1 e AS4, após 56 dias de biodegradação no sistema respirométrico, reforçando ainda mais a afirmação, ao dizer que o polímero ao sofrer deterioração com luz UV tem maior biodisponibilidade a ataques de microrganismos. Porém, não se pode desprezar os dados do PPI que sofreu somente biodegradação associados às linhagens AS1 e AS4, já que, sem o fator de degradação abiótica (UV), foi possível ver os grupos oxidativos, sendo esses dados reforçados pela produção acumulada de CO_2 , obtida pela respirometria.

5.5 ANÁLISE COM MEV

As análises da superfície do PP feitas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), tem como objetivo verificar a presença de fissuras e sulcos na estrutura do PP, além da presença ou ausência de biomassa microbiana, essas observações foram baseadas em comparações com MEV ilustradas em trabalhos semelhantes apresentados pelos autores citados nesta seção. As amostras de PPI e PPt (UV), estão ilustradas na Figura 21 A-B. Para as amostras PPI e PPt (UV) biodegradadas associadas às colônias AS1 e AS4, selecionados dos respirômetros do grupo experimental FM e SM, estão representados pelas Figuras 22 A-B e 23 A-B.

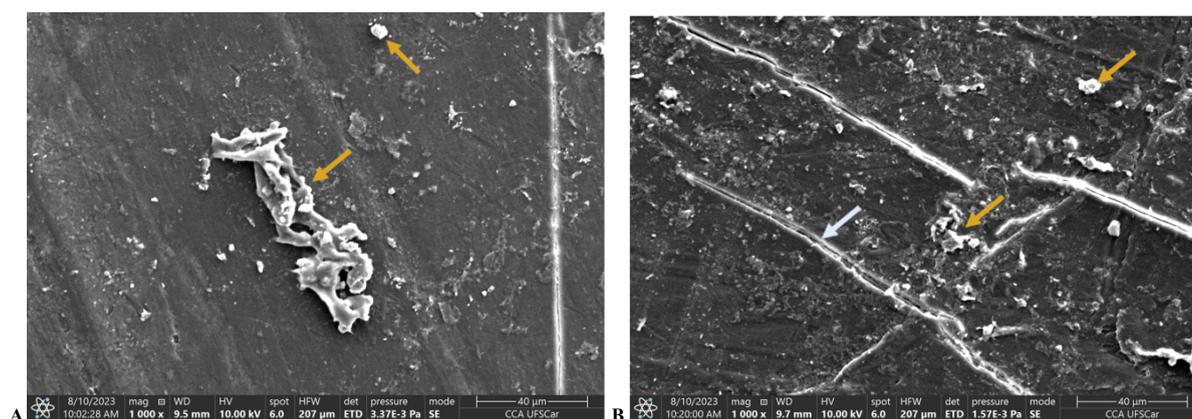
FIGURA 21: imagens do MEV da superfície do fragmento de PPI (21-A) e do PPt (UV) (21-B), em magnificação x1000



Fonte: autoria própria

A Figura 21-A, referente ao PPI, observa-se uma superfície lisa, porém com fissuras, características de abrasão mecânica (seta azul). A Figura 21-B, ilustração do PPT (UV), mostra uma superfície deformada, com aparentes trincos e sulcos, com formações de rachaduras no interior desses sulcos (seta preta), além de um aparente desprendimento de partes do polímero, em algumas regiões da amostra (seta laranja).

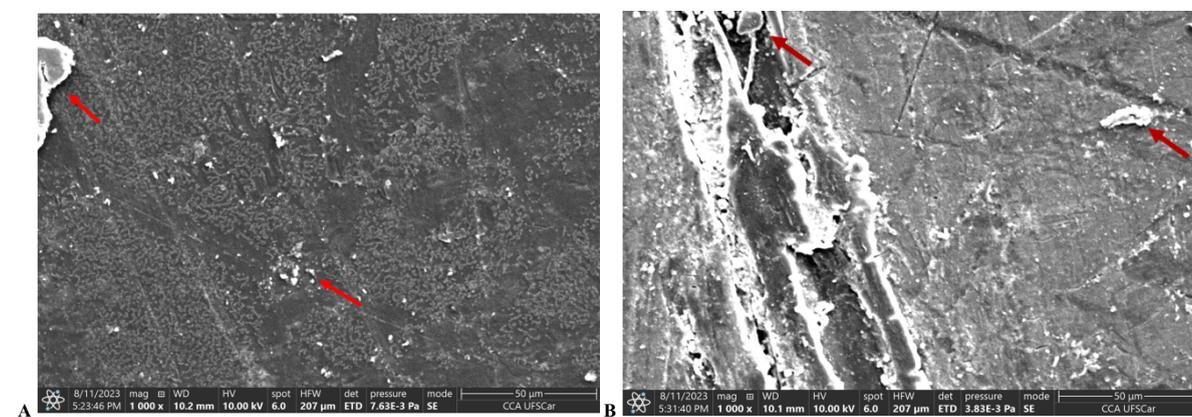
FIGURA 22: Imagens do MEV da superfície do fragmento PP biotratado, referente a linhagem AS1 associado ao PPI (22-A) e o PPT (UV) (22-B), em magnificação x1000



Fonte: autoria própria

A Figura 22 A-B, possui estruturas semelhantes a células bacterianas, demonstrando colonização ou fixação de biomassa bacteriana na superfície (seta amarela escura), independente se sofreu ou não um pré-tratamento UV. A Figura 22-B possui rachaduras e sulcos (seta azul claro), em comparação com a Figura 22-A, sendo observado também uma proeminência maior de biomassa bacteriana na superfície do PPT (UV) (Figura 24-B).

FIGURA 23: Imagens do MEV da superfície do fragmento PP biotratado, referente a linhagem AS4 associado ao PPI (23-A) e o PPT (UV) (23-B), em magnificação x1000



Fonte: autoria própria

A Figura 23-A tem uma superfície com rugosidades que se assemelha um uma pré-colonização, ou seja um início da cobertura de biomassa microbiana. Na Figura 23-B, por sua vez possui grandes sulcos e fissuras, além disso ambas, indicando a colonização da superfície do polipropileno (seta vermelha), podendo ver que na Figura 23-B, no canto superior esquerdo (seta vermelha), a uma incrustação da biomassa no interior do sulco e em relação a Figura 23-A, em sua superfície a vários pontos com fixação de biomassa, destacando, no canto superior esquerdo uma formação mais robusta (seta vermelha).

No parâmetro estrutural, que vemos através do MEV, foi possível observar uma superfície lisa, no caso do PPI, sem sofrer qualquer tipo de tratamento degradativo. Já quando observamos o PPI associado às linhagens AS1 e AS4, temos presente na superfície formações iniciais de biofilme microbiano ilustradas na Figura 23-A (linhagem AS4) e formações mais robustas de biofilme ilustradas nas Figuras 22 A-B e Figura 23-B, isso foi possível determinar mediante as comparações de ilustrações microscópicas realizadas por outros autores (BARDAJÍ, 2018; GLASER, 2019).

A fixação de biofilme nas amostras que sofreram biodegradação, é mais evidente nas imagens do PPT (UV), apresentando regiões com mais partículas de biofilme, compreendendo que o acesso ao PP se torna mais fácil. Segundo Samat, Carter e Abbas (2023), a hidrofobicidade do PP diminui com a oxidação, resultando em uma ação biótica facilitada. Isso ainda é reforçado pelo diferencial de 20% a mais de degradação no PPT (UV) comparado com o PPI, nos ensaios respirométricos com o inóculo AS4, indo em concordância com Glaser (2019), ao descrever que a ação abiótica sobre o polímero é um ponto de apoio para a formação de biofilme por microrganismos.

Quando contrastado, os resultados do FTIR com a análise de MEV, é possível relacionar a formação de biomassa bacteriana em quantidade maior na superfície da amostra de PPT (UV), ainda assim, não podendo desprezar a formação, mesmo que em menor proporção no PPI. Esse aumento da vulnerabilidade do material, por UV, está diretamente relacionado ao aumento na biodisponibilidade do PP, facilitando assim, o acesso ao polímero pelas bactérias ao sofrer biodegradação (CAI *et al*, 2018), sendo a adição de grupos polares uma forma de monitorar a biodeterioração do material polimérico (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

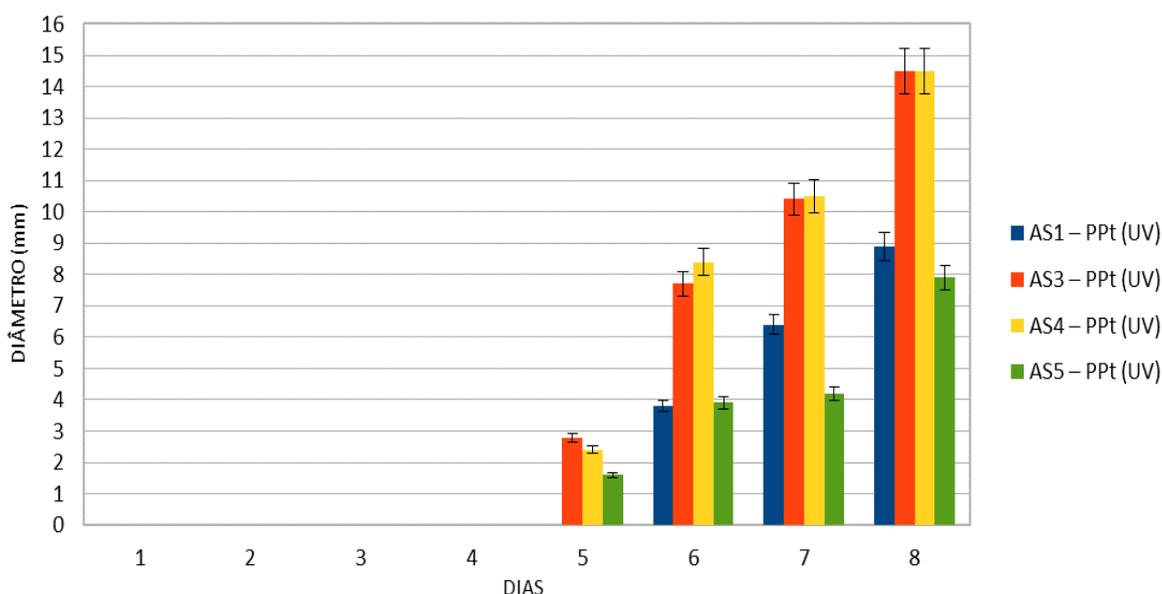
Portanto, os dados da respirometria, sobre produção de CO₂ que determina qual das linhagens degrada mais o PP, sendo ainda analisado pelo FTIR e do MEV, trazem resultados importantíssimos sobre o uso de microrganismos bioprospectados de solo para biodegradar o

PP, sendo este polímero considerado não biodegradável, demonstra o quanto ainda precisamos desenvolver pesquisas relacionadas à capacidade dos microrganismos na degradação de polímeros e os diversos mecanismos utilizados por eles, além de sua capacidade de sobreviver em condições adversas a sua matriz original.

5.6 ENSAIO DE CONSUMO DE SUBSTRATO EM PLACA

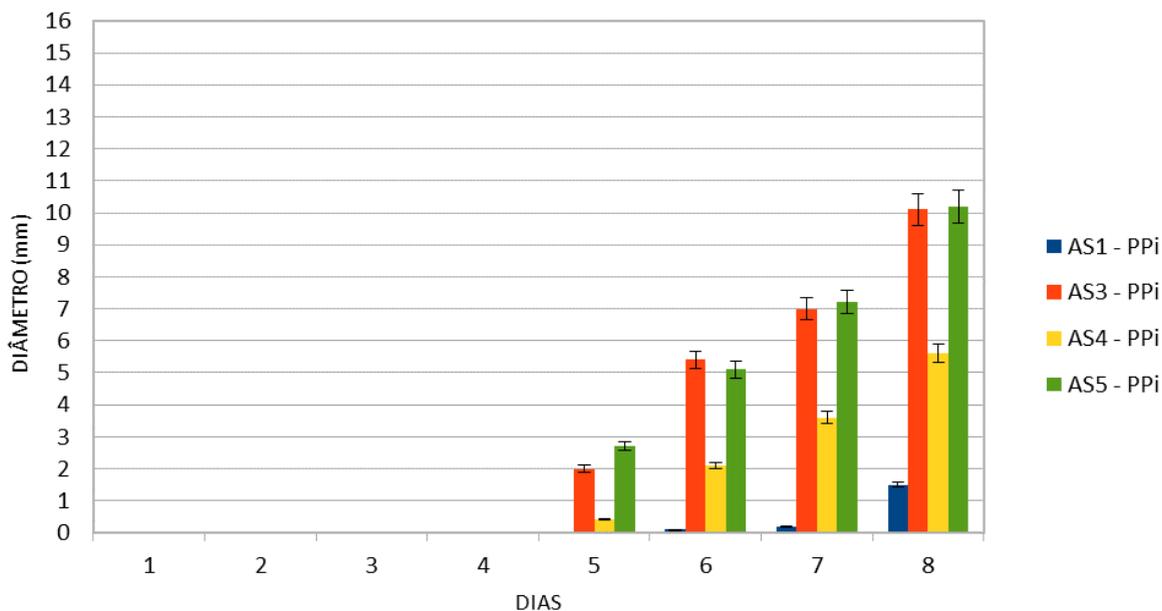
Durante oito dias realizou a medição do diâmetro em milímetros com o auxílio de um paquímetro, da mancha microbiana, em três ângulos de 90°, fazendo posteriormente a média com desvio padrão, como ilustrado nas Figuras 24 e 25, referentes aos ensaios do grupo experimental, executados com os respirômetros FM (22-33) e SM (34-45), respectivamente, tendo como objetivo avaliar se houve incrustação das bactérias no PP e se está ocorrendo o seu consumo. Cada respirômetro representa a ação das linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 sobre o PPt (UV) (FM 22-33) e PPi (SM 34-45), os dados nas Figuras 24 e 25, indicam a média entre as triplicatas de cada inóculo.

FIGURA 24: Diâmetros (mm) da colônia microbiana representados em barra conforme medidos ao longo de oito dias. Os dados representam a média entre as triplicatas de cada linhagem incrustada nos fragmentos de PPt (UV), coletados do grupo experimental, nos ensaios respirométricos (FM 22-33), referentes aos ensaios em triplicatas das linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.



Fonte: autoria própria

FIGURA 25: Diâmetros (mm) da colônia microbiana representados em barra conforme foram medidos ao longo de oito dias. Os dados representam a média entre as triplicatas de cada linhagem incrustada nos fragmentos PPI, coletados dos ensaios respirométricos (SM 34-45), referente ao grupo experimental, dos ensaios em triplicatas das linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.



Fonte: autoria própria

Os dados das Figuras 24 e 25 expõem o crescimento microbiano, que teve início, tanto dos fragmentos de PPt (UV) quanto do PPI, a partir do quinto dia de medição do diâmetro, exceto a linhagem AS1, que iniciou crescimento somente no sexto dia, tendo um salto de crescimento em um intervalo de 24 horas no ensaio com o PPt (UV) (Figura 24). Ainda referente ao PPt (UV), quando comparado com os dados de crescimento do PPI percebe-se que a disponibilidade de nutriente é maior, isso é equiparado quando se olha a velocidade de crescimento radial (VCR) representado na Tabela 5, em que, quando elevada indica que o microrganismo consegue crescer em meio onde a única fonte de carbono é o PP. Entre as linhagens associadas ao PPt (UV), se destacam a AS3 e AS4, com diâmetro de crescimento final quadruplicado em um intervalo de 24 horas (Figura 24). Já nos ensaios com o PPI (Figura 25), a VCR foi bem menor, indicando que a aderência ao PP foi pouco favorável.

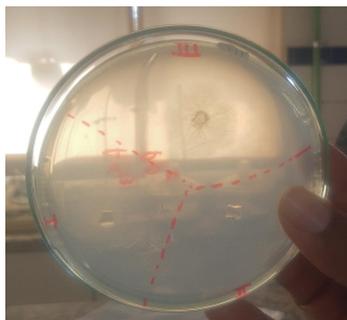
TABELA 5: Velocidade de crescimento radial (VCR), que se expressa pelo coeficiente angular da reta obtida da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo. Estão representadas as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 associadas PPt (UV) e PPi

LINHAGEM	VCR (cm/d)
LINHAGEM + PPt (UV)	
AS1	1,26
AS3	2,14
AS4	2,16
AS5	1,06
LINHAGEM + PPi	
AS1	0,14
AS3	1,48
AS4	0,76
AS5	1,49

Fonte autoria própria

Portanto a análise dos dados obtidos dos ensaios de consumo de substrato em placa (Figura 26), revelou que a aderência de biofilme bacteriano à superfície do PP após sofrer degradação abiótica, foi maior, sendo constatado pela sua velocidade de crescimento, estes dados vão em concordância com Glaser (2019) quando destaca que a alta massa molar deixa o PP impermeável para deposição da membrana celular microbiana, porém a fotodegradação é um ponto de apoio para a adesão do biofilme a superfície dos polímeros em geral, essa afirmação é concomitante a de Franchetti e Marconato (2006) quando destaca que a formação de uma zona clara, distinta, de área circular, indica a biodegradação do polímero pelas colônias incrustadas, isso está associado a adesão na superfície do polímero e também a conversão química, quanto a excreção de enzimas extracelulares.

FIGURA 26: Ilustração da formação radial de crescimento microbiano em placa de Petri

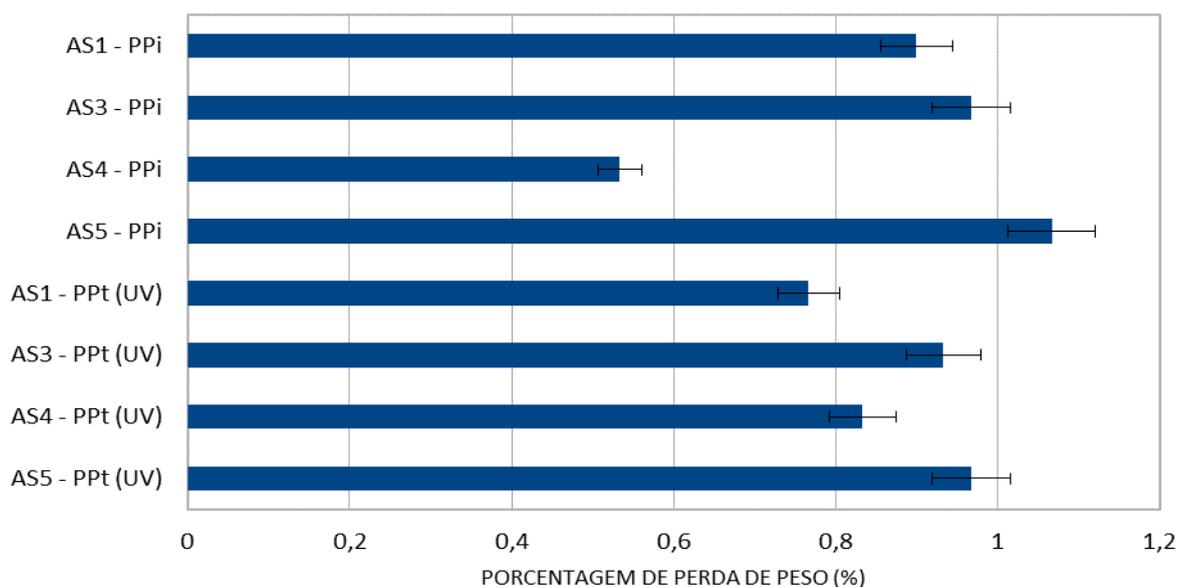


Fonte: autoria própria

5.7 AVALIAÇÃO DE DETERIORAÇÃO DO POLÍMERO

A pesagem do PP após a degradação biótica foi realizada em balança analítica, referentes às amostras retiradas do grupo experimental, dos respirômetros denominados FM (22-33) e SM (34-45). Com esse ensaio, foi evidenciada a ação dos inóculos AS1, AS3, AS4 e AS5 sobre o PPt (UV) (respirômetros FM 22-33) e PPi (respirômetros SM 34-45). A porcentagem de perda de peso (%), representada em gramas, utilizando o cálculo descrito no item 4.4.6, foi expressada na Figura 27, tendo como objetivo verificar se houve ou não perda de massa após os tratamentos.

FIGURA 27: Porcentagem de perda de peso da média das triplicatas de cada inóculo, após biodegradação, referente as porções coletadas do grupo experimental, especificamente dos respirômetros FM (22-33) e dos respirômetros SM (34-45), em que as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5 estão associados ao PPt (UV) e PPi, respectivamente



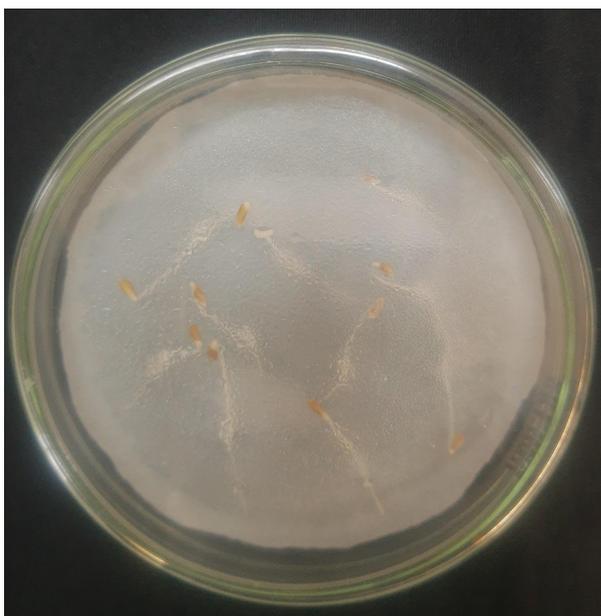
Fonte: autoria própria

A porcentagem de perda de massa das amostras de PP anteriormente biodegradadas, resultou em uma perda não tão expressiva, porém os inóculos AS3 e AS5 se destacam, tanto aquele associado ao PPI quanto ao PPt (UV), representado na Figura 27. Segundo Chamas *et al* (2022) a taxa de degradação da superfície do polipropileno é estimada em 4,6 μm por ano em ambientes marinhos, mesmo acelerado por UV. Para a avaliação estatística os dados do PPt (UV) e do PPI referente a porcentagem de perda de massa de ambos, esse dados foram colocados no programa de estatística ANOVA e determinou que o valores de perda não são significativos ($p < 0,05$). Portanto, esses dados de perda de massa polimérica, ao longo de 56 dias de ensaios respirométricos, foram pouco expressivos, já que uma perda substancial tende a demorar para ser observada, já que o tempo de exposição a degradação biótica desse experimento, segundo a literatura, não é um parâmetro de medição de degradação significativo, visto que para se observar a perda de massa seria necessário anos de experimento.

5.8 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO SUBPRODUTO

O teste de ecotoxicidade com a espécie *Lactuca sativa*, após 5 dias de incubação a 22°C sem incidência luminosa, resultou em 100% de germinação no teste controle com água destilada estéril, em todas as placas controle (triplicatas), como ilustrado na Figura 28.

FIGURA 28: Germinação total das semente de *Lactuca sativa* nos ensaios do grupo controle



Fonte: autoria própria

Nos ensaios com o substrato dos respirômetros FM 22-33 (item 4.4.2), composto pelos inóculos AS1, AS3, AS4 e AS5 associados ao polipropileno tratado com UV, não houve germinação em nenhuma das placas exceto uma. Essa exceção é da placa com o substrato retirado do respirômetro FM-22 (Figura 29), onde germinaram somente duas sementes de *Lactuca sativa* em uma das triplicadas com o inóculo AS1. As sementes nas placas preenchidas com o substrato do grupo experimental dos respirômetros FM 23-33 permaneceram estagnadas. Igualmente estão as placas com os substratos coletados dos respirômetros SM 34-45, sem aparente germinação após 5 dias.

FIGURA 29: Germinação da semente da *Lactuca sativa* no substrato coletado do respirômetro FM-22, associado a linhagem AS1



Fonte: autoria própria

Os ensaios de ecotoxicidade apresentaram somente duas germinação sobre o substrato coletado do respirômetro AS1-PPt (FM-22), diante de todos os outros substratos, após cinco dias de experimento, como os controles tiveram germinação total, validando o experimento, o que se pode dizer diante disso é que as substâncias que se encontram nos ensaios de biodegradação biótica são tóxicas para a espécie bioindicadora, *Lactuca sativa*, podendo ser devido a liberação de substâncias pré-existentes (ALIMI *et al.*, 2018) na composição do polipropileno utilizado, sendo a sua real extensão toxicológica, nos oceanos, principalmente na fauna marinha desconhecida (SOMS; GIACCAGLIA, 2022). Como ressalta Godinho (2020), deve-se fazer mais testes pertinentes aos efeitos do plástico nos oceanos, sendo ainda limitado os dados disponíveis.

Portanto, a interação microrganismo-plástico diante desta pesquisa, em que pode-se verificar a disponibilidade limitada de nutrientes, instigando as bactéria a buscarem o PP como fonte alternativa de carbono, trouxe resultados significativos de colonização da superfície do material, e a cobertura do mesmo por um biofilme bacteriano, sugerindo que a plastisfera pode ser integrada por microrganismos diversos que, ao se adaptarem às condições extremas, podem modificar seu metabolismo enzimático, isso, de acordo com Xiang *et al* (2023), pode resultar em uma gama de recursos microbianos para a bioreciclagem de plástico. A produção acumulada de CO₂ ao final dos 56 dias de respirometria, sendo sustentada pelos resultados de MEV e FTIR, indicou que as linhagens AS1 e AS4 prospectadas, tem potencial para biodegradar o polímero PP, nas condições testadas. Essas condições de adaptação no meio marinho, sendo o meio úmido mais propenso à degradação (CHAMAS *et al*, 2020; PAULA, 2016) provou que os microrganismos são seres com múltiplas funcionalidades que estão longe de serem totalmente compreendidas, tendo um longo caminho ainda a percorrer. No que diz respeito à ecotoxicidade do substrato, é necessário ampliar os testes, para melhor compreensão dos compostos gerados pela biodegradação e sua interação com o meio ambiente, visto que bioensaios com *Lactuca sativa*, podem ser variáveis, sendo altamente sensível a fatores como pH (SILVA, 2021), portanto testes com outras espécies bioindicadoras são recomendados, porém é fato que o subproduto da biodegradação do PP é tóxico para esse organismo-teste e isso levanta sérias reflexões sobre o quanto de material poluente pode estar sendo disperso no meio ambiente até a completa degradação pelos microrganismos e quais caminhos metabólicos são necessários para decompor essas substâncias, cogitando até um consórcio microbiano para seu total consumo desses, limitando ao máximo a poluição ambiental.

6.0 PROPOSTA DE PRODUÇÃO DIDÁTICA

O material produzido a partir do tutorial de Mena *et al.* (2020), poderá fazer parte de uma coleção de materiais didáticos para uso na educação básica. O objetivo de esse equipamento é demonstrar como ocorre a degradação física do plástico, abrindo caminho para a discussão sobre a poluição plástica no ambiente marinho, suas causas e consequências. Esse material tem como público-alvo alunos da educação básica, já que se compreende que a temática abrange todas as faixas etárias, sendo o desenvolvimento de aprendizagens relacionadas à poluição plástica, presente no escopo educacional de forma ampla, já que existe um leque de possibilidades para uso demonstrativo do equipamento, pela diversidade de temas que se co-relacionam dentro da grade curricular.

No que tange à educação básica, esse equipamento pode servir como material de apoio, fazendo parte de práticas experimentais, relacionadas a impactos ambientais e estudo da problemática plástica. Trago como exemplo o conteúdo aplicado no 2º bimestre do 9º ano do fundamental, retirado do Material do Professor (2023), em que se aborda a “poluição ambiental por plástico”, compreendendo a habilidade (EF09CI13):

“(EF09CI13) Propor iniciativas individuais e coletivas para a solução de problemas ambientais da cidade ou da comunidade, com base na análise de ações de consumo consciente e de sustentabilidade bem-sucedidas.” (Currículo Paulista, 2019)

Dentro dessa temática, sobre poluição plástica é possível trabalhar, o histórico, produção e uso do plástico, reflexões acerca do lixo plástico mundial, consequências para a fauna e flora marinha, os perigos do microplástico na cadeia alimentar, a contaminação dos alimentos por partículas plásticas e plásticos biodegradáveis e ações sustentáveis (Caderno do Professor, 2023). Dentro dessa habilidade (EF09CI13) e de tantas outras, relacionadas ao problemas ambientais causado por plásticos, descritas no Currículo Paulista (2019) que compreende todo o ensino básico, é possível utilizar do equipamento para aplicar na prática mecanismos que corroboram com a degradação plástica, entendendo que isso é um exemplo de iniciativa para solucionar essa problemática.

Esse equipamento, com todos os materiais descritos no item 4.2.1, será disponibilizado para as práticas experimentais. Um experimento que pode ser desenvolvido durante as aulas com essa temática, e para a prática, é possível após o período de tratamento com UV dentro da caixa de fotodegradação, pegar esses fragmentos tratados com UV e fragmentos sem tratamento e enterrá-los no solo, de forma que fiquem em contato com os

microrganismos presentes, para que haja biodegradação, sendo realizado a pesagem do material antes de ser enterrado e após retirar o plástico do solo. A duração do experimento no solo pode durar até o final do ano letivo, já que o período deve ser longo para que posteriormente seja possível, ter diferença ou não de peso, entre o peso final e inicial.

Alguns questionamentos podem ser levantados durante o experimento para direcionar a questões pertinentes:

- 1- Será que haverá perda de peso ao final do experimento? Isso pode ser um estímulo para os alunos pensarem em como o plástico pode interferir no meio ambiente.
- 2- Por que o tratamento com UV é utilizado para simular a degradação dos plásticos? Qual é o papel da radiação UV na aceleração desse processo?
- 3- Como os microrganismos estão relacionados à biodegradação dos plásticos? Qual é o papel deles nesse processo e como isso se relaciona com a ciclagem de carbono na natureza?
- 4- Como a degradação dos plásticos e a formação de microplásticos podem afetar a cadeia alimentar marinha? De que maneira isso pode impactar os animais que dependem dela, incluindo os seres humanos?
- 5- Como a degradação dos plásticos se relaciona com a poluição plástica no ambiente marinho? Quais são os principais impactos desse tipo de poluição no ecossistema marinho?
- 6- Como o conhecimento sobre a biodegradação dos plásticos pode influenciar nossas escolhas diárias de consumo? Que ações podemos tomar para contribuir com a redução da poluição plástica e a preservação do meio ambiente?
- 7- Qual é o papel de cada um de nós na mitigação da poluição plástica? Como a conscientização sobre a biodegradação dos plásticos pode incentivar a responsabilidade individual e coletiva em relação ao descarte adequado?
- 8- Com base no que aprendemos sobre os efeitos do UV na biodegradação dos plásticos, que tipo de projetos ou iniciativas poderiam ser desenvolvidos em nossa comunidade para lidar com a poluição plástica?
- 9- Existem alternativas aos plásticos convencionais que sejam mais amigáveis ao meio ambiente? Como a pesquisa sobre biodegradação e poluição plástica pode contribuir para o desenvolvimento de novos materiais sustentáveis?

7.0 CONCLUSÃO

As linhagens de microrganismos de solo selecionadas se adaptaram às condições do experimento, apresentando crescimento e interação com o PP em condições altas de salinidade, desse modo foi possível observar um maior rendimento na biodegradação pela evolução de CO₂ no sistema respirométrico, principalmente dos inóculos AS1 e AS4, indicando que a bioprospecção e adaptação apontam para uma reorganização da diversidade de processos enzimáticos para acessar fontes poliméricas de carbono presentes no meio, isso pode ser visto pela produção superior de CO₂ quando a linhagem AS1 consome o PPt (UV) e o PPI, sendo um diferencial de 28,3% e 20%, respectivamente, a mais comparado com o grupo controle em que se encontra a linhagem AS1 consumindo somente o meio de cultura e quando comparado os dados do PPt (UV) e do PPI associados a linhagem AS4 é possível observar um aumento de 17% a mais quando o PP sofre tratamento UV, indicando que esse é um parâmetro importante para a aceleração da degradação polimérica, em que se destaca uma modificação do material que causa um aumento na biodisponibilidade do polímero como substrato microbiano. Isso foi corroborado pela formação de biofilme bacteriano com possível facilidade, e por consequência uma melhor ação de degradação por parte dos microrganismos. Portanto, diante das diferentes análises para verificar a degradação, em que se pôde correlacionar os dados, garantindo sua consistência, os inóculos AS1 e AS4 se destacam como agentes biorremediadores promissores para biodegradação de microplástico do tipo polipropileno. Em relação aos testes com a *Lactuca sativa*, os ensaios com os substratos provenientes da biodegradação do PP associado às quatro linhagens demonstraram uma alta toxicidade, porém é recomendável fazer testes com outros organismos bioindicadores para se confirmar a ecotoxicidade. Esses dados podem ser interessantes quando consideramos trabalhar com a degradação de polímeros de forma *ex situ*, podendo também ser aplicado a estudos futuros quanto a esforços bioprospectivos de microrganismos de solo como agentes remediadores de polímeros em ambientes salinos, além de contribuir para promover discussões mais aprofundadas sobre a degradação de PP quanto ao seu comportamento ambiental.

REFERÊNCIAS

- ABNT. **Resíduos em solos - Determinação da Biodegradação pelo Método Respirométrico**. ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, 1999.
- ARAÚJO, M. C. B.; CAVALCANTI, J. S. S. **Dieta indigesta: milhares de animais marinhos estão consumindo plásticos**. Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade, Curitiba, v.10, n.5. ISSN2319-2856, 2016
- ALIMI, O. S. *et al.* **Microplástico e nanoplástico em ambientes aquáticos: agregação, deposição e transporte aprimorado de contaminantes**. Environ. Sci. Technol., [s.l.], 52, 4, 1704–1724, 2018
- ALJARADIN, M. **Biodegradation of Microplastics in Drinking Water, a Review**. Sustainable Resources Management Journal, Sweden, 2020, Disponível em > <http://org.10.5281/zenodo.4454872>
- ALMEIDA, L. R. O *et al.* **Plásticos no Ambiente Marinho Frio: uma revisão sobre o potencial de biodegradação microbiana**. Research Society and Development, [s.l.], vol. 10, n. 3, 2021
- ANDREASSEN, E. **Infrared and Raman spectroscopy of polypropylene**. In: **Polypropylene: An A-Z reference**. Editor: J. Karger-Kocsis, p. 320–328, 1999. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4421-6_46
- ASHTER, S.A. **Fundamentos sobre Biodegradabilidade. Introdução à Engenharia de Bioplásticos**, 2016, p.61–80. doi:10.1016/b978-0-323-39396-6.00004-x
- AUTA, H. S. *et al.* **Screening of Bacillus strains isolated from mangrove ecosystems in Peninsular Malaysia for microplastic degradation**. Malaysia: Elsevier: Environmental Pollution, 2017, p.1552-1559
- BARDGETT, Richard D.; USHER, Michael B.; HOPKINS, David W. **Biology diversity and function in soils**. British Ecological Society, New York, ISBN:9780521609876, p. 428, 2005
- BARDAJÍ, D. K. R. **Isolamento de Bactérias com Potencial para Biodegradação de Plásticos**. Ribeirão Preto: [s.n.], 2018, p.83. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia. Orientadora: Stehling, Eliana Guedes
- BOSCARO, M. E. **Biodegradação de Filmes de Polipropileno (PP), Poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) e blenda pré-irradiados com luz UV**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Geociências e Ciências Exatas- Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientadora: Sandra Mara Martins Franchetti, 2011.
- BOWER, D. I., & MADDAMS, W. F. (n.d.). **Infrared and Raman spectra**. The Vibrational Spectroscopy of Polymers, 2010, p. 107–161. doi:10.1017/cbo9780511623189.005

CADERNO DO PROFESSOR. **Currículo Paulista: Material de Apoio**. 2023 < Disponível em>

<https://efape.educacao.sp.gov.br/curriculopaulista/educacao-infantil-e-ensino-fundamental/materiais-de-apoio-2/> acesso: ago/2023

CAI, L.; Wang, Jundong; Peng, Jinping; Wu, Ziqing; Tan, Xiangling (2018). **Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments**. Science of The Total Environment, 628-629(), 740–747. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.079

CAIXETA, Danila Soares *et al.* **Nano e microplásticos nos ecossistemas: impactos ambientais e efeitos sobre os organismos**. [s.n.], Cuiabá, 2018.

CARDOSO, B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia de Solo**, Piracicaba: ESALQ, 2016, 2º ed, cap.5, p. 61-80, DOI: 10.1 16066/9788586481567

CAVALCANTI, E. S. F. B. **Fotodegradação de filmes de polipropileno. Efeito da presença de fotoestabilizantes e pigmentos** / Rebecca Stéfani de Farias Brito Cavalcanti.– Campina Grande, 2017.

CHAMAS, A. *et al.* **Degradation Rates of Plastics in the Environment**. ACS Sustainable Chem. Eng., 2020, p.3494-5311

CHANDRA, P. *et al.* **Microplastic Degradation by Bacteria in Aquatic Ecosystem**. [S.N]: Microorganisms for Sustainable Environment and Health, 2020

CHINELLATO, R. A. M. **Avaliação do potencial de biorremediação de diesel S10 e de espuma para controle de incêndio (AFFF) por bactérias heterotróficas isoladas de sedimentos do Estuário de Santos - SP**. São Vicente, tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, 2023, p.153

COI/UNESCO. **A ciência que precisamos para o oceano que queremos: a Década das Nações Unidas da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável (2021-2030)**. Paris. 2019

COI/UNESCO. **Plano de Implementação: Resumo**. UNESCO, 2020

COLLA, L. M. **Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir do solo Contaminado com Herbicidas Triazínicos** A Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio/jun., 2008

COSTA, C. Z. *et al.* **Degradação Microbiológica e Enzimática de Polímeros: uma revisão**. Quim. Nova, Rio de Janeiro, vol. 38, n. 2, p. 259-267, 2015

COSTA, M. R. **Uso Respirimetria para Avaliação da Biodegradação Aeróbia de Lixiviado de Resíduos Sólidos Urbanos em Latossolo Vermelho-escuro**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, publicação PTARH.DM-125/09, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009, 109p.

CHRISTOFOLETTI, R. A. *et al.* **Década da Ciência Oceânica para o Desenvolvimento Sustentável. E eu com isso?**. Revista OCEANA, 2021 <Disponível em > <http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v73n2/v73n2a08.pdf>

CURRÍCULO PAULISTA. Secretaria de Educação do Estado de São Paulo. **Currículo Paulista**, SEDUC/Undime SP. São Paulo: SEDUC/SP, 2019.

DE PAOLI, M. A. **Degradação e Estabilização de Polímeros**. 1 ed. São Paulo: Artliber, 2008. v. 1, 286 p.

EMBRAPA. **Coleta de Solo para Análise**. Amapá: Embrapa, 2012, ed.2

EVERAERT, G *et al.* **Risk assessment of microplastics in the ocean: Modeling approach and first conclusions**. *Environmental Pollution*, [s.l.], 2018. <Disponível em:> <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.069>. Acesso em: ago/2023

ERIKSEN, M., *et al.* **Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons a float at sea**. *PLoS one*, 9(12), e111913, 2014.

FAUZIAH, S. H *et al.* **Worldwide distribution and abundance of microplastic: How dire is the situation?**. *Waste Management & Research*, [s.l.], 2018. DOI: 10.1177/0734242X18785730.

FONTES, Bruna da Cruz *et al.* **Biorremediação de microplásticos com a colaboração do fungo *Zalerium maritimum***. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, São Paulo, v.17, n. 41, p.132, 2019.

FOTOPOULOU, K. N., KARAPANAGIOTI, K. **Degradation of Various Plastics in the Environment**. [S.N]: Springer International Publishing, 2017

FRANCHETTI, M. M.; MARCONATO, J. C. **Biodegradable polymers - a partial way for decreasing the amount of plastic waste**. *SÃO CARLOS: Quím. Nova* 29 (4) • Jul 2006 • <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000400031>

FREITAS, A. S. M. **Desenvolvimento de filmes finos de organossilicone depositados a plasma para fotoproteção do polipropileno**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/11117>. acesso: ago/2023

GLASER J. A. **Degradação biológica de polímeros no ambiente [Internet]. Plásticos no Meio Ambiente**. IntechOpen; 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85124>

GEWERT, B., PLASSMANN, M. M. MACLEOD, M. **Vias para a degradação de polímeros plásticos flutuando no ambiente marinho**. *Jornal: Ciência Ambiental: processos e impactos*, 2015, ed. 9

GODINHO, I. F. C. **Ecotoxicidade do plástico em ambiente marinho – contributos para um modelo de impacte ambiental.** Mestrado em Engenharia da Energia e do Ambiente. Dissertação realizada sob a orientação do Professor Doutor Nelson Simões Oliveira, 2020

GONÇALVES, P. R. **Diagnóstico, desafios e caminhos da conservação e uso sustentável das zonas costeiras e marinhas do Brasil: agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável, ODS-14** / Paulo Rogério Gonçalves. – Brasília: Enap, 2021.p.189 : iL – (Cadernos Enap, 77)

HALE, R. C. *et al.* **A Global Perspective on Microplastic.** [S.N]: JGR Oceans. Grand Challenges in the Earth and Space Sciences, 2020, volume 125 , Edição. <Disponível em > <https://doi.org/10.1029/2018JC014719>

HABIB, S. *et al.* **Biodeterioration of Untreated Polypropylene Microplastic Particles by Antarctic Bacteria.** Journal Polymers, 2020, 12,2616, doi: 10.3390/polym12112616

HATJE, V., CUNHA, L.C., COSTA, M.F. **Mudanças Globais, Impactos Antropológicos e o Futuro dos Oceanos.** Rev. Virtual Química, 2018, vol.10, no.6, p.1947-1967

HOWARD, S. A. *et al.* **Enrichment of native plastic-associated biofilm communities to enhance polyester degrading activity.** Online journal: *Environmental Microbiology* published by Applied Microbiology International, 2023 <Disponível em > <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16466>

HIMEDIA. **Sea Water Agar (Twin Pack).** [S.l: s.n.], 2015.

IPEA. **ODS – Metas Nacionais dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – ipea**, 2018

IWANICKI, L. **Um oceano livre de plástico [livro eletrônico]:desafios para reduzir a poluição marinha no Brasil** /Lara Iwanicki, Ademilson Zamboni. -- 1. ed. --Brasília, DF : Oceana Brasil, 2020.

JONES, Frances. **Microplásticos.** São Paulo: [S.n.], 2019.

KANEKAR, P. *et al.* Halophiles – **Taxonomy, Diversity, Physiology and Applications.** Microorganisms in environmental management: microbes and environmental, 2012. DOI: 10.1007/978-94-007-2229-3_1

KERSHAW, P. J., *et al.* **Guidelines or the monitoring and assessment of plastic litter and microplastics in the ocean.** Rep. Stud. GESAMP, [s.l.], n. 99, p. 130, 2019.

KRUEGER, M. C. *et al.* **Prospects for Microbiological Solutions to Environmental Pollution with Plastics.** Appl. Microbiol Biotechnol, Germany, 2015, DOI: 10.1007/s00253-015-6879-4

LIMA, A. S. B. *et al.* **A Biorremediação como Técnica de Tratamento de Efluentes Contaminados por Petróleo.** Blucher Chemistry Proceedings, [s.l.], v. 3, n. 1, 2015

LOPEZ, M. V.; CARDOSO, E. JBN. **Metabolismo Microbiano**. In: JURANDY, E.; FASANELLA, C. C.; CARDOSO, E. JBN. **Biorremediação**. In: JURANDY, E.; CARDOSO, B. N.; ANDREOTE, F. D. *Microbiologia de Solo*, Piracicaba: ESALQ, 2016, 2^o ed, cap.13, p. 197-210, DOI: 10.1 16066/9788586481567

MATERIAL DO PROFESSOR. **Currículo Paulista: Material de apoio**. 2023 < Disponível em>
<https://efape.educacao.sp.gov.br/curriculopaulista/educacao-infantil-e-ensino-fundamental/materiais-de-apoio-2/> acesso: ago/2023

MATOS, E. R.; DURRER, A.; ANDREOTE, F. D. **Ecologia Microbiana**. In: JURANDY, E.; CARDOSO, B. N.; ANDREOTE, F. D. *Microbiologia de Solo*, Piracicaba: ESALQ, 2016, 2^o ed, cap.3, p. 37-46, DOI: 10.1 16066/9788586481567

MENA, R. L. *et al.* **Fotodegradação de Polímeros Acompanhada por Infravermelho: Um Tutorial**. Sorocaba: Rev. Virtual Quim, 2020 |Vol 12| |No. 4| |959-968|

MONTAGNOLLI, R. N. **Biodegradação de Derivados de Petróleo com a Aplicação de Biosurfactante Produzido por Bacillus subtilis**. Rio Claro: [s.n.], 2011

MONTAGNER, C. C. *et al.* **Microplásticos: Ocorrência Ambiental e Desafios Analíticos**. Quim. Nova, 2021, Vol. 44, No. 10, p.1328-1352

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes / Brasil - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399 p. ISBN 978-85-99851-70-8**

Millennium Ecosystem Assessment. **ECOSYSTEMS AND HUMAN WELL-BEING: WETLANDS AND WATER Synthesis**. World Resources Institute, Washington, DC, 2005

MOORE, C.; PHILLIPS, C. **Plastic Ocean: How a Sea Captain's Chance Discovery Launched a Determined Quest to Save the Oceans**. [S.N]: Avery, 2011, ISBN: 978-1583334249

NAÇÕES UNIDAS BRASIL. **Objetivo de desenvolvimento sustentável 14: vida na água**. Nações Unidas Brasil, Brasília, DF, 2023. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/14>. Acesso em: 19 ago. 2023.

NERLAND, I. L. *et al.* **Norwegian Institute for Water Research Microplastic Geographical area Oslo Distribution Printed NIVA Client(s) Miljødirektoratet Negative environmental impact**. [S.I: s.n.], 2014.

NEVES, M. C. P. *et al.* **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, p. 29-30, 1992

NIHEI, Y. *et al.* **High-Resolution Mapping of Japanese Microplastic and Macroplastic Emissions from the Land into the Sea**. Journal MDPI: Water, Tokyo, 27 mar. 2020

NONNATO, L. V. **Instrumentação Oceanográfica**. In: HARARI, J. **Noções de Oceanografia**. São Paulo: Instituto Oceanográfico [Livro Eletrônico], 2021, p. 763-788

OLIVEIRA, A. L. **Análise de Política Pública sobre Lixo Marinho em Diferentes Níveis Governamentais**. São Paulo: Universidade de São Paulo Instituto Oceanográfico, 2013

OBERBECKMANN, S., LABRENZ, M. **Marine Microbial Assemblages on Microplastics: Diversity, Adaptation, and Role in Degradation**. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 2020 <Disponível em > <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-010633>

PAIVA, D. L. *et al.* **Introdução à Espectroscopia**. [S.N.]: Cengage Learning, 2015, p. 733, ed.2, ISBN - 13 978-8522123384

PAULA, Vinícius de Carvalho Soares de. **Avaliação da fitotoxicidade e ecotoxicidade do extrato bruto de *Microcystis aeruginosa***. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso – Tecnologia em Processos Ambientais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

PEDERSEN, R. *et al.* **Study for the strategy for a non-toxic environment of the 7th EAP**. [s.l.: s.n.], 2017.

PHAN, S. *et al.* **The effect of weathering environments on microplastic chemical identification with Raman and IR spectroscopy: Part I. polyethylene and polypropylene**, *Polymer Testing*, Volume 116, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2022.107752>.

PIUBELI, Francine Amaral. **Caracterização da Comunidade Microbiana em Ambientes Salinos e suas Possíveis Aplicações Biotecnológicas**. São Paulo: [s.n.], 2011. 240 p.

ROSSATTO, a. *et al.* **Microplastics in aquatic systems: A review of occurrence, monitoring and potential environmental risks**. *Environmental Advances*, 2023, Volume 13, ISSN 2666-7657 <Disponível em > <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100396>.

ROUILLON C, *et al.* **Is Carbonyl Index a quantitative probe to monitor polypropylene photodegradation?, *Polymer Degradation and Stability* (2016), doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.12.011.**

ROGERS, K. L. *et al.* **Micro-by-micro Interactions: How Microorganisms Influence the Fate of Marine Microplastic**. Online paper *Limnology and Oceanography Letters*. Special Issue: Microplastics in marine and freshwater organisms: Presence and potential effects, 2020 Volume5, Issue1, <https://doi.org/10.1002/lol2.10136>

SAMAR, A.F, CARTER, D. & ABBAS, A. **Biodeterioração de polipropileno pré-tratado por *Aspergillus terreus* e *Engyodontium album*** . *npj Mater Degrad* 7 , 28 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41529-023-00342-9>

SILVA, R. A. S. **Padronização de bioensaios com *Lactuca sativa* L. e sua aplicação na avaliação toxicológica de efluentes contendo azocorantes tratados por foto-fenton** / Rafael Antonio Santos da Silva, 2021.

SILVA, J. R.S, NUNES, L. S., RABELLO, M. S. **Fotodegradação do Polipropileno contendo Combinação de Fotoestabilizantes**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2016, vol. 11, n. 2

SOBRAL, P.; FRIAS, J.; MARTINS, J. **Microplásticos nos oceanos - um problema sem fim à vista**. [s.l: s.n.], ISSN: 1647-2829. 2011

SOMS, P., GIACCAGLIA, S. L. F. **Toxicidad de plásticos procedentes del mar mediante bioensayos con *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)** In Marcelo Pompêo, Bárbara Rani-Borges, Teresa Cristina Brazil de Paiva (Organizadores) **Microplásticos nos ecossistemas: impactos e soluções**, 2022 <Disponível em > <http://ecologia.ib.usp.br/microplastico/> acesso: ago/2023

TOC. **The Ocean Cleanup**. TOC, 2022 <Disponível em > <https://theoceancleanup.com/oceans/> .acesso: ago/2023

TURRA, A., PINHO, R, ANDRADE, ANDRADE, J. B. **A ciência oceânica no Brasil e desafios transversais para a produção do conhecimento**. **Ciência. Culto**. [on-line]. 2021, vol.73, n.2, pp.07-11. <Disponível em: > <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602021000200003>. acesso: ago/2023

TURRA, A. *et al.* **Lixo nos Mares: do entendimento a solução**. São Paulo: Instituto Oceanográfico de São Paulo, 2020.

UNEP, NOAA. **The Honolulu Strategy: A global framework for prevention and management of marine debris**. Honolulu, Hawaii: UNEP NOAA, 2011.

VERNON, L.P.; ZAUGG, W.S. **Photoreductions by fresh and aged chloroplasts; requirement for ascorbate and 2,6-dichlorophenolindophenol with aged chloroplasts**. Journal of Biological Chemistry, v. 235, p. 2728-2733, 1960.

VIEIRA, J. S. C. **Plásticos biodegradáveis: análise de falsas alegações e de normas técnicas de biodegradabilidade frente a parâmetros biogeoquímicos de ambientes marinhos**. In Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira da Universidade Federal de São Paulo para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências /Orientador: Prof. Dr. Ítalo Braga de Castro, 2021

XIANG, J. K. *et al.* **Plastic-microbe interaction in the marine environment: Research methods and opportunities**. [S.N.]: Elsevier: Environment International, 2023, Volume 171<Disponível em > <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107716>

ZAMORA, A. M. *et al.* **Atlas do Plástico: fatos e números sobre o mundo dos polímeros sintéticos**. Heinrich Böll Stiftung, Rio de Janeiro, 2020.

YOSHIDA, F. A., STOFT, R. **Mapeamento digital de atributos e classes de solos da UFSCar- Araras/SP**. Revista Ciência, Tecnologia e Ambiente, 2016, Vol. 3, No. 1,p. 1-11, ISSN 2359-6643

ANEXOS

ANEXO 1 - Aumento gradual das concentrações de NaCl nos ensaios propostos

Sequência de ensaios de adaptação	NaCl	Água destilada
1	0,075 g	10 mL
2	0,150 g	10ml
3	0,225 g	10ml
4	0,300 g	10ml

ANEXO 2 - Formulação do caldo nutriente (CN) utilizado acrescido de NaCl para atingir 3,5% de salinidade equivalente à água do mar

Ingredientes	g/L
Extrato de carne	1,000
Extrato de levedura	2,000
Peptona	5,000
Cloreto de sódio	5,000

ANEXO 3 - Componentes do ágar marinho

Ingredientes	Gramas/Litro
Parte A	
Extrato de levedura	5
Extrato de carne	3
Peptona	5
Ágar	15
Parte B	
Cloreto de cálcio	0,1
Cloreto de potássio	0,7
Cloreto de sódio	24
Cloreto de magnésio	5,3
Sulfato de magnésio	7

ANEXO 4 - Componentes da solução marinha.

Ingredientes	Gramas/Litro
Parte A	
Extrato de levedura	5
Extrato de carne	3
Peptona	5
Parte B	
Cloreto de cálcio	0,1
Cloreto de potássio	0,7
Cloreto de sódio	24
Cloreto de magnésio	5,3
Sulfato de magnésio	7

Fonte: (HIMEDIA, 2015) modificado.

ANEXO 5 - Caldo nutriente modificado. Concentração de cloreto de sódio a 3,5%

Ingredientes	g/L
Extrato de carne	1,000
Extrato de levedura	2,000
Peptona	5,000
Cloreto de sódio	3,500

ANEXO 6 - Dados da porcentagem de perda de massa (%) dos PP retirados dos respirômetros FM (22-33) associados às linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.

Porcentagem de perda de peso (%) - respirômetros SM (34-45)											
SM 34-36			SM 37-39			SM 40-42			SM 43-45		
AS1 - PPI			AS3 - PPI			AS4 - PPI			AS5 - PPI		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,8	0,1	1,4	1	0,5	1,3	0,9	0,7	0,9	0,6	0,9	1,4

ANEXO 7 - Dados da porcentagem de perda de massa (%) dos PP retirados dos respiômetros FM (22-33) associados às linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5.

Porcentagem de perda de massa (%) - respiômetros FM (22-33)											
FM 22-24			FM 25-27			FM 28-30			FM 31-33		
AS1- PPt			AS3 - PPt			AS4 - PPt			AS5 - PPt		
1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0,7	0,9	1,1	0,8	1,3	0,8	0,4	1,2	0	1,4	1	0,8

ANEXO 8 - Dados de produção de CO₂ acumulado (mg) do grupo controle C1 (solução marinha), C2 (solução marinha + PPt (UV)) e C3 (solução marinha + PPI) nos ensaios respiométricos

Tempo	C1	C2	C3
7	22,22	26,69333333	28,6
14	46,86	54,41333333	57,12666667
21	68,93333333	71,02333333	74,58
28	89,83333333	84,00333333	88,36666667
35	97,60666667	88,47666667	94,08666667
42	116,2333333	98,23	106,1866667
49	138,6733333	111,3566667	121
56	163,5333333	124,9233333	137,8666667

ANEXO 9 - Dados de produção de CO₂ acumulado (mg) do grupo controle C4 (solução marinha + as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5) nos ensaios respirométricos

Tempo (dias)	AS1 - C4	AS3 - C4	AS4 - C4	AS5 - C4
7	30,36	29,48	28,23333333	30,8
14	63,36	62,48	60,94	63,8
21	83,96666667	84,33333333	84,99333333	87,34
28	97,75333333	102,2266667	102,3	108,1666667
35	98,26666667	129,5066667	131,8533333	136,62
42	107,6533333	142,4133333	144,9066667	149,16
49	117,5533333	156,64	161,48	163,46
56	132,3666667	173,2133333	179,1533333	177,8333333

ANEXO 10 - Dados da produção de CO₂ acumulado (mg) do grupo experimental (respirômetros FM e SM) referentes ao PPt (UV) e PPi associados as linhagens AS1, AS3, AS4 e AS5

Tempo (dias)	AS1 - PPt (UV)	AS3 - PPt (UV)	AS4 - PPt (UV)	AS5 - PPt (UV)	AS1 - PPi	AS3 - PPi	AS4 - PPi	AS5 - PPi
7	23,32	28,30666667	30,36	29,92	31,09333333	30,28666667	32,63333333	33
14	56,17333333	59,98666667	63,21333333	60,06	62,33333333	63,28666667	65,63333333	66
21	79,93333333	79,12666667	88,29333333	88,22	82,64666667	86,31333333	87,19333333	89,98
28	96,50666667	99,44	108,0933333	106,92	97,09333333	106,48	97,97333333	104,6466667
35	130,6066667	137,3533333	143,44	140,14	128,1133333	140,8	127,82	139,1866667
42	145,7866667	151,0666667	157,1533333	151,7266667	139,1133333	152,3866667	137,28	146,74
49	165,1466667	165,1466667	173,0666667	164,2666667	153,4866667	166,54	147,0333333	162,14
56	184,6533333	182,0133333	189,5666667	178,3466667	165,3666667	179,96	157,3733333	176,44

ANEXO 11 - Dados da produção de CO₂ acumulado (mg) do grupo experimental referentes ao PPt (UV) e PPI associados as linhagens AS4

Tempo (dias)	AS4 - PPt (UV)	AS4 - PPI
7	30,36	32,63333333
14	63,21333333	65,63333333
21	88,29333333	87,19333333
28	108,09333333	97,97333333
35	143,44	127,82
42	157,15333333	137,28
49	173,0666667	147,0333333
56	189,5666667	157,3733333

ANEXO 12 - Dados da produção de CO₂ (mg) do grupo controle C4-AS1 (solução marinha + linhagem AS1) e do grupo experimental referentes ao PPt (UV) e PPI associados as linhagens AS1

Tempo (dias)	AS1 - C4	AS1 - PPt (UV)	AS1 - PPI
7	30,36	23,32	31,09333333
14	63,36	56,17333333	62,33333333
21	83,96666667	79,93333333	82,64666667
28	97,75333333	96,50666667	97,09333333
35	98,26666667	130,6066667	128,1133333
42	107,6533333	145,7866667	139,1133333
49	117,5533333	165,1466667	153,4866667
56	132,3666667	184,6533333	165,3666667

ANEXO 13 - Dados de perda de massa dos dois tratamentos, com o PPi e o PPt (UV)

Tratamentos	% Perda de massa
AS1 – PPi	0,9
AS3 - PPi	0,9666666667
AS4 - PPi	0,5333333333
AS5 - PPi	1,066666667
AS1 - PPt (UV)	0,7666666667
AS3 - PPt (UV)	0,9333333333
AS4 - PPt (UV)	0,8333333333
AS5 - PPt (UV)	0,9666666667

ANEXO 14 - Dados do diâmetro (mm), medidos durante 8 dias, uma vez ao dia, com o auxílio do paquímetro, do crescimento das linhagens AS1, AS3, AS4 e SA5 que consumiram o PPt (UV) retirados do respirômetro FM (22-33)

Dias	Diâmetro em milímetros - respirômetros FM (22-33)											
	FM 22-24			FM 25-27			FM 28-30			FM 31-33		
	AS1- PPt			AS3 - PPt			AS4 - PPt			AS5 - PPt		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	2,46	1,73	4,23	-	0,10	7,16	2,16	0,80	1,83
6	4,06	3,40	4,20	4,56	3,43	15,20	4,43	6,23	14,80	4,60	3,43	3,73
7	5,93	6,20	7,23	6,56	4,40	20,33	5,63	8,13	17,93	5,36	3,46	3,80
8	8,20	8,40	10,13	9,86	6,93	26,70	11,10	9,60	22,80	10,26	6,33	7,10

ANEXO 15 - Dados do diâmetro (mm), medidos durante 8 dias, uma vez ao dia, com o auxílio do paquímetro, do crescimento das linhagens AS1, AS3, AS4 e SA5 que consumiram o PPI retirados do respirômetro SM (34-45)

Dias	Diâmetro em milímetros - respirômetros SM (34-45)											
	SM 34-36			SM 37-39			SM 40-42			SM 43-45		
	AS1 - PPI			AS3 - PPI			AS4 - PPI			AS5 - PPI		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	2,20	-	4	-	-	1,46	-	1,83	6,36
6	-	0,36	-	7,93	-	8,50	3,13	-	3,20	-	3,96	11,40
7	-	0,66	-	11,30	-	9,73	5,36	-	5,43	-	4,10	17,73
8	1,46	3,20	-	16,86	-	13,50	9,70	-	7,16	3,36	7,73	19,50

ANEXO 16 - Dados do tempo, em minutos, que o DCPIP demorou em cada ensaio para ficar incolor.

ENSAIOS	TEMPO (minutos)
Branco	-
CM	-
C _{pp}	-
CI1	250
CI2	255
CI3	267
CI4	205
MO1	259
MO2	258
MO3	271
MO4	208

ANEXO 17 - Resultado do teste na Calculadora ANOVA unidirecional, incluindo Tukey HSD da Social Science Statistics (disponível em: <https://www.socscistatistics.com/tests/anova/default2.aspx>)

Resumo dos dados						
	Tratamentos					
	1	2	3	4	5	Total
N	23	22				45
ΣX	69	59				128
Significar	3	2.6818				2.844
ΣX^2 -	463	373				836
Desv. Padrão	3.4112	3.198				3.2749

Detalhes do resultado				
Fonte	SS	df	EM	
Entre tratamentos	1.1384	1	1.1384	$F = 0,10398$
Dentro dos tratamentos	470.7727	43	10.9482	
Total	471.9111	44		

O valor da razão f é 0,10398. O valor p é 0,748669. O resultado *não* é significativo em $p < 0,05$.