



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

PROSPECÇÃO DE MICROORGANISMOS COM POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO DE POLIETILENO

JULIANNA BARBOSA PEIXOTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Molecular do Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Ricardo Henrique Krüger

2013



Universidade de Brasília
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Celular
Pós-graduação em Biologia Molecular

PROSPECÇÃO DE MICROORGANISMOS COM POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO DE POLIETILENO

JULIANNA BARBOSA PEIXOTO

Dissertação aprovada pela banca:

Dr. Ricardo H. Krüger (orientador) (Universidade de Brasília)

Dra. Cynthia M. Kyaw (Universidade de Brasília)

Dr. Georgios Pappas Jr. (Universidade de Brasília)

Dr. Robert Miller (Universidade de Brasília)

Brasília, 2013

Em memória de meu amado irmão Leonardo Peixoto

Grandes homens inspiram grandes vitórias

Minha motivação é a esperança de reencontrá-lo na Glória do Senhor.

A ele dedico esse trabalho e todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a meu Senhor e Salvador. Minha força vem Dele, e só quem O conhece consegue entender tamanha complexidade. Sem Ele, nada é possível. Tudo é por Ele e para Ele. Ademais, toda obra nos céus e abaixo destes é Dele. Obrigada, Pai amado, por permitir que possamos conhecer alguns de Seus milagres. Minha vida será sempre para Te servir e dar graças ao nome de Jesus.

Agradeço a meu orientador, Ricardo Krüger, por toda a confiança depositada em mim e no presente trabalho. Faltam-me palavras para descrever a admiração que sinto por seu trabalho, inspiração muito presente em meus dias de dedicação à pesquisa. Obrigada pela ajuda e incentivo ao longo desses 4 anos. Espero que esse seja apenas o começo de uma longa “caminhada científica”.

Agradeço aos membros da banca de defesa desse trabalho de mestrado - os doutores Cynthia Kyaw, Georgios Pappas e Robert Miller - por toda a disponibilidade, contribuição e paciência.

Agradeço ao meu eternamente amado irmão Leonardo. Só tenho a agradecer a Deus por me conceder a honra de ter como irmão essa pessoa iluminada, bondosa, generosa, trabalhadora, entre inúmeras outras qualidades. Deu-nos nossa preciosa Luiza, seu legado. Foi um verdadeiro exemplo de coragem, devoção e determinação, com o qual pude conviver por breves 25 anos, porém cheios de amor. Minha vida nesse mundo será sempre repleta de saudades de você, Leozinho. Mas sei que estás desfrutando o melhor na casa do Pai. Viverei na esperança de reencontrá-lo para que continuemos nossa história por toda a eternidade. Você é a mais linda canção. Amor eterno, saudade passageira, expectativa inigualável.

Agradeço a meus pais, exemplos de força, fé e amor. Devo a eles tudo o que sou, tudo o que tenho, tudo o que posso e tudo que hei de ser, ter e poder. Volto a eles toda a minha admiração. Vocês são minha constante inspiração, meus anjos, minha luz. Vocês são tudo o que eu quero me tornar, vocês são a minha direção... como eu os amo! Obrigada pela família maravilhosa que vocês me deram. Obrigada por me levantarem, por me aplaudirem, por me repreenderem, por me ajudarem, por me educarem, por me apoiarem, por me amarem e, acima de tudo, por não desistirem de seguir. Obrigada por serem vocês. Obrigada, Deus, pela vida deles.

Agradeço a meu amado irmão Leandro. Lindo, em todos os sentidos possíveis e impossíveis. Minha

admiração e meu amor por ele supera todas as fronteiras e todos os limites! Homem bom, correto, íntegro, guerreiro e vitorioso. No final, estaremos só nós dois, irmão amado, mas estaremos unidos e nada nunca vai quebrar essa união. Quero estar sempre a seu lado, e ser a primeira a te aplaudir em cada vitória, ou limpar suas lágrimas em cada dificuldade. Eu te amo muito! Obrigada por sempre me inspirar.

Agradeço a toda a minha família: avós, Bibi, tias, primos e cunhadas. Vocês são parte fundamental da minha história, meu começo e meu meio. E essa história é escrita, favorecida e inspirada por vocês. Obrigada por fazerem parte dela e por torná-la possível! Amo vocês.

Agradeço ao meu namorado, Werner. Obrigada por todo suporte, força, ajuda, conselhos e carinho. Quanta admiração eu sinto por você, em tantas diferentes dimensões. Na verdade, em todas as dimensões. Obrigada por tudo!

Agradeço a meus pais espirituais, Beth e Soares, por sempre me direcionarem ao caminho do Senhor. Como Deus foi bom comigo ao colocá-los em minha vida! Que grandes exemplos admiráveis vocês são! Obrigada por toda a ajuda, por todas as orações, por serem tão amigos, pela presença constante em todos os momentos, pelo suporte inestimável oferecido a mim e a minha família.

Agradeço a minha grande amiga Elisa. Amizades assim não são encontradas em qualquer lugar ou a qualquer momento. Sem ela, tudo teria sido mais amargo, mais difícil. Obrigada, amada amiga, por estar sempre presente, por me mostrar que, mesmo nos momentos mais cruéis, existem motivos para pequenas alegrias, pequenos gestos que fazem toda a diferença. É sempre muito fácil estar perto de alguém nos momentos bons, mas, com seu coração lindo, você sempre mostra que é possível estar perto em todos os momentos, sempre com um amável sorriso no rosto. Me faltam palavras para agradecer, mas, novamente, eu continuarei tentando: muito obrigada!

Agradeço às queridas amigas Alinne Castro, Regina Sartori e Gabriela Lira por, como se não bastassem todos os momentos marcantes no laboratório, serem pessoas tão cativantes! Sinto muita falta de vocês durante essa jornada! Obrigada por toda força e apoio.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório: Hon, Linne, Gaby, Re, Renata, Fabys, Lucas, Samuca, Vic, Alinne, Camila, Débora e Carol. Como é/foi bom ter a honra de conviver com pessoas

tão incríveis. Vocês não apenas adoçaram meus dias, como também contribuíram para que essa vitória pudesse ser atingida.

Agradeço à professora Cynthia pela minha formação, pois ela é parte fundamental dessa vitória. Foi ela quem plantou a semente do “amor à microbiologia” em meu coração. Além de ser uma exemplar orientadora, foi ela quem acompanhou e dirigiu meu crescimento ao longo de quase toda a minha graduação, com muita doçura, humildade e paciência.

Agradeço, também, aos meus lindos cachorrinhos: Tuti e Filó. Eles tornam meus dias tão felizes e cheios de amor...! Eles são a minha família por coevolução... são meus nenenzinhos!

Agradeço ao CNPq pelo financiamento relativo à pesquisa realizada ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Sr. Ofir da empresa Plastopil (Israel) por gentilmente ceder os filmes de polietileno utilizados no presente trabalho.

Agradeço à empresa Life Technologies por gentilmente sequenciar e montar o genoma do isolado PE 187.

Agradeço a todos os amigos, sem os quais nada disso teria sido possível. É difícil agradecer a todos nominalmente, mas vocês sabem que meu coração cita cada um de vocês pelo respectivo nome e diz: muito obrigada!

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações dos polímeros sintéticos *	6
Tabela 2. Propriedades das série de alcanos/polietilenos *	9
Tabela 3. Protocolo de preparo dos meios de cultura mínimos sem fontes de carbono.....	31
Tabela 4. Meio Nutrient Broth (Difco).....	32
Tabela 5. Meio R2A (Difco).....	32
Tabela 6. Meio Czapek-dox (Difco).....	32
Tabela 7. Meio Middelbrook (Difco)	32
Tabela 8. Meio Marine Broth (Difco)	33
Tabela 9. Reagentes utilizados nas reações de amplificação do gene do 16S rRNA.....	34
Tabela 10 . Resumo da presença de viabilidade celular dos microorganismos aderidos ao filme de polietileno (PE) e de seus controles negativos (C-) após 12, 15 e 20 dias de cultivo.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de plásticos petroquímicos convencionais (D. L. Pavia et al., 1988).....	7
Figura 2. Estrutura química do Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(3-hidroxi-butirato) (PHB), Poli(propionolactona) (PPL), Poli(ϵ -caprolactona)(PCL), Poli(etileno succinato) (PES), Poli(butileno succinato) (PBS), Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) and Poli(éster carbonato) (PEC) (Tokiwa & Calabia, 2004).....	8
Figura 3. Relação entre massa molecular e ponto de fusão para a série dos alcanos.. ..	9
Figura 4. Comparação entre as estruturas e morfologias da cera e do polietileno.....	11
Figura 5. Ciclo de produção de plásticos (Clift, 1996; Floriana et al., 2005).....	16
Figura 6. Esquema da biodegradação de polímeros em ambientes naturais (Adaptado de Lucas et al., 2008).	21
Figura 7. Representação química do etileno e do polietileno	22
Figura 8. Mecanismo proposto para degradação de polietileno (Arutchelvi et al., 2008)	25
Figura 9. Imagens de ecossistemas impactados pela poluição decorrente de descartes plásticos	29
Figura 10. Plásticos coletados apresentando indícios macroscópicos de degradação	41
Figura 11. Cultivo em meios R2A (A, B), marine broth (C), czapek-dox (D) e nutrient broth (E) sólidos após inóculo da suspensão de microorganismos colonizadores dos debrís plásticos coletados.....	42
Figura 12. Cultivo em meios marine broth (A), middelbrook (B), R2A (C, D), czapek-dox (E) e nutrient broth (F) sólidos representando parte da diversidade microbiana isolada.....	42
Figura 13. Crescimento microbiano sobre as partículas de parafina em meio mínimo contendo	

parafina 1%.....	43
Figura 14. Controles positivos e negativos dos 647 isolados cultivados em diferentes meios de cultura.....	44
Figura 15. Halos de degradação de óleo mineral e ausência destes após cultivo em meio mínimo sólido contendo óleo mineral 1%.....	44
Figura 16. Géis de agarose 1% dos DNAs genômicos corados com brometo de etídio	45
Figura 17. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídio dos fragmentos do gene do 16S rRNA.....	45
Figura 18. Eletroforese em gel desnaturante de formaldeído dos RNAs totais extraídos.	46
Figura 19. Cladograma de similaridade de seqüências dos genes do 16S rRNA.	49
Figura 20. Adesão e viabilidade celulares de B. subtilis	53
Figura 21. Adesão e viabilidade celulares de E. coli	54
Figura 22. Adesão e viabilidade celulares de PE 63	55
Figura 23. Adesão e viabilidade celulares de PE 157	56
Figura 24. Adesão e viabilidade celulares de PE 187	57
Figura 25. Adesão e viabilidade celulares de PE 591	58
Figura 26. Cobertura do genoma anotado e proporção da distribuição dos genes entre as respectivas categorias de genes identificadas	61

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 EVOLUÇÃO HISTÓRICA DO DESENVOLVIMENTO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS	4
1.2 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS	6
1.3 SÍNTESE E CATEGORIAS DE POLÍMEROS SINTÉTICOS	12
1.4 DESCARTE E MANEJO DOS PLÁSTICOS PÓS-CONSUMO	13
a) <i>Deposição em aterros</i>	14
b) <i>Incineração</i>	15
c) <i>Reciclagem</i>	15
1.5 BIODEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS	17
a) <i>Polímeros biodegradáveis</i>	18
b) <i>Biodegradação</i>	19
1.6 CARACTERIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DO POLIETILENO	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVO GERAL	30
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. METODOLOGIA	31
5.1 COLETA DE MATERIAIS E CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA MICROBIANA	31
5.2 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE ÓLEO MINERAL	33
5.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO 16S rRNA	34
5.4 LIMPEZA DAS VIDRARIAS UTILIZADAS	35
5.5 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE POLIETILENO	35
5.6 PREPARO DE MATERIAIS E SOLUÇÕES RNASE FREE	36
5.7 PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL	36
5.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR, TRANSFORMAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA	37
5.9 CULTIVO DOS ISOLADOS EM MEIO MÍNIMO COM FILMES DE POLIETILENO	38
5.10 ANÁLISE DA ADESÃO MICROBIANA AOS FILMES DE POLIETILENO	39
5.11 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO ISOLADO PE 187	39
6. RESULTADOS	41
6.1 COLETA DE MATERIAIS E CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA MICROBIANA	41
6.2 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE ÓLEO MINERAL	43
6.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO 16S rRNA	45
6.4 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE POLIETILENO	46
6.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS	47
6.6 CULTIVO DOS ISOLADOS E ANÁLISE DOS FILMES DE POLIETILENO	50
6.7 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO ISOLADO PE 187	59
7. DISCUSSÃO	62
8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXO I	90
ANEXO II	104

RESUMO

O polietileno é o polímero sintético mais largamente produzido e utilizado, de modo que sua produção mundial corresponde a aproximadamente 50 milhões de toneladas/ano, mais de um terço da produção total de polímeros sintéticos. Essa elevada produção é justificada pela alta versatilidade, resistência e durabilidade desses materiais, características promissoras para atender à alta demanda da sociedade. No entanto, essas aparentes qualidades consistem em uma dualidade de proporções catastróficas, visto que esses materiais, resistentes e duráveis, levam cerca de 100 a 500 anos para se decompor em ambientes naturais. Diante desse panorama, a sociedade enfrenta crescentes problemas conseqüentes da poluição gerada pela ineficiência das atuais técnicas de gestão desses materiais após seu descarte.

Nesse contexto, a biodegradação emerge como alternativa sustentável, pois consiste na mineralização desses materiais mediante submissão ao metabolismo microbiano. Empregando-se técnicas de cultivo, embasadas na utilização de diferentes meios restritivos, foi possível isolar 647 microorganismos a partir de debris plásticos descartados em ambientes naturais. Esses isolados foram pré-selecionados com base em suas capacidades de degradar óleo mineral, alcano assimilável quimicamente semelhante ao polietileno. Os microorganismos que apresentaram esse fenótipo foram submetidos a culturas contendo o polietileno como única fonte de carbono. A fim de detectar indiretamente a ocorrência de biodegradação desse polímero, mensurou-se a viabilidade celular após diferentes períodos de cultivo.

A atividade metabólica foi estimada por meio da quantificação do RNA total após o cultivo, além da visualização de microorganismos aderidos ao polietileno previamente corados com os fluoróforos SYTO9® e iodeto de propídio, repórteres de viabilidade celular. Ao todo, três diferentes gêneros de bactérias, *Comamonas sp.*, *Deftia sp.* e *Stenotrophomonas sp.*, compreendem os nove isolados que se apresentaram como potenciais biodegradadores de polietileno. Em virtude dos resultados encontrados, depreende-se que o presente estudo contribuirá a longo prazo para fornecer um manejo adequado, sustentável e lucrativo a esses materiais pós-consumo.

Palavras-chave: biodegradação, polietileno, plásticos, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*

ABSTRACT

Polyethylene is the most consumed synthetic polymer with a current global production of 50 million tons per year. This significant production is due to its versatility, resistance and durability, promising features in relation to the increasing demand for polyethylene materials. However, these qualities imply an increasing ecological threat to natural environments, since they take from 100 to 500 years to deteriorate under environmental conditions. Consequently, all living organisms increasingly face the severe impact of disposed plastic materials accumulated all over the world.

In this context, biodegradation rises as a sustainable alternative to manage these residues, proposing the submission of these materials to mineralization by microbial metabolisms. By using different cultivation techniques, including cultivation under restrictive conditions, it was possible to isolate 647 microorganisms from plastic debris disposed on natural environments. These isolates were pre-selected based on their capabilities of degrading mineral oil, a relatively short-chain alkane chemically similar to polyethylene. The microorganisms presenting that phenotype were cultivated in restrictive culture medium containing a polyethylene film as the sole carbon source. In order to indirectly detect the polymer degradation, microbial viability was assessed through different periods of cultivation.

In addition, metabolic activity was estimated through total RNA quantification, and the cells adhered to the films were visualized by fluorescence microscopy after staining following a fluorescence-based assay for bacterial viability. As a result, three novel bacterial genera, *Comamonas sp.*, *Delftia sp.* and *Stenotrophomonas sp.*, comprising nine different isolates, were shown to biodegrade polyethylene. Due to these findings, the present study will contribute to a future appropriate, sustainable and profitable management of the post-consume plastic materials.

Key words: biodegradation, polyethylene, plastics, *Comamonas*, *Stenotrophomonas*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 EVOLUÇÃO HISTÓRICA DO DESENVOLVIMENTO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

Os avanços tecnológicos sofridos pela sociedade nas últimas décadas impulsionaram o desenvolvimento de materiais versáteis, eficientes e de alta durabilidade, que fossem capazes de dar suporte ao intenso crescimento industrial de escala global. Diante desse panorama surgiram os plásticos, polímeros sintéticos de cadeias longas e alta massa molecular cujas propriedades físico-químicas os tornam particularmente promissores para atender a essa demanda. Plásticos são produzidos a partir de derivados do petróleo, compostos principalmente por hidrocarbonetos, além de conter aditivos como os corantes e anti-oxidantes responsáveis pelo aumento de sua resistência à degradação, de modo a aumentar sua durabilidade (Siddiqui & Redhwi, 2009).

Os primeiros polímeros utilizados foram materiais naturais, como o amido, algodão, proteínas, madeira e borracha (Sperling, 2006). Em meados do século XIX, polímeros modificados começaram a ser desenvolvidos a partir de macromoléculas naturais, apresentando as mais diversas aplicações comerciais. O primeiro polímero sintetizado foi a resina *Parkesina*, em 1860, considerada o primeiro material plástico, produzido através da modificação do nitrato de celulose. No entanto, a parkesina, assim nomeada em referência ao seu inventor inglês Alexander Parkes, não constituiu um material comercialmente viável por ser altamente inflamável além de apresentar alto custo de fabricação. Nove anos após a descoberta de Parkes, o tipógrafo americano John Wesley Hyatt, através de seus experimentos com a *parkesina*, desenvolveu a *celulóide*, material substituinte do marfim gerado a partir do nitrato de celulose com adição de piroxilina, cânfora, álcool, polpa de papel e serragem. A celulóide foi o primeiro plástico artificial comercialmente viável: uma versão sólida e estável da nitrocelulose, muito utilizado inclusive em próteses dentárias. Em 1898, o polietileno foi descoberto acidentalmente durante o aquecimento do diazometano, mas só passou a ser produzido industrialmente em 1933, com a submissão do etileno a altas condições de pressão e temperatura, e com o aprimoramento das tecnologias de polimerização de compostos (Lopes, 2007).

A primeira metade do século vinte sediou um grande avanço na ciência dos polímeros,

iniciado pela primeira produção industrial em larga escala de uma resina sintética por Leo Baekeland, a *bakelite*, seguida pelo desenvolvimento e início da produção industrial de vários materiais poliméricos modernos, incluindo o poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(cloreto de acetila) (PVA), poli(metacrilato de metila) (PMMA), poliestireno (PS), polietileno de alta e baixa densidade (PEAD e PEBD), poli(cloreto de vinilideno) (PVDC), poliamida (Nylon), poliuretano (PU), poli(tetraflúor-etileno) (Teflon), poli(tereftalato de etileno) (PET), além das técnicas de moldagem dos plásticos, que viabilizaram o uso destes para as mais diversas finalidades (Lopes, 2007).

Essas notáveis descobertas estabeleceram o uso de materiais plásticos como novas diretrizes para a indústria, agricultura e sociedade, principalmente devido ao baixo custo e grande estabilidade e versatilidade destes. Porém, o estudo, a síntese e o manejo desses polímeros só foram possíveis graças às pesquisas do químico alemão Hermann Staudinger, em 1920. Staudinger publicou um artigo, "Über Polymerisation", propondo que os materiais poliméricos seriam longas cadeias moleculares compostas por unidades repetitivas unidas por ligações covalentes. Suas teorias não foram bem aceitas inicialmente porque refutavam o que até então se acreditava: plásticos eram constituídos por anéis de moléculas ligados entre si. O então novo conceito "macromoléculas", utilizado pelo químico em 1922, abrangia os polímeros naturais e sintéticos, colocando-os como chave para uma nova gama de aplicações inovadoras. Com seus estudos no campo das ciências dos polímeros, Staudinger ganhou o prêmio Nobel da Química em 1953. Atualmente, as arquiteturas moleculares de polímeros sintéticos e biopolímeros são adaptadas com alta precisão para atender as demandas da tecnologia moderna (Em: <www.portal.acs.org/portal/acs/corg/content>. Acesso em: 20 de janeiro de 2012).

Na segunda metade do século vinte, as técnicas foram otimizadas e alguns outros polímeros sintéticos puderam ser desenvolvidos. Entre eles estão o polipropileno (PP), policarbonato (PC), copolímero de etileno e acetato de vinila (EVA), além dos plásticos biodegradáveis que foram desenvolvidos em decorrência do aumento do preço do petróleo, a exemplo do poli(hidroxiburirato) (PHB), poli(hidroxialcanoatos) (PHA), poliacetileno (PA), polianilina (PAni), poli(ácido láctico)

(PLA) (Léa Lopes, 2007).

Além da significativa variedade de exemplares de plásticos desenvolvidos, inúmeras aplicações podem ser denotadas a estes, tornando-os plenamente inseridos no cotidiano popular. A Tabela 1 relata aplicações referentes a alguns dos plásticos mais comumente utilizados na atualidade.

Tabela 1. Aplicações dos polímeros sintéticos *

Plástico	Aplicação
Poliétileno	Sacolas plásticas, garrafas de água, embalagens de alimento, brinquedos, canos de irrigação e drenagem, garrafas de óleo para motor
Poliestireno	Copos descartáveis, materiais para laboratório, produtos eletrônicos
Poliuretano	Pneus, vedações, pára-choques, isolamento de geladeiras, esponjas, colchões, coletes salva-vidas
Cloreto de polivinila	Cobertura de assentos de automóveis, cortinas para chuveiros, capas de chuva, solas de sapato, estufas, canos e cabos de eletricidade
Polipropileno	Tampas de garrafas, canudos para bebidas, embalagens de medicamentos, assentos de carro, baterias de carro, seringas descartáveis
Poliétileno tereftalato	Garrafas de refrigerantes, fibra têxtil
Nylon	Limpadores de pára-brisas, capacetes, tintas, tecidos
Policarbonato	Faróis de carros, mamadeiras, utensílios para cozinha, tetos de estufas, aquecimentos solares
Politetrafluoretileno (teflon)	Lentes de óculos, painéis

* **Adaptado de Vona *et al.*, 1965**

1.2 CARACTERIZAÇÃO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

A estrutura, morfologia e propriedades físicas, químicas e mecânicas de polímeros são fundamentais para o entendimento da síntese e da degradação dos plásticos, bem como para o entendimento de suas dificuldades e motivações.

A configuração dos átomos ao longo da cadeia polimérica, distribuição espacial destes e a

massa molecular são aspectos chaves da estrutura de polímeros. A estrutura química dessas macromoléculas pode ser composta por repetições de um único componente químico ligadas covalentemente, formando um arcabouço homogêneo, os homopolímeros, ou por diferentes unidades monoméricas covalentemente unidas, compondo um mosaico molecular, os copolímeros. As unidades monoméricas dos copolímeros podem estar dispostas de forma aleatória, sem que haja uma ordenação predefinida, ou de forma alternada, na qual os componentes se estruturam de modo determinado e recorrente (Müller, 2003; Sperling, 2006). As Figuras 1 e 2 apresentam algumas das estruturas químicas dos mais usuais plásticos petroquímicos e biodegradáveis, respectivamente.

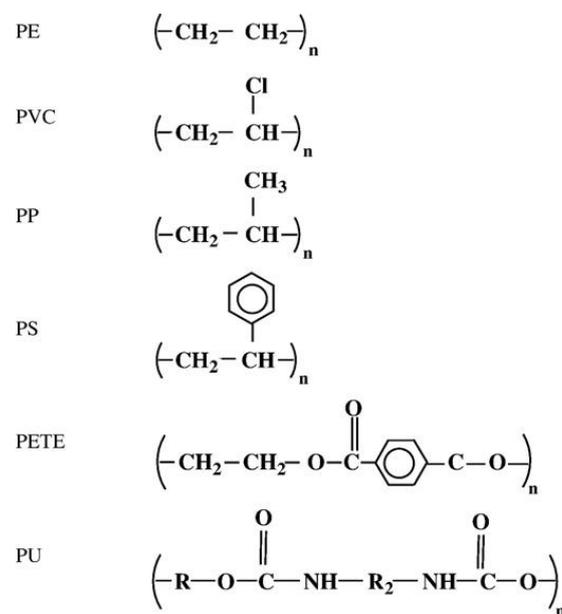


Figura 1. Estruturas de plásticos petroquímicos convencionais (D. L. Pavia *et al.*, 1988). Polietileno (PE), Policloreto de vinila (PVC), Polipropileno (PP), Poliestireno (PS), Polietileno tereftalato (PET), Poliuretano (PU).

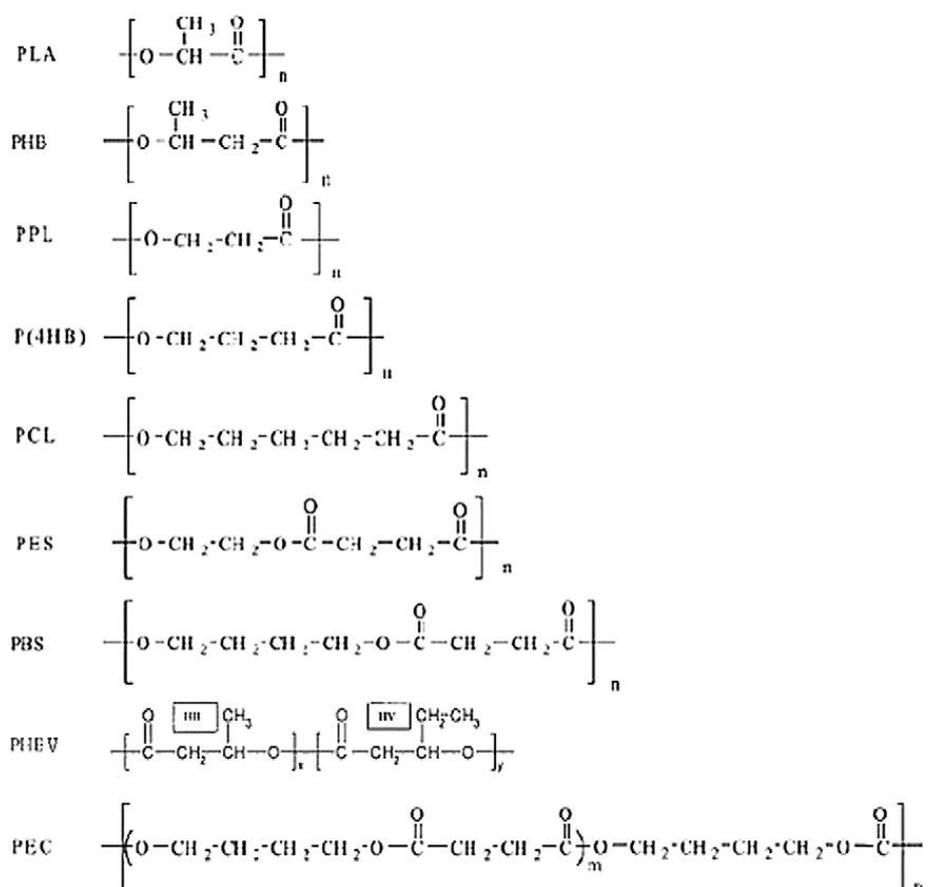


Figura 2. Estrutura química do Poli(ácido láctico) (PLA), Poli(3-hidroxi butirato) (PHB), Poli(propionolactona) (PPL), Poli(ε-caprolactona)(PCL), Poli(etileno succinato) (PES), Poli(butileno succinato) (PBS), Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV) and Poli(éster carbonato) (PEC) (Tokiwa & Calabia, 2004).

Grande parte das propriedades dos polímeros sintéticos está relacionada à alta massa molecular desses materiais. A massa molecular mínima que caracteriza uma molécula polimérica é de 25000 g/mol. Variações de massa molecular dentre os polímeros resultam nos diferentes materiais, com as mais diversas propriedades. Uma propriedade físico-química intimamente relacionada à massa molecular é a viscosidade. Assim, pode-se estabelecer que um material torna-se mais viscoso, conforme eleva-se o a massa molecular de seu polímero constituinte. De modo semelhante, o ponto de fusão (Figura 3) e a força de tensão, isto é, o estresse causado na quebra decorrente da alongação do material, se tornam maior conforme a massa molecular aumenta. Os

alcanos, foco do presente trabalho, possuem a estrutura geral $H-(CH_2)_n-H$, de modo que n pode chegar a milhares de unidades. Os primeiros membros da série dos alcanos ($n < 5$) possuem baixa massa molecular e, conseqüentemente, baixa viscosidade, sendo portanto gases à temperatura ambiente. A Tabela 2 relaciona o número de carbonos da cadeia principal ao estado e às propriedades do material, atribuindo aplicações a cada um deles (Sperling, 2006).

Tabela 2. Propriedades das série de alcanos/polietilenos *

Número de Carbonos na Cadeia	Estado e Propriedades do Material	Aplicações
1-4	Gás simples	Gás de cozinha
5-11	Líquido simples	Gasolina
9-16	Líquido de média viscosidade	Querosene
16-25	Líquido de alta viscosidade	Óleo e Gordura
25-50	Sólido cristalino	Cera de parafina de velas
50-1000	Sólido semi-cristalino	Adesivos de caixas de leite
1000-5000	Plástico sólido rígido	Embalagens de polietileno
$3-6 \times 10^5$	Fibras	Luvas cirúrgicas

* Adaptado de Sperling, 2006

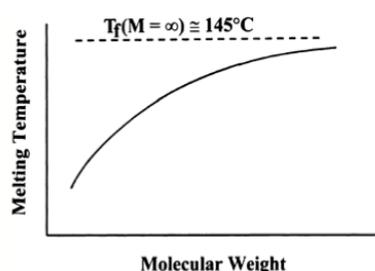


Figura 3. Relação entre massa molecular e ponto de fusão para a série dos alcanos. O valor da assíntota teórica é de aproximadamente $145^{\circ}C$ para pesos moleculares infinitos. (Sperling, 2006).

Além da massa molecular, a estrutura, a compactação e a composição química dessas macromoléculas também dão origem aos diferentes materiais, com as mais diversas propriedades

mecânicas e físico-químicas. A morfologia dos polímeros descreve a organização das moléculas constituintes desse material em vários níveis dimensionais, de espaços interatômicos a medidas macroscópicas (Bassett, 1981). No nível morfológico, a cadeia principal e sua conformação, além da configuração atômica das cadeias laterais, modulam e definem a estruturação final do polímero. Estudos indicam que a morfologia das moléculas poliméricas está intimamente relacionada às propriedades mecânicas do material, dado que elas refletem características macroscópicas conseqüentes da natureza físico-química do polímero. Uma importante característica físico-química, que interfere tanto na morfologia como nas propriedades mecânicas de um material, é o grau de cristalização da entidade em questão (Meinel & Peterlin, 1970; Meinel & Peterlin, 1971a; Meinel & Peterlin, 1971b). Vários polímeros assumem uma conformação cristalizada, e o tamanho, o formato e a organização dessas estruturas altamente ordenadas dependem do processo de cristalização e interferem diretamente na estruturação final da molécula. A fim de exemplificar essa estreita relação entre a natureza físico-química molecular e as propriedades mecânicas cita-se a resistência à quebra do polietileno, alcanando contendo entre 1000 e 3000 átomos de carbono na cadeia principal, quando comparado às ceras ou parafinas, alcanos de aproximadamente 20 a 25 átomos de carbono na cadeia principal. Essa resistência está relacionada ao longo esqueleto carbônico do polietileno, que é capaz de agrupar diferentes segmentos de cadeia através de dobramentos da mesma, formando lamelas. Esse agrupamento gera regiões de alta cristalização que promovem coesões fortes o suficiente para a formação de ligações covalentes tanto dentro de uma lamela como entre lamelas adjacentes. Em contraste, as curtas cadeias das ceras interagem exclusivamente por interações fracas de van der Waals, sendo, portanto, completamente cristalizadas em função da ausência de porções amorfas que proporcionam flexibilidade ao material. Desse modo, é possível concluir que, apesar das diferenças químicas existentes entre os alcanos, o maior contraste entre eles está expresso em seus comportamentos mecânicos (Basset, 1981; Sperling, 2006). A Figura 4 ilustra algumas das diferenças morfológicas mais evidentes entre as ceras e o polietileno, incluindo representações de dobramentos da longa cadeia do polietileno, porções amorfas e a formação das lamelas, regiões

altamente cristalizadas (Sperling, 2006).

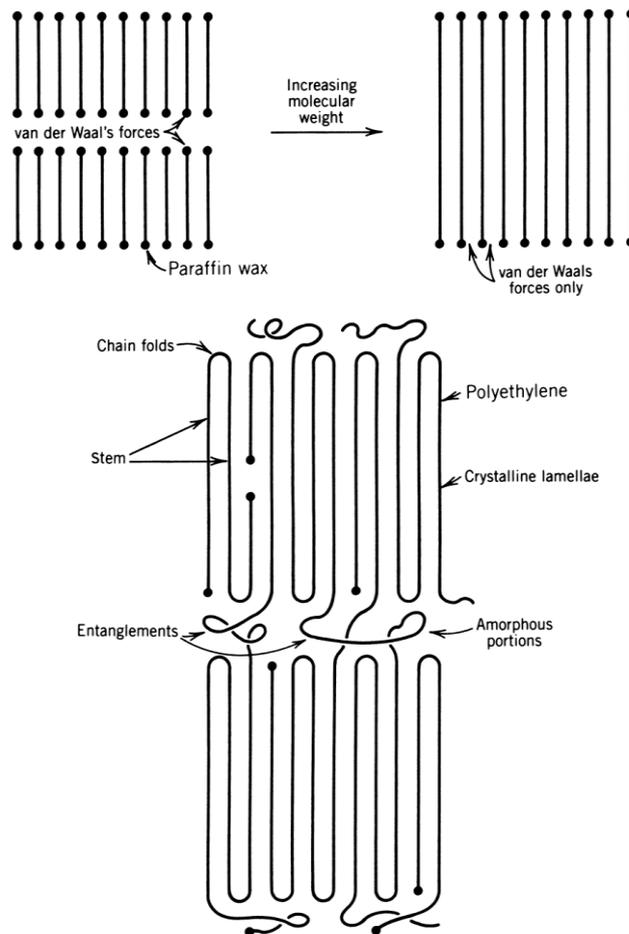


Figura 4. Comparação entre as estruturas e morfologias da cera e do polietileno, incluindo a representação da cristalização e da compactação da molécula, evidenciando os dobramentos de cadeia, lamelas e porções amorfas. (Sperling, 2006).

A cristalização de pequenas moléculas é considerada uma transição de primeira ordem, da fase líquida para a sólida, gerando uma configuração organizada a partir de um estado de desordem inicial. Contudo, os materiais plásticos poliméricos, apesar de serem sólidos e possuírem segmentos cristalizados ao longo de sua estrutura, possuem inúmeras regiões amorfas e frouxas, altamente desordenadas. Desse modo, as transições de fase em polímeros amorfos e semicristalinos são de segunda ordem, mais especificamente transição vítrea-elastomérica, onde o plástico semicristalino sai de um estado desorganizado rígido para um com maior mobilidade. Esse comportamento viscoelástico é importante para a compreensão da elasticidade dos plásticos, outra uma importante

propriedade mecânica desses materiais. No entanto, alguns polímeros são amorfos, justamente pela irregularidade apresentada por suas cadeias, o que desfavorece o arranjo da molécula em cristais. Posteriormente, descrever-se-á a íntima relação dessas características físico-químicas com a biodegradabilidade desses polímeros.

1.3 SÍNTESE E CATEGORIAS DE POLÍMEROS SINTÉTICOS

A polimerização é o processo fundamental para a síntese de um polímero e pode ter como mecanismos as reações de adição e de condensação. O primeiro deles é baseado na quebra da dupla ligação da olefina, denominação dada aos alcenos devido à propriedade do eteno em produzir compostos líquidos oleosos. Essa quebra é gerada pela polimerização da molécula, de modo a formar as novas ligações carbono-carbono que compõem o esqueleto polimérico através da reação de adição. Esse processo é utilizado na formação de poliolefinas, tais como o polietileno e polipropileno. O segundo processo é caracterizado pela reação de condensação, tendo a água como grupo de saída. A reação de condensação ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool ou amina, originando o poliéster, a poliamida ou o poliuretano (Zheng *et al.*, 2005).

Os plásticos podem ser categorizados em termoplásticos, que são produtos da reação de polimerização por adição, ou plásticos termofixos, advindos da reação de condensação (Alauddin *et al.*, 1995). Os termoplásticos podem ser repetidamente aquecidos e resfriados, variando entre estados mais flexíveis e maleáveis, ou estados mais enrijecidos e estruturalmente bem definidos. Isto é possível porque as cadeias moleculares desses materiais interagem por forças de van der Waals ou por ligações de hidrogênio, que se tornam instáveis com a ação do calor. Os termoplásticos são compostos por longas cadeias carbônicas, o que os torna resistentes à degradação e à quebra hidrolítica de suas ligações químicas e, conseqüentemente, são considerados não-biodegradáveis. Dentre os principais e mais corriqueiros termoplásticos estão o polietileno de baixa densidade, polietileno de alta densidade, poli(cloreto de vinila), polipropileno e poliestireno. Estes são largamente utilizados para confecção de embalagens, garrafas e filmes plásticos (Zengh *et al.*,

2005). Plásticos termofixos, como o poliéster e o poliuretano, são sintetizados através da reação de condensação, e são irreversivelmente resfriados após seu derretimento em função da submissão ao calor. Contrariamente à estrutura linear dos termoplásticos, os plásticos termofixos possuem várias ligações cruzadas e sua cadeia principal é formada por heteroátomos (Alauddin *et al.*, 1995), tornando a molécula susceptível à degradação mediante a hidrólise de suas ligações éster ou amida (Müller *et al.*, 2001). Dessa maneira, a viscosidade dos polímeros termofixos não é alterada através do tratamento com o calor, pois, dada a sua estrutura em rede com diversas ligações cruzadas, ocorre a predominância de ligações covalentes, muito mais estáveis, que são cruciais para a caracterização da molécula.

1.4 DESCARTE E MANEJO DOS PLÁSTICOS PÓS-CONSUMO

Aproximadamente 260 milhões de toneladas de polímeros sintéticos são mundialmente utilizadas por ano, de modo que 8% da produção mundial de olefinas é destinada a suprir essa demanda (Thompson *et al.*, 2009). O Brasil é responsável por mais de dois milhões de toneladas desse contingente (fonte: Plastivida). Esses materiais são extremamente estáveis e inertes, visto que não entram com facilidade nos ciclos biogeoquímicos (Shimao, 2001). O apogeu biotecnológico, estabelecido a partir do século XX por esses materiais inovadores, úteis, versáteis e de baixo custo, baseou-se em duas das principais características destes: resistência e durabilidade. Algumas décadas depois, essas promissoras qualidades em termos de aplicabilidade tornaram-se relevantes desvantagens no contexto da sustentabilidade, dado que geram descartes igualmente resistentes e duráveis, que se acumulam nos ambientes naturais. Assim, o combate a essa dualidade caracterizada por consequências de proporções catastróficas se tornou o novo tema promissor e desafiador que emerge como prioridade para o século XXI.

O intenso uso de materiais plásticos nas últimas décadas combinado à grande estabilidade apresentada por esses materiais, gerou o vasto acúmulo destes em escala global e, conseqüentemente, um grave problema relacionado à poluição (Hamid *et al.*, 1992; Spear *et al.*,

1995; Secchi and Zarzur, 1999; Williams & Williams, 1999; Müller, 2003; Floriana *et al.*, 2005; Teuten *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009). Tendo em vista a ampla produção desses plásticos, convém questionar-se em relação ao destino destes quando descartados. Afinal, essas centenas de milhões de toneladas de plásticos acumuladas anualmente findam por gerar uma quantia exorbitante de materiais descartados ao longo das décadas. Desse modo, de acordo com essa progressão, os ecossistemas terão seu futuro dominado pelos plásticos pós-consumo. Atualmente, os materiais plásticos pós-consumo são depositados em aterros, incinerados ou reciclados. Porém, nenhuma destas estratégias é plenamente sustentável, e o tema se torna motivo de controvérsia e discussão, tanto entre a comunidade científica, como entre a sociedade (Müller, 2003).

a) *Deposição em aterros*

A estratégia mais usualmente utilizada para lidar com os plásticos pós-consumo é a deposição em aterros. Esse método é responsável por sérios problemas ecológicos, visto que são necessários de 100 a 500 anos para sua decomposição, sendo estes, por isso, considerados não biodegradáveis. Estes acumulam-se no meio ambiente, expondo o ecossistema a danos irreversíveis. Inúmeros trabalhos relatam o recorrente bloqueio do trato intestinal de animais, como aves, peixes e mamíferos marinhos, em decorrência da ingestão de partículas plásticas (Spear *et al.*, 1995; Secchi and Zarzur, 1999). Outro grande impacto ambiental é causado pelos aditivos, como corantes e antioxidantes, utilizados na confecção dos plásticos, que acarretam na formação de resíduos tóxicos e persistentes (Hamid *et al.*, 1992; Williams & Williams, 1999; Floriana *et al.*, 2005; Teuten *et al.*, 2009). A preocupação com o meio ambiente está aliada à falta de espaço físico disponível para comportar esse grande volume de materiais descartados (Itävaara and Vikman, 1995), tornando emergencial e imprescindível o desenvolvimento de estratégias adicionais a fim de interromper essa aglomeração.

b) *Incineração*

Visando a contrapor o problema causado pela deposição dos plásticos em aterros ou ambientes naturais, é empregada a técnica de incineração de materiais pós-consumo. A vantagem dessa estratégia é a redução do volume do material em cerca de 90-95%, mas, em contrapartida, implica inúmeros prejuízos ao ambiente. Processos de incineração e combustão liberam substâncias tóxicas e prejudiciais, incluindo os carcinogênicos compostos aromáticos (benzeno, tolueno, xileno e estireno) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), compostos de cloro, metais pesados, monóxido e dióxido de carbono, radicais livres, aldeídos, ácidos, cetonas, lactonas, hidrocarbonetos saturados, éteres cíclicos, ésteres cíclicos, alcenos e dienos (Hoff & Jacobsson, 1981; Hawley-Fedder *et al.*, 1984; Kaminsky *et al.*, 1996; Aracil *et al.*, 2004; Siddiqui & Redhwi, 2009).

A pirólise, degradação térmica de macromoléculas em altas temperaturas e ausência de oxigênio, é uma alternativa à incineração capaz de reduzir o volume de gases a um fator de 5-20. Além disso, este é capaz de recuperar diversos hidrocarbonetos que podem, inclusive, servir como matéria-prima para combustíveis, como gasolina, querosene e diesel, em refinarias (Siddiqui, 2009), visto que os métodos de incineração e pirólise são capazes de reaver parte da energia contida no material. Apesar de ser uma alternativa menos prejudicial, que apresenta reduções no nível de poluentes emitidos, a pirólise ainda é responsável pela liberação de vários resíduos recalcitrantes, não podendo ser considerada uma opção limpa ou segura em termos ecológicos.

c) *Reciclagem*

A reciclagem de plásticos é um método de gestão dos resíduos pós-consumo caracterizado pela redução do impacto ambiental e da depleção de recursos naturais. A maior parte dos plásticos pós-consumo é destinada a aterros ou incinerada, e apenas 7% é reciclada. Este processo é dotado de grande complexidade, e inclui quatro categorias de reciclagem: primária, secundária, terciária e quaternária. A reciclagem primária, ou loop-fechado, consiste em um processamento mecânico tendo como produto um material com propriedades equivalentes, enquanto a secundária, ou

reciclagem de desclassificação, gera materiais cujas propriedades diferem entre si, mas ainda é caracterizada como reciclagem mecânica. A reciclagem terciária, recuperação da matéria-prima ou reciclagem química, prima pela recuperação dos constituintes químicos, ou seja, da matéria-prima, através da despolimerização do plástico original, e a quaternária, ou recuperação de energia, visa à recuperação da energia contida nos compostos das etapas iniciais. A Figura 5 ilustra o ciclo de reciclagem existente desde a produção dos plásticos a partir da matéria-prima, até a reutilização e conversão desses materiais em outros de etapas precedentes (Williams & Williams, 1999; Fisher, 2003; Song *et al.*, 2009; Hopewell *et al.*, 2009). Os plásticos são agrupados de acordo com suas características físico-químicas, que influenciam diretamente sua reciclagem, com a finalidade de separar os diferentes tipos de plásticos para facilitar o processo de reciclagem dos materiais pós-consumo.

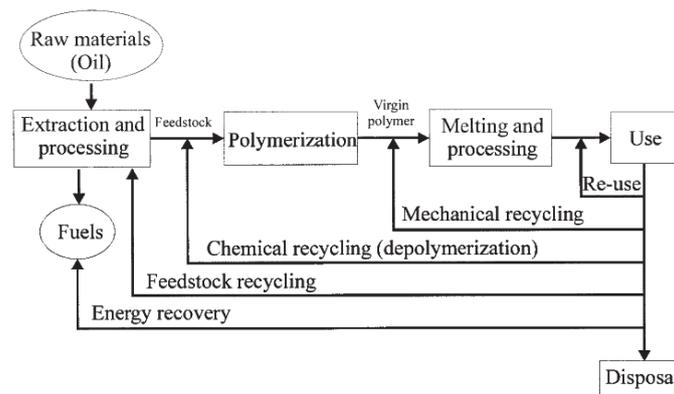


Figura 5. Ciclo de produção de plásticos (Clift, 1996; Floriana *et al.*, 2005).

Em teoria todos os processos de reciclagem são factíveis, porém, existem inúmeras variáveis que interferem e dificultam a realização destes. A maioria dos termoplásticos é composta por uma grande variedade de polímeros e outros materiais, como metais, papel, pigmentos, antioxidantes, tintas e adesivos, o que complica o processo de reciclagem primária, processo mais utilizado nessa classe de materiais, principalmente em embalagens plásticas. Para que a reciclagem mecânica seja possível, é necessário separar o polímero constituinte do material de artefatos não-plásticos e fontes

de contaminação e estabilizá-lo contra degradação durante o reprocessamento. Fontes de contaminação incluem eventuais resíduos de produtos químicos ou farmacêuticos armazenados em embalagens plásticas, assim como resíduos advindos do contato com o lixo doméstico, industrial ou hospitalar. Devido à dificuldade em retirar plenamente os contaminantes dos produtos que serão reprocessados, a reciclagem mecânica não é autorizada para a produção de brinquedos ou embalagens alimentícias, sob o risco de conter resíduos inadequados, ficando limitada apenas a sacos plásticos, componentes automotivos e artigos não-relacionados à saúde ou à alimentação.

A reciclagem química favorece a recuperação dos constituintes petroquímicos do polímero e elimina grande parte dos contratempos enfrentados pela reciclagem mecânica. No entanto, a reciclagem química consiste em um processo de alto custo em relação ao baixo custo da matéria-prima, não sendo economicamente viável, além de ser energeticamente custoso e redundante, já que é necessário despolimerizar a molécula para que ela possa ser polimerizada novamente (Hopewell *et al.*, 2009). As grandes desvantagens da reciclagem energética são os elevados custos das instalações, além da necessidade de mão-de-obra altamente qualificada para a manutenção dos equipamentos. A reciclagem energética é associada à incineração dos materiais, desse modo, sem a tecnologia adequada, resulta nas emissões prejudiciais responsáveis pela grande polêmica acerca do tema.

1.5 BIODEGRADAÇÃO DOS POLÍMEROS SINTÉTICOS

O agravamento dos problemas relacionados ao uso desregrado de materiais plásticos, em comunhão à necessidade do aperfeiçoamento e do desenvolvimento de métodos que amenizem essa questão, culminou na intensificação de estudos baseados na criação de técnicas alternativas para manejo dos pós-consumo. As pesquisas acerca do tema visam a cessar a produção de materiais não-degradáveis e, simultaneamente, solucionar os percalços vivenciados em decorrência dos plásticos inertes já existentes. Isto porque os processos de deposição em aterro, incineração e reciclagem apresentam grandes dificuldades e inúmeras conseqüências indesejáveis a serem contornadas. Nesse

contexto, duas opções sustentáveis emergem como foco promissor e extremamente eficaz para mitigar a produção de materiais não-degradáveis e deteriorar as bilhões de toneladas já existentes. A primeira delas é a síntese de polímeros biodegradáveis em substituição aos plásticos até então comercializados, e, a segunda, âmagos do presente trabalho, é promover a biodegradação dos plásticos persistentes que já foram produzidos e acumulados.

A inércia e a alta resistência desses produtos se justificam pela elevada massa molecular, alto grau de compactação da molécula e por sua natureza altamente hidrofóbica, fatores que interferem na disponibilidade da molécula ao ataque microbiano (Hadad *et al.*, 2004). Quanto menores e mais repetitivos forem os monômeros, mais intensa é a cristalização da molécula, portanto menos biodegradável ela se torna. A baixa flexibilidade do polímero, que impossibilita seu ajuste no sítio catalítico das enzimas microbianas excretadas, em comunhão à sua incapacidade em cruzar a membrana celular, típica de moléculas de alta massa molecular, tornam inviável sua catálise. Assim, moléculas com as características acima citadas têm sua degradação comprometida e, até mesmo, impedida (Chandra & Rustgi, 1998).

a) *Polímeros biodegradáveis*

Alguns plásticos, como o poliéster e poliuretano, são originalmente biodegradáveis devido ao esqueleto carbônico fortemente hidrolisável de suas moléculas. Sabendo-se que a presença desses grupos hidrolisáveis fundamenta a degradação por meio do ataque microbiano, pela atuação de enzimas hidrolíticas, uma vasta gama de novos polímeros biodegradáveis vem sendo sintetizada. A finalidade desta síntese é viabilizar a redução da produção de plásticos não biodegradáveis, de modo que o destino final dos pós-consumo consista na entrada direta nos ciclos biológicos.

Esses novos polímeros incluem exemplares desenhados a fim de apresentar susceptibilidade a microorganismos, ou moléculas já existentes que contenham modificações que propiciem o acesso enzimático, incluindo a maior flexibilidade da molécula para adequar-se ao sítio ativo, ou apresentem degradabilidade fótica ou térmica (Augusta *et al.*, 1992; Kawai, 1995; Witt *et al.*, 1997).

Essa classe de moléculas biodegradáveis, representada pelos poliésteres - como os polihidroxialcanoatos (PHA) - polilactídeos, policaprolactonas, poliésteres alifáticos, polissacarídeos e copolímeros deste - como o polietileno associado ao amido (Griffin, 1974) - tem sido progressivamente desenvolvida nos últimos anos. Porém, é importante ressaltar a importância de uma análise adequada dos produtos gerados pela degradação do polímero desenhado, a fim de evitar a produção de moléculas tóxicas (Karlsson *et al.*, 1988; Karlsson & Albertsson, 1990). Esses poliésteres naturais são produzidos por inúmeros microorganismos como materiais de reserva intracelular, na forma de inclusões insolúveis em água. Esses compõem os bioplásticos, ou biopolímeros, materiais nos quais a indústria plástica revela extremo interesse, pois também podem ser sintetizados por plantas ou microorganismos submetidos a modificações provenientes de técnicas de engenharia genética para esta finalidade, a exemplo das importantes moléculas poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) e poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHV) (Steinbüchel, 1992; Lee, 1996; Sudesh *et al.*, 2000; Ojumu *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2008). Foi observado que, ao prover o fornecimento de diferentes fontes de carbono aos microorganismos produtores de PHB, ocorria a produção de diversos copolímeros, os quais, inclusive, possuíam propriedades mecânicas mais adequadas que o PHB. Esses poliésteres são hidrolizáveis em água a uma taxa lenta, e relatos indicam que a degradação hidrolítica dos poliésteres microbianos ocorre através de uma erosão homogênea em duas etapas, uma quebra hidrolítica randômica na cadeia polimérica seguida pela diminuição progressiva na massa molecular à medida que as quebras ocorrem (Doi *et al.*, 1989). Outra estratégia utilizada é a mistura desses poliésteres microbianos ao polietileno ou poliestireno, resultando em um material com propriedades físicas aperfeiçoadas e biodegradabilidade preservada (Chandra & Rustgi, 1998).

b) *Biodegradação*

Apesar de ser uma estratégia extremamente próspera e eficaz para a substituição dos plásticos persistentes, o desenho de novos polímeros biodegradáveis não soluciona o grave

problema imposto pelo então acúmulo dos plásticos pós-consumo. Desse modo, medidas devem ser adotadas a fim de deteriorar as bilhões de toneladas acumuladas em ambientes naturais e aterros, ou biorremediar as toneladas submetidas a processos que geram compostos tóxicos e recalcitrantes. Os polímeros podem ser degradados por quaisquer alterações físicas ou químicas consequentes de condições térmicas, oxidativas, químicas, radiativas e mecânicas, bem como por agentes biológicos (Albertsson et al, 1987). Esses processos alteram o estado energético das moléculas, induzindo mudanças nas propriedades físico-químicas poliméricas e gerando quebra das ligações com subseqüentes transformações químicas, além da formação de novos grupos funcionais. Formação de fissuras e quebras, erosão, modificações na coloração, separação de fases e delaminação fornecem fortes evidências macroscópicas da ocorrência de alterações nas propriedades do material (Pospisil and Nespurek, 1997; Shah *et al.*, 2007). Assim, é fundamental a realização de estudos acerca da busca por microorganismos e metodologias capazes de degradar esses materiais aparentemente inertes. Com isso, a biodegradação e os mecanismos que visam propiciá-la e otimizá-la ganham particular destaque por serem processos livres da emissão de poluentes e resíduos tóxicos ou recalcitrantes, devido à utilização do próprio metabolismo microbiano como sede do processo degradativo de materiais.

Em 1972, Dommergues e Mangenot definiram a biodegradação como a decomposição de compostos por meio da ação microbiana, resultando na ciclagem do carbono, acarretando a oxidação completa dos compostos orgânicos, gerando nova biomassa (mineralização), como CO₂, H₂O e sais (Dommergues & Mangenot, 1972). Atualmente, sabe-se que a biodegradação consiste em um processo altamente complexo composto de diversas etapas, sendo capcioso conceituá-lo de maneira tão resumida (Pelmont, 1995; Lucas *et al.*, 2008). O termo biodegradação indica a predominância da atividade biológica no fenômeno. A primeira etapa do processo é a biodeterioração, que consiste na fragmentação do material em decorrência dos fatores abióticos e da atuação microbiana e de outros decompositores (Eggins & Oxley, 2001). Essa fragmentação possibilita o acesso de enzimas hidrolíticas e radicais livres secretados pela comunidade microbiana

(biofragmentação) a diversas porções do material, promovendo, dessa maneira, sua despolimerização, gerando oligômeros, dímeros e monômeros. Alguns dímeros ou monômeros podem ser reconhecidos por receptores de membrana celular dos microorganismos e conseqüentemente assimilados, ou seja, transportados para o interior celular onde estarão submetidos às diferentes rotas metabólicas, resultando na produção de energia, nova biomassa, vesículas de armazenamento e inúmeros metabólitos primários e secundários. Esse mecanismo de oxidação das moléculas assimiladas consiste no processo de mineralização, gerando como produtos o CO₂, o N₂, o CH₄, a H₂O e os diferentes sais.

Desse modo, a biodegradação é descrita como a união dos processos de biodeterioração, biofragmentação e assimilação, incluindo a influência dos fatores abióticos que favorecem a ocorrência do processo (Lucas *et al.*, 2008). A Figura 6 representa um esquema das etapas da biodegradação polimérica.

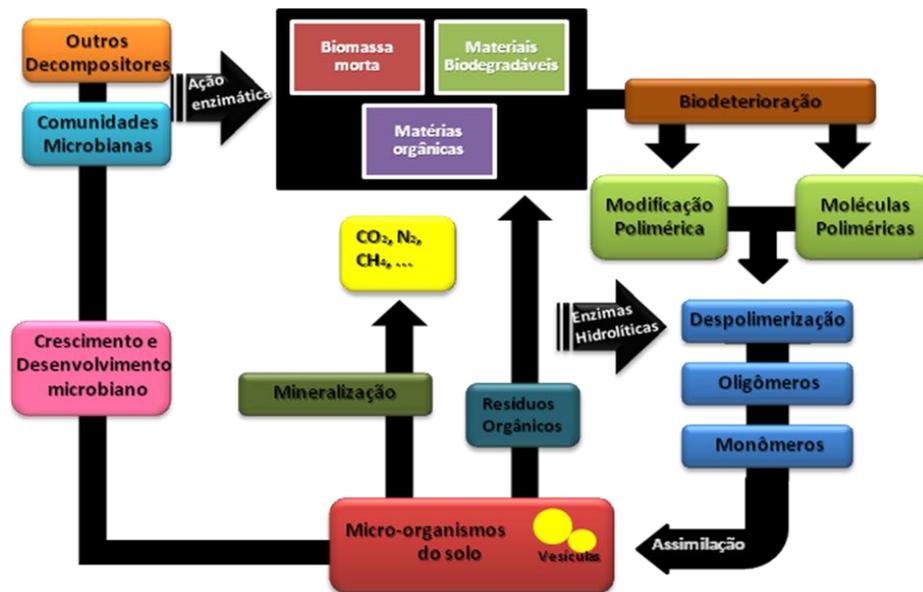


Figura 6. Esquema da biodegradação de polímeros em ambientes naturais (Adaptado de Lucas *et al.*, 2008).

1.6 CARACTERIZAÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DO POLIETILENO

O polietileno (PE) é um alcano de elevada massa molecular produzido por meio da polimerização de n monômeros de etileno, contendo cerca de 1000 a 3000 átomos de carbono. Sua fórmula química é representada de acordo com a Figura 7. Atualmente, ele é o plástico de maior produção e consumo mundial, seguido pelo polipropileno (PP), poli(cloreto de vinila) (PVC), polietileno tereftalato (PET) e poliestireno (PS). Suas aplicações são as mais diversas, incluindo embalagens de alimentos e de produtos de limpeza, sacolas plásticas, filmes plásticos, caixas d'água, equipamentos agroindustriais, tampas com lacre, baldes, peças com aplicações cirúrgicas e plástico-bolha.

Estudos apontam o polietileno (PE) como um polímero extremamente inerte e resistente ao ataque microbiano. Este consiste em um hidrocarboneto de cadeia longa, altamente hidrofóbica, com elevada massa molecular, alto grau de compactação e cristalização, dotado de inúmeras repetições monoméricas. Moléculas portando esse conjunto de características estruturais não são encontradas facilmente na natureza. Desse modo, podemos justificar sua alta resistência à biodegradação pela ineficiência e falta de especificidade das enzimas encontradas na natureza para esse polímero sintético tão recentemente introduzido no meio ambiente (Tsuchii *et al.*, 1980; Albertsson *et al.*, 1987; Albertsson and Karlsson, 1993).

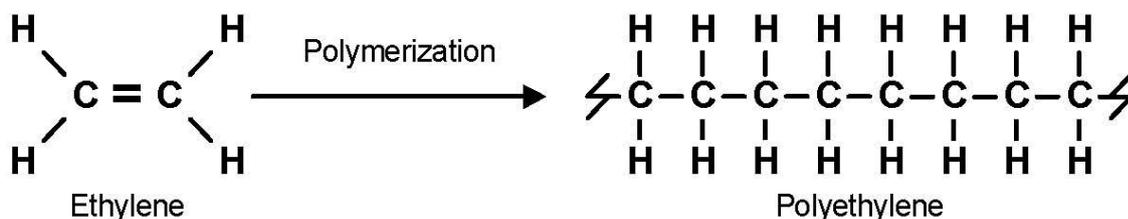


Figura 7. Representação química do etileno e do polietileno, resultante da reação de polimerização.

O número de monômeros e o conseqüente massa molecular do polietileno podem variar entre os mais diversos materiais.

(Em: <http://www.coleparmer.com/assets/techinfo/images/Zeus_Chem_Resistance_img_2.jpg>.

Acesso em: 15 de outubro de 2013)

Diversos parâmetros influenciam na ocorrência e na eficiência do processo de biodegradação, dentre os quais estão a fisiologia do micro-organismo, as características moleculares do polímero e o pré-tratamento ao qual o material foi submetido (Shah *et al.*, 2008). Para que termoplásticos como o polietileno e outros polímeros inertes possam ser degradados, são necessários pré-tratamentos que promovam uma deterioração parcial do polímero gerando grupos hidrolisáveis e moléculas com menor massa molecular, o que facilita e propicia o ataque microbiano.

A taxa de ocorrência dos processos oxidativos, que reduzem a massa molecular do polietileno a um valor suficiente para permitir a biodegradação, rege a taxa pela qual essa molécula é metabolizada na biodegradação. A introdução de grupos químicos reativos ou hidrolisáveis, como os hidroperóxidos e carbonilas, grupos cromofóricos, grupos polares e a adição de compostos que promovam rearranjos estruturais são fatores que podem contribuir para a diminuição da massa molecular, da compactação da molécula e da hidrofobicidade, ou para o aumento da flexibilidade molecular. Essas modificações moleculares e estruturais são imprescindíveis para a degradação do polietileno, visto que, na ausência destas, o acesso enzimático e a adequação da molécula ao sítio ativo de enzimas hidrolíticas tornam-se dificultados ou impedidos (Albertsson & Karlsson, 1990; Albertsson & Karlsson, 1993).

Um pré-tratamento comumente utilizado é a modificação da superfície do material objetivando viabilizar a ocorrência de processos biodegradativos, justamente por proporcionar ao polímero as alterações estruturais acima citadas. Essas modificações podem alterar as propriedades físicas e químicas do polímero, o que faz com que essa abordagem seja utilizada não apenas para intensificar a biodegradação, como também para aumentar a aderência do material, ou sua resistência ao calor e ao estresse (Foerch *et al.*, 1990). Em geral, grande parte dos estudos acerca dessas técnicas que acarretam a alteração superficial polimérica tem como finalidade aprimorar as aplicações do polietileno, a fim de aumentar ainda mais sua comercialização. No entanto, essa

estratégia pode ser aplicada no sentido de favorecer o ataque microbiano ao polietileno, por tornar a molécula mais polar, diminuir sua massa molecular e, igualmente, atuar na amenização dos outros fatores problematizadores do processo degradativo. Dessa maneira, ao invés de incentivar ainda mais o uso do polietileno, é possível desenhar estratégias que contornem os prejuízos gerados em função da sua produção excessiva.

Uma grande variedade de fatores ambientais também influencia a degradação do polímero, como a presença e o teor de oxigênio, a temperatura, a radiação solar, o conteúdo hídrico, o estresse, os organismos vivos e os poluentes. Além disso, variações na natureza do polímero, que reflete a macro-estrutura do material (e. g. filmes, pellets ou pós), assim como variações em sua porosidade, textura superficial e presença de fases secundárias, acarretam diferentes taxas de degradação (Albertsson & Karlsson, 1990).

Sabe-se que apenas as moléculas com massa molecular de até 500g/mol podem ser assimiladas e metabolizadas por diversos microorganismos. No entanto, do ponto de vista químico, é razoável antecipar que microorganismos sejam capazes de degradar o polietileno, já que este possui estrutura química bastante similar à estrutura linear dos alcanos, notadamente biodegradáveis, como descrito para uma grande variedade de bactérias e fungos (Albertsson *et al.*, 1987; Usha *et al.*, 2011). A partir de estudos acerca do metabolismo de parafinas, alcano cuja cadeia carbônica compreende apenas cerca de 10 a 20 carbonos, foi proposto que estas são degradadas pela β -oxidação microbiana após sua oxidação inicial a ácido carboxílico. Assim, para parafinas contendo n moléculas de carbono, são formadas n moléculas de dióxido de carbono (Albertsson *et al.*, 1987). A Figura 8 ilustra o mecanismo pelo qual ocorre a degradação de alcanos contendo n moléculas de carbono (Arutchelvi *et al.*, 2008). Com base nesse mecanismo, é possível prever que reação semelhante ocorrerá com o polietileno, mesmo que, para isso, sejam necessárias algumas prévias modificações estruturais e conformacionais ou adições de moléculas surfactantes ou ativadoras.

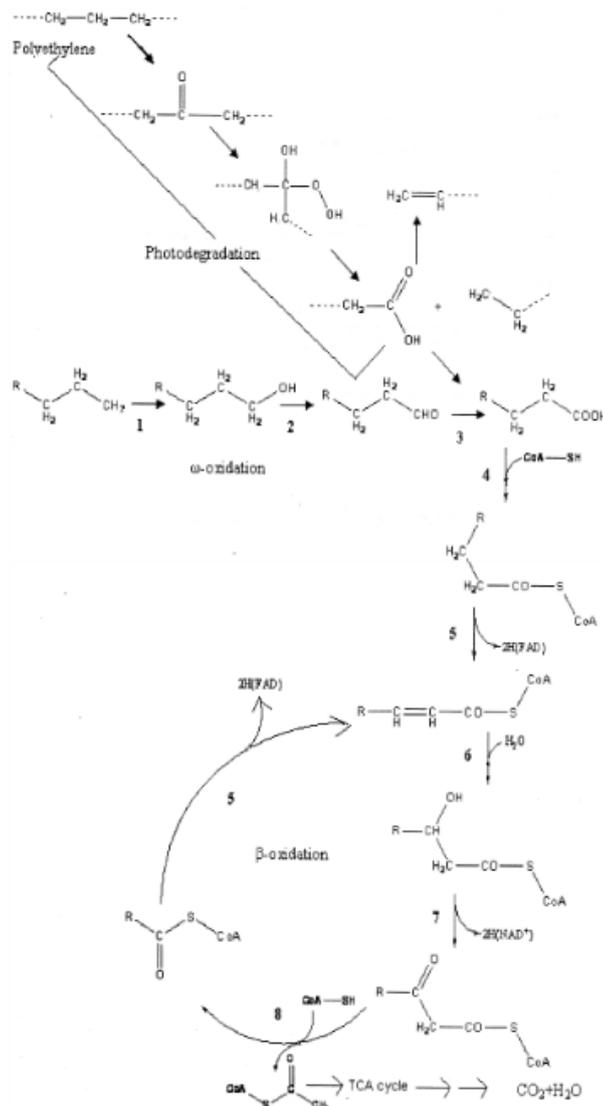


Figura 8. Mecanismo proposto para degradação de polietileno (Arutchelvi *et al.*, 2008)

Apesar de não existirem na natureza enzimas especializadas na degradação de materiais portando esse conjunto de características físico-químicas e estruturais; alta massa molecular, longas cadeias carbônicas monoméricas, elevadas cristalização e compactação, além da alta hidrofobicidade; diversos microorganismos e enzimas já foram descritos como responsáveis pela biodegradação de plásticos (Gu, 2000; Artham & Doble, 2008; Arutchelvi *et al.*, 2008; Shaah *et al.*, 2008). Dentre os microorganismos descritos como degradadores de polietileno estão *Brevibacillus borstelensis* (Hadad *et al.*, 2005), *Rhodococcus ruber* (Gilan *et al.*, 2004), *Rhodococcus rhodochrous* (Bonhomme *et al.*, 2003), *Actinomycetes sp.*, *Phanerochaete chrysosporium* (Orhan & Buyukgungor, 2000), *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces badius*, *Streptomyces setonii*

(Pometto *et al.*, 1992), *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus halodenitrificans* (Roy *et al.*, 2008), *Bacillus sphaericus* (Sudhakar *et al.*, 2008), *Bacillus brevis*, *Shewanella putrefaciens*, *Ralstonia basilensis*, *Delftia acidovorans* (Yoon *et al.*, 2012), *Penicillium simplicissimum* (Yamada-Onodera, 2001), *Penicillium funiculosum* (Nowak *et al.*, 2001), *Aspergillus glaucus* (Shimao *et al.*, 2001; Usha *et al.*, 2011), além de diferentes candidatos dos gêneros *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Saccharomonospora*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Moxarella*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Streptomyces* (Orhan & Büyükgüngör, 2000; Shimao, 2001; Nowak, 2006; Sivan *et al.*, 2006; Sudhakar *et al.*, 2008; Chatterjee *et al.*, 2010; Nowak *et al.*, 2011).

A biodegradação por esses microorganismos envolve a prévia adesão destes ao substrato, além da secreção de enzimas que promovam modificações estruturais na molécula de polietileno, a fim de torná-la passível de assimilação. Estudos apontam que durante a depleção de fontes de carbono, microorganismos ativam estratégias que visam a aumentar a hidrofobicidade superficial de suas células, favorecendo a adesão ao polietileno (Sakharovski *et al.*, 1999; Sanin *et al.*, 2003). Algumas enzimas foram identificadas por atuar nesse processo de modificação estrutural do polietileno, isoladas de microorganismos que se mostraram biodegradadores, como peroxidases (Liyoshi *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2003), lacases, enzimas degradadoras de lignina (Sivan, 2011), alcanos hidroxilases, responsáveis pela degradação de óleo mineral (Belhaj *et al.*, 2002; Saadon *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2012), além de outras classes de despolimerases, que emergem como ponto central na busca por enzimas degradadoras desses polímeros (Shaah *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

As atuais estratégias para gestão de plásticos pós-consumo, como a incineração e a deposição em aterros, promovem danos catastróficos aos ecossistemas, a exemplo da liberação de compostos tóxicos nos solos ou na atmosfera, visto que muitos destes são gases estufa ou substâncias carcinogênicas. Esses contaminantes são emitidos como consequência da incineração ou advindos de aditivos, e.g. corantes e antioxidantes, adicionados aos plásticos (Hamid *et al.*, 1992;

Williams & Williams, 1999; Floriana *et al.*, 2005; Teuten *et al.*, 2009). Alguns desses compostos tóxicos emitidos e liberados são benzeno, tolueno, xileno, estireno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos de cloro, metais pesados, monóxido e dióxido de carbono, radicais livres, aldeídos, ácidos, cetonas, lactonas, hidrocarbonetos saturados, éteres cíclicos, ésteres cíclicos, alcenos e dienos (Hoff & Jacobsson, 1981; Hawley-Fedder *et al.*, 1984; Kaminsky *et al.*, 1996; Aracil *et al.*, 2004; Siddiqui & Redhwi, 2009).

Outro sério prejuízo causado pelo descarte inadequado desses materiais é o bloqueio do trato gastro-intestinal e estrangulamento de peixes, aves e mamíferos (Spear *et al.*, 1995; Secchi and Zarzur, 1999). De acordo com a Administração Nacional Oceanográfica e Atmosférica Americana, debris plásticos matam cerca de 100000 mamíferos marinhos e milhões de aves e de peixes, apenas nos EUA. A GESAMP (United Nations Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution) estima que mais de 80% da poluição mundial marinha é advinda de fontes terrestres, e até 95% desses poluentes são debris plásticos.

A sociedade forçosamente vem conscientizando-se e solidarizando-se em prol de fornecer possibilidades e alternativas ao problema. Estudos apontam que efeitos da poluição serão agravados expressivamente e vivenciados a curto prazo, em torno de 20 anos, iniciando-se um estado de calamidade global (Greenpeace; Coastal Care; CBC news). Diante disso, é urgente e imprescindível uma intervenção, dado que os efeitos tornam-se irrefutáveis e quase irremediáveis. Em decorrência dessa emergência, estratégias que visem a contornar a situação serão devidamente valorizadas e recompensadas, inclusive sob o ponto de vista financeiro.

Outra motivação em prol de reverter esse impasse é a exploração do potencial biotecnológico associado à degradação biótica de plásticos. Com base no emprego do metabolismo microbiano, os mais diversos produtos metabólicos gerados podem ser utilizados para diversas finalidades, e.g. produção de biocombustíveis e outras moléculas orgânicas com aplicabilidade industrial e comercial. Nesse contexto, o presente trabalho propõe, não apenas uma estratégia de manejo desses pós-consumo, como também, simultaneamente, a exploração desse potencial

biotecnológico. Em virtude dos notórios malefícios causados pela incineração ou pela deposição em aterros, acarretando sua conseqüente proibição em muitos países, além dos elevados custos associados à reciclagem, a biodegradação emerge como uma alternativa sustentável, economicamente viável e lucrativa. Isso é devido ao baixo custo de manutenção de bioreatores em comparação aos equipamentos dispendiosos de alta eficiência relacionados à reciclagem, além do retorno financeiro intrínseco à produção de compostos de interesse industrial e comercial. Essa tecnologia alternativa se mostra não apenas executável, como também altamente eficaz e atrativa, de modo que se compromete em arcar com os prejuízos causados pela própria humanidade sem desconsiderar o retorno econômico e/ou financeiro (Albertsson & Karlsson, 1990; Foerch *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991; Albertsson & Karlsson, 1993; Yamada-Onodera *et al.*, 2001; Bandopadhyay *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003, Hadad *et al.*, 2004; Gilan *et al.*, 2004; Shah *et al.*, 2008; Sivan, 2011; Nowak *et al.*, 2011; Usha *et al.*, 2011).



Krichim, Boat in plastic, April 25, 2009. Photo: Dimitar Dilkoff



Midway atoll, bird corpse. Photo: Chris Jordan



Entangled seal by derelict net, Hawaii. Photo Source: NOAA

Figura 9. Imagens de ecossistemas impactados pela poluição decorrente de descartes plásticos. Em: <http://coastalcare.org/2009/11/plastic-pollution/>. Acesso em 20 de novembro de 2012)

3. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo isolar microorganismos presentes em debrís plásticos descartados em solos do cerrado e avaliar a potencial capacidade microbiana em degradar, modificar ou metabolizar o polietileno, visando a aplicações no campo da biotecnologia e da biorremediação.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i.** Construção de uma biblioteca microbiana contendo microorganismos isolados a partir de materiais constituídos de polietileno descartados em ambientes naturais;
- ii.** Seleção de microorganismos capazes de degradar compostos assimiláveis de mesma natureza do polietileno, e.g. óleo mineral;
- iii.** Identificação dos microorganismos capazes de manter-se metabolicamente ativos tendo o polietileno como fonte de carbono e energia;
- iv.** Análise da viabilidade e adesão celulares após cultivo em meio mínimo contendo polietileno como única fonte de carbono e energia;
- v.** Estimativa comparativa da viabilidade e do metabolismo celulares de células cultivadas com polietileno como única fonte de carbono e energia, em contraste a controles negativos sem a presença do polímero;
- vi.** Desenvolvimento de uma metodologia inovadora e eficaz para prospecção de microorganismos degradadores de polímeros sintéticos.

5. METODOLOGIA

5.1 COLETA DE MATERIAIS E CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA MICROBIANA

Com a finalidade de subsidiar a busca por microorganismos potencialmente degradadores de polietileno, foram coletados diversos plásticos pós-consumo constituídos a partir do polietileno descartados na Chapada dos Veadeiros que apresentassem indícios macroscópicos de degradação, e.g. formação de furos e quebras, além da alteração na textura e coloração (Bottomley, 1993). O critério para escolha dos materiais a serem descartados foi a tentativa de buscar biodegradadores de polietileno em um material que já estivesse previamente submetido a esse processo, em um ambiente de alta riqueza e diversidade microbianas como os solos de Cerrado. O potencial microbiano associado aos debrís plásticos foi acessado após sua ressuspensão em solução de NaCl 0,9% e posterior cultivo em 5 diferentes meios de cultura sólidos: Nutrient Broth, R2A, Czapek Dox, Middelbrook e Marine Broth (Difco), conforme as formulações descritas nas Tabelas 4, 5, 6, 7 e 8. A suspensão de microorganismos também foi plaqueada em meio mínimo sólido (Pridham & Gottlieb, 1948), conforme descrito na Tabela 3, contendo parafina 1%. As colônias isoladas foram cultivadas em seus respectivos meios líquidos e incubadas sob agitação *overnight* (o.n.) a 150 RPM e 28°C. Essas culturas líquidas foram centrifugadas a 7000×g por 5 minutos, com o posterior descarte do sobrenadante, permitindo que as células fossem ressuspensas em glicerol 15% estéril para subsequente estoque a -80°C.

Tabela 3. Protocolo de preparo dos meios de cultura mínimos sem fontes de carbono

Reagente	Concentração (g/L)
Sulfato de Amônia	2,6400
Fosfato de Potássio monobásico	2,3800
Fosfato de Potássio dibásico	5,6500
Sulfato de Magnésio heptahidratado	1,0000
Sulfato de Cobre pentahidratado	0,0064
Sulfato de Ferro heptahidratado	0,0011
Cloreto de Manganês tetra hidratado	0,0079
Sulfato de Zinco heptahidratado	0,0015

Tabela 4. Meio Nutrient Broth (Difco)

Reagente	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0

Tabela 5. Meio R2A (Difco)

Reagentes	Concentração (g/L)
Peptona proteose	0,50
Casamino ácidos	0,50
Extrato de levedura	0,50
Dextrose	0,50
Amido solúvel	0,50
Fosfato de potássio dibásico	0,30
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,05
Piruvato de sódio	0,30

Tabela 6. Meio Czapek-dox (Difco)

Reagentes	Concentração (g/L)
Sacarose	30,00
Nitrato de amônia	3,00
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,50
Fosfato de potássio dibásico	1,00
Cloreto de potássio	0,50
Sulfato de ferro heptahidratado	0,01

Tabela 7. Meio Middelbrook (Difco)

Reagente	Concentração (g/L)
Sulfato de amônia	0,500
Fosfato de potássio monobásico	1,500
Fosfato de sódio dibásico	1,500
Citrato de sódio	0,400
Sulfato de magnésio	0,025
Cloreto de cálcio	0,500

Sulfato de zinco	1,000
Sulfato de cobre	1,000
Ácido L-glutâmico	0,500
Citrato de amônia férrico	0,040
Piridoxina	1,000
Biotina	0,500
Malachita green	0,250

Tabela 8. Meio Marine Broth (Difco)

Reagente	Concentração (g/L)
Peptona	5,00
Extrato de levedura	1,00
Citrato de ferro III	0,10
Cloreto de sódio	19,45
Cloreto de magnésio	5,90
Sulfato de sódio	3,24
Cloreto de cálcio	1,80
Cloreto de potássio	0,55
Carbonato de sódio	0,16
Brometo de potássio	0,08
Cloreto de estrôncio	34,00
Ácido bórico	22,00
Silicato de sódio	4,00
Fluoreto de sódio	2,40
Nitrato de amônia	1,60
Fosfato de sódio dibásico	8,00

5.2 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE ÓLEO MINERAL

Os isolados foram plaqueados em placas de petri quadradas de dimensões 245 mm × 245 mm × 25 mm com *grids* de 1 cm × 1 cm, contendo meio de cultura mínimo (Pridham & Gottlieb, 1948) com óleo mineral (Sigma) 1% como única fonte de carbono (Gilan *et al.*, 2004) e Ágar 1,5%. As placas foram mantidas a 28°C por 7 dias e as colônias contendo halos de degradação de óleo mineral foram selecionadas para identificação e ensaios específicos com o PE. Utilizou-se, como

controle positivo, os respectivos meios de cultura por meio dos quais os microorganismos foram isolados, mantidos a 28°C por 2 dias. O controle negativo empregado foi o meio mínimo sem óleo mineral, acondicionado a 28°C por 7 dias.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO 16S rRNA

Os isolados que apresentaram fenótipo positivo para degradação de óleo mineral tiveram sua atividade confirmada por outro ensaio semelhante em placas de petri redondas. Esses microorganismos foram cultivados em meio Nutriente Broth para a extração do seu DNA genômico por meio do Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System Quick Protocol (Promega) adaptado para extração de DNA bacteriano. Essa adaptação consiste na adição de 200 µL de H₂O milli Q e 20 µL de lisozima a 20 mg/mL, seguida da incubação a 37°C por 1 hr. Após a adição do tampão de lise do kit, foram inseridas 0,2 g de *glass beads* para agitação no Fast Prep (MP Biomedicals) por 40 segundos. Em seguida, centrifugou-se a 10000×g por 1 min a fim de sedimentar as *beads* e os debris celulares, transferindo-se o sobrenadante para a coluna, iniciando-se o protocolo de purificação do kit segundo especificações do fabricante. O gene do 16S rRNA foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) no termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando-se *primers* universais para bactérias, 27f e 1492r (Lane, 1991). Os experimentos de PCR foram realizados em sistemas de 20 µL, contendo 1µL de DNA total a 0,1 ng/µL (diluição 1:100) e os demais reagentes, de acordo com o descrito na Tabela 9.

Tabela 9. Reagentes utilizados nas reações de amplificação do gene do 16S rRNA.

Reagente	Concentração final
Tampão de Reação	1X
MgCl ₂	1,5mM
Primer 27f	0,5µM
Primer 1492r	0,5µM
dNTPs	200µM
<i>Taq</i> DNA Polimerase	1,25U

As condições utilizadas nas reações estão descritas abaixo:

1. Desnaturação a 95°C durante 3 minutos;
2. Desnaturação a 95°C durante 1 minuto;
3. Anelamento a 53°C durante 1 minuto;
4. Extensão a 72°C durante 1 minuto;
5. Repetição das etapas 2 a 4 por 27 vezes;
6. Extensão a 72°C durante 10 minutos;
7. Manutenção a 10°C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 10 mg/mL. O tamanho destes foi estimado com auxílio do marcador de massa molecular *1kb DNA ladder* (Invitrogen).

5.4 LIMPEZA DAS VIDRARIAS UTILIZADAS

Todas as vidrarias utilizadas nos cultivos restritivos em relação a fontes de carbono foram lavadas com SDS 10% seguidas de 2 lavagens com etanol absoluto e 10 lavagens com H₂O destilada. O material foi deixado o.n. em NaOH 0,5M e, consecutivamente, lavado mais 10 vezes com H₂O bidestilada. Findo esse processo, as vidrarias foram autoclavadas e separadas para uso posterior.

5.5 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE POLIETILENO

Os isolados que apresentaram fenótipo positivo para degradação de óleo mineral foram cultivados em tubos de ensaio de vidro pequenos contendo 3 mL de meio mínimo com polietileno em pó de altíssima massa molecular (Sigma Aldrich) 0,1% como única fonte de carbono, mantidos sob agitação a 160 RPM e 28°C. As culturas foram avaliadas pela presença de células viáveis confirmadas pela purificação do RNA total após 12 dias de cultivo.

5.6 PREPARO DE MATERIAIS E SOLUÇÕES RNASE FREE

Todas as vidrarias e espátulas foram devidamente lavadas e expostas à 180°C o.n. para inativar as RNases, e os microtubos de 1,5 mL, falcons e caixas de ponteiras novos advindos de embalagens devidamente destinadas a essa finalidade. Os reagentes e pipetas foram separados para uso exclusivo, a fim de evitar a contaminação por RNases. A água milli Q utilizada nas soluções foi tratada com DEPC 0,1% (Sigma Aldrich) e autoclavada para a inativação deste. As cubas de eletroforese e quaisquer outros materiais que entrem em contato com o RNA, excluídos os acima descritos, foram tratados com DEPC 0,1% e lavados com água milli Q *RNase free*.

5.7 PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

O RNA total foi purificado através do protocolo de extração ácida de RNA com Trizol Reagent (Invitrogen) a partir das culturas em meio mínimo com PE. Inicialmente, as culturas foram transferidas para tubos eppendorff de 2 mL estéreis e centrifugadas a 7000×g por 5 min a 4°C. O polietileno, que encontrava-se na camada superficial do sobrenadante, foi aspirado, seguido do restante do sobrenadante. Ao todo, foram centrifugados os 3 mL de cada cultura. As amostras foram lavadas com PBS 1X estéril, a fim de retirar os resíduos remanescentes de polietileno em pó, meio de cultura e debris celulares. Após a lavagem, o PBS 1X foi aspirado, da mesma maneira que a cultura centrifugada, e o pellet ressuspendido em 300 µL de PBS 1X e transferido para um novo tubo eppendorf de 2 mL estéril. As amostras foram novamente centrifugadas a 7000×g por 5 minutos a 4°C e, após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 330 µL de Trizol Reagent (Invitrogen), incubando por 5 minutos à temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 66 µL de clorofórmio (Sigma Aldrich), incubando-se as amostras sob agitação por 15 minutos à temperatura ambiente, seguida da centrifugação a 12000×g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorff de 1,5 mL *Rnase free*, e foram adicionados 83,3 µL de isopropanol e 67 µL de solução de citrato de sódio 1M com NaCl 1,2M, incubando-se por 15

minutos à temperatura ambiente. Finda esta etapa, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000×g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA ressuspendido em 1mL de etanol 75%, agitando no vortex por alguns segundos e incubando por 10 minutos à temperatura ambiente, a fim de remover possíveis traços de guanidina, reagente desnaturante presente no Trizol Reagent (Sigma Aldrich). Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação a 10000×g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi submetido à secagem por 10 minutos à temperatura ambiente, e, consecutivamente, ressuspendido em 100 µL de formamida deionizada (Sigma Aldrich), método que se mostra eficaz para preservar o RNA mesmo em concentrações enzimáticas de até 50 µg/mL (Chomczynski, 1992). Os RNAs foram quantificados pelo Qubit (Invitrogen) utilizando-se o kit RNA Quant-it (Invitrogen) e posteriormente submetidos à eletroforese em gel desnaturante de formaldeído corado com brometo de etídio para confirmação do resultado obtido por espectrofotometria e para análise comparativa da concentração dos ácidos nucleicos das amostras.

5.8 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR, TRANSFORMAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os produtos de PCR correspondentes aos genes 16S dos 17 isolados que apresentaram viabilidade celular comprovada pela presença de RNA após cultivo em meio mínimo com polietileno em pó 0,1% foram purificados para posterior identificação. Esses amplicons foram purificados pela eluição dos DNAs de géis de agarose 1% utilizando-se o kit GeneJET PCR Purification (Fermentas) adaptado. As bandas relativas ao gene do 16S rRNA foram excisadas do gel, adicionou-se 200 µL do reagente *Bindind Buffer*, incubando-se as amostras a 70° C por 10 minutos. Decorrido esse tempo, efetua-se o restante do protocolo conforme as especificações do fabricante. A seguir, os respectivos amplicons purificados foram submetidos ao sequenciamento de ácidos nucleicos pela plataforma Sanger da empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

As seqüências que não permitiram a identificação desses isolados em nível de espécie, de

acordo com o resultado do sequenciamento dos amplicons, foram ligadas a vetores pGEM-T Easy (Promega), conforme orientações do fabricante. Os sistemas de ligação foram submetidos à diálise por 15 minutos e transformados por eletroporação em células eletrocompetentes *E. coli* EPI 300. A cada 50 µL de células adicionou-se 3µL do sistema de ligação, transferindo-se estes para uma cubeta de 1mm de largura. Os parâmetros empregados foram 2,5 kV, 25 µF e 200 Ω, com tempo variando entre 4 a 4,5 ms entre as amostras. Após a eletroporação, as células foram inoculadas em meio SOC por 1 hora e, posteriormente, 100 µL deste foi plaqueado em placas contendo meio LB sólido, ampicilina 100 µg/mL, IPTG 0,1 mg/mL e Xgal 40 µg/mL. .

Selecionou-se as colônias brancas, as quais foram inoculadas em falcons de 15 mL contendo 5mL de meio LB líquido e ampicilina 100 µg/mL, incubadas o.n. sob agitação a 200 RPM e 37°C. Assim, 3 mL de cada cultura foram centrifugados a 7000×g por 5 minutos a 4°C e submetidos à extração plasmidial pelo kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), seguindo-se as orientações do fabricante. Os plasmídeos foram digeridos pela enzima de restrição EcoRI (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, a fim de confirmar a presença do fragmento de 16S rDNA amplificado anteriormente. Os plasmídeos digeridos e intactos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio para análises confirmatórias. Sucessivamente, os plasmídeos foram quantificados pelo kit DNA Quant-it (Invitrogen), analisados no Qubit (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, e submetidos ao sequenciamento de ácidos nucleicos pela plataforma Sanger da empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul).

5.9 CULTIVO DOS ISOLADOS EM MEIO MÍNIMO COM FILMES DE POLIETILENO

Os isolados que apresentaram viabilidade celular após cultivo restritivo com polietileno em pó foram cultivados em frascos de vidro, no qual 10 mL de cultura crescida o.n. foram inoculados em 30 mL de meio mínimo e um filme de polietileno de baixa densidade (0,92 g.cm³) com massa molecular média de 191 000 (Ipten®111) (Carmel Olefinas, Haifa, Israel) previamente desinfetado com SDS 1% (Sigma Aldrich) por 2 horas sob agitação, seguida de lavagem com H₂O milli Q e

desinfecção com etanol 70% por mais 2 horas sob agitação. Antes do inóculo, as células foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% (Sigma Aldrich) para retirada dos resíduos de meio nutrient broth. O cultivo foi mantido por 12, 15 e 20 dias, a fim de estimar a evolução da viabilidade e adesão celulares. Os controles negativos de cada isolado, além de *E. coli* e de *B. subtilis*, foram cultivados em tubos de ensaio pequenos contendo lamínulas, mantendo-se a mesma proporção em relação aos cultivos descritos anteriormente: 3 mL de meio mínimo inoculados com 1 mL de cultura, igualmente lavado duas vezes com solução de NaCl 0,9%.

5.10 ANÁLISE DA ADESÃO MICROBIANA AOS FILMES DE POLIETILENO

Os microorganismos aderidos aos filmes de polietileno e os controles negativos, após cultivo por 12, 15 e 20 dias, foram lavados uma vez com PBS 1X e corados pelo kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Invitrogen) e analisados por Microscopia de Fluorescência (Zeiss) em aproximadamente 530 nm (células vivas) e 640 nm (células mortas) de comprimento de onda e aumento de 400 vezes. As imagens foram geradas, editadas e sobrepostas pelo software ZEN (Zeiss).

5.11 SEQUENCIAMENTO DO GENOMA DO ISOLADO PE 187

Com base na alta concentração de RNAs totais após o cultivo com polietileno em pó 0,1% como única fonte de carbono e energia, o isolado PE 187 foi selecionado para o sequenciamento de seu genoma completo utilizando-se a plataforma de sequenciamento Ion Torrent Personal Genome Machine, com uso do chip 318 de acordo com as instruções do fabricante (Rothberg *et al.*, 2011). A montagem do seu genoma foi realizada na sede brasileira da empresa Life Technologies.

A análise de qualidade por base nos reads sequenciados realizou-se pelo programa FASTQC, a fim de obter-se dados a respeito da qualificação das seqüências para as etapas posteriores de mapeamento, chamada de variantes e montagem *de novo*. O mapeamento contra referência foi feito pelo programa TMAP (opção mapall), tendo como genoma de referência *Alcaligenes sp.*

HPC1271, e a chamada de variantes por meio do programa variantCaller, específico para tratar dados de sequenciamento NGS provenientes da tecnologia Ion Torrent. A montagem *de novo* realizou-se por meio do programa Assembler, que executa o software Mira, na versão 3.9.9. Esse mesmo programa também utiliza a ferramenta Picard para efetuar uma sub-amostragem aleatória dos reads. Para essa análise foram utilizados apenas 60% dos reads obtidos no sequenciamento.

Para a anotação do genoma utilizou-se a ferramenta online para anotação de genomas RAST (Nam *et al.*, 2012). O RAST simula a anotação a partir de um subsistema que compara as prováveis regiões codificadoras presentes nos contigs aos seguintes bancos de dados: Center for Biotechnology Information (NCBI) nonredundant database, UniProt, TIGRFam, Pfam, PRIAM, KEGG e COG.

6. RESULTADOS

6.1 COLETA DE MATERIAIS E CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA MICROBIANA

Os materiais produzidos a partir do polietileno, descartados em regiões próximas a áreas preservadas da Chapada dos Veadeiros, foram coletados com base na presença de evidências de degradação, como alteração na cor e textura, e formação de furos e quebras, como mostrado na Figura 10. O potencial microbiano presente nesses debris plásticos foi acessado após ressuspensão dos microorganismos colonizadores desses materiais em solução salina.

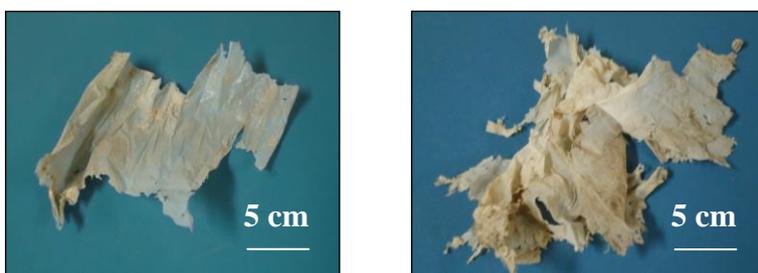


Figura 10. Plásticos coletados apresentando indícios macroscópicos de degradação

A suspensão de frações desses plásticos foi inoculada nos meios sólidos nutrient broth, marine broth, czapek dox, middelbrook e R2A, além do meio mínimo contendo parafina 1%. Após o sucessivo isolamento pela técnica de semeadura por esgotamento, obteve-se cerca de 800 microorganismos isolados, dos quais 647 foram preservados em glicerol 15% a -80°C . Todos os isolados foram nomeados e fotografados, a fim de manter registros sobre as características e morfologias de suas colônias, e os respectivos meios de cultura utilizados. As Figuras 11, 12 e 13 retratam parte da variedade microbiana resgatada por meio do uso de técnicas de cultivo.

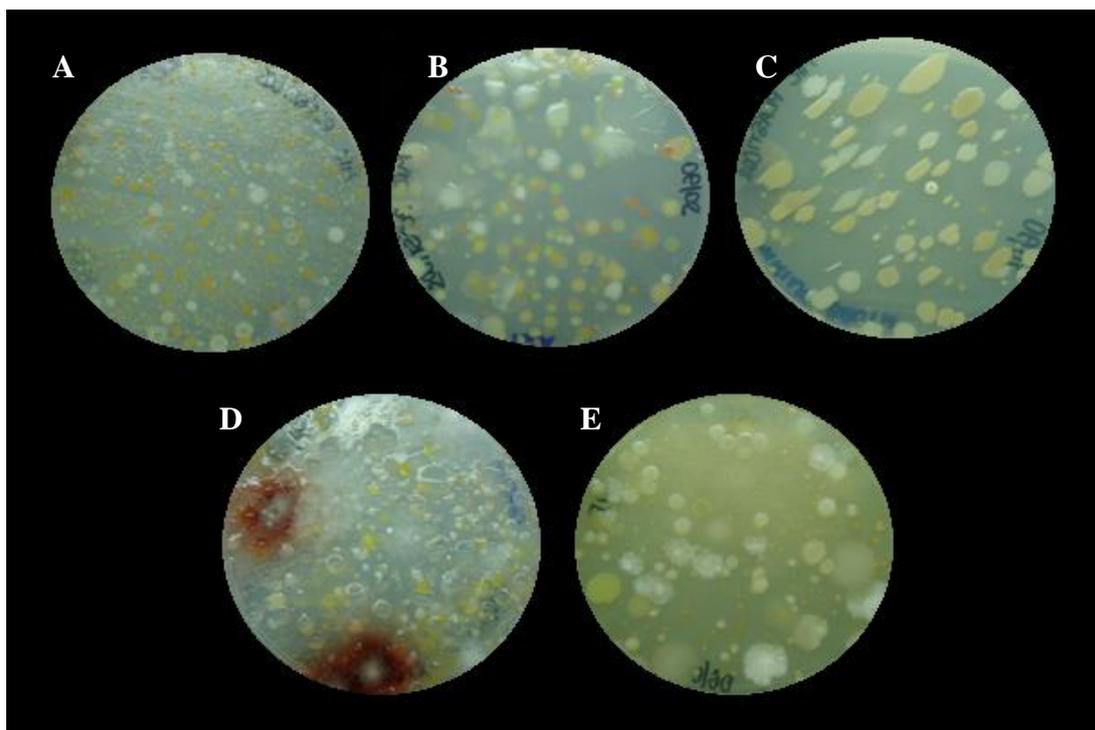


Figura 11. Cultivo em meios R2A (A, B), marine broth (C), czapek-dox (D) e nutrient broth (E) sólidos após inóculo da suspensão de microorganismos colonizadores dos debris plásticos coletados.

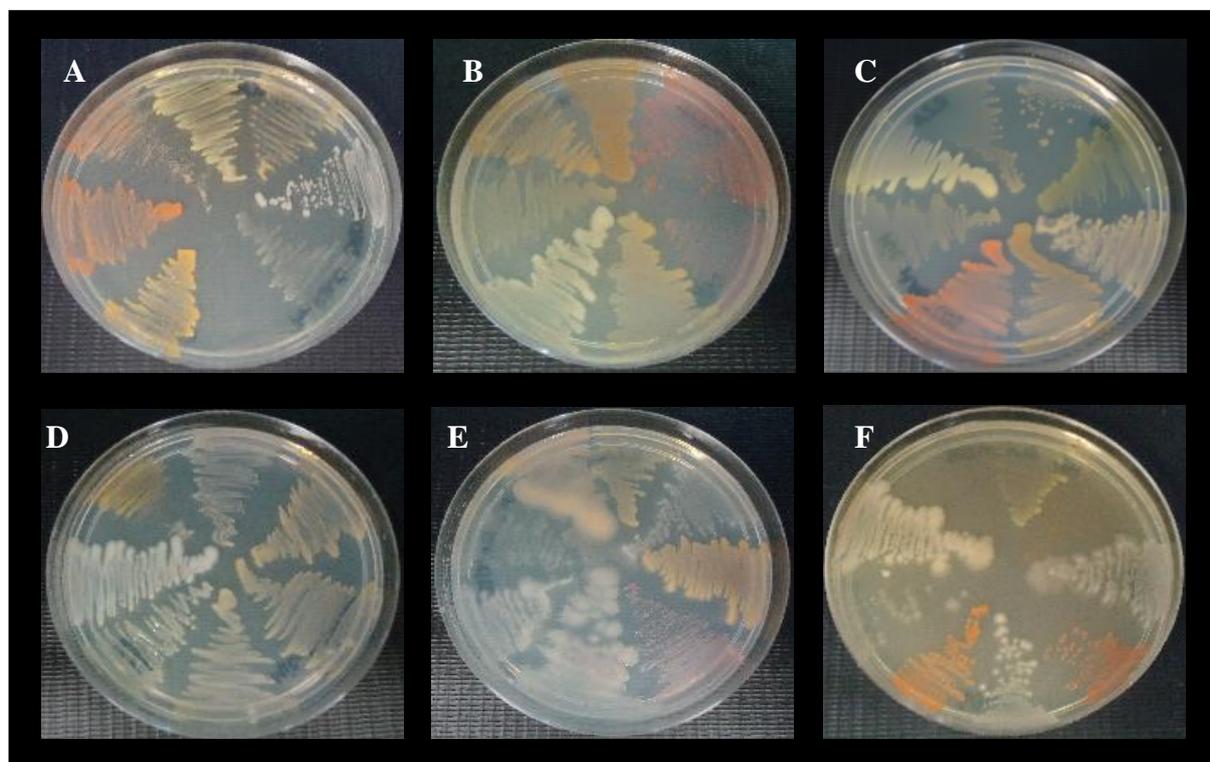


Figura 12. Cultivo em meios marine broth (A), middelbrook (B), R2A (C, D), czapek-dox (E) e nutrient broth (F) sólidos representando parte da diversidade microbiana isolada.



Figura 13. Crescimento microbiano sobre as partículas de parafina em meio mínimo contendo parafina 1% após inóculo da suspensão de microorganismos colonizadores dos debrís plásticos e conseqüentes 10 dias de cultivo.

6.2 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE ÓLEO MINERAL

Todos os microorganismos componentes da biblioteca microbiana construída foram submetidos a uma etapa de pré-seleção a fim de selecionar os isolados capazes de metabolizar compostos quimicamente semelhantes ao polietileno. Nesse sentido, o óleo mineral, comumente chamado de parafina líquida, mostrou-se bastante adequado para essa etapa de pré-seleção, tendo em vista que se trata de uma mistura de alcanos de diferentes massas moleculares, todos, no entanto, passíveis de sofrer assimilação por parte das células microbianas. Para isso, cada isolado foi plaqueado em um *grid* de 1 cm × 1 cm delineado em placas de petri quadradas de dimensões 245 mm × 245 mm × 25 mm contendo meio mínimo com óleo mineral 1%. Como controle positivo, utilizou-se o meio de cultura pelo qual se isolou o microorganismo e, como controle negativo, o meio mínimo sem óleo mineral, de acordo com a Figura 14. Dos 647 isolados testados, 54 apresentaram fenótipo positivo para degradação de óleo mineral o que corresponde a um total de aproximadamente 8,3% dos microorganismos isolados. Os microorganismos degradadores de óleo mineral foram identificados a partir da formação de halos de degradação ao redor das colônia fenótipo positivas. A Figura 15 apresenta imagens desses halos de degradação em contraste a colônias sem este. De modo geral, todos os degradadores de óleo mineral foram isolados a partir de culturas de meio nutrient broth ágar e meio mínimo com parafina 1% ágar, todos crescidos o.n. a 28°C em meio nutrient broth.

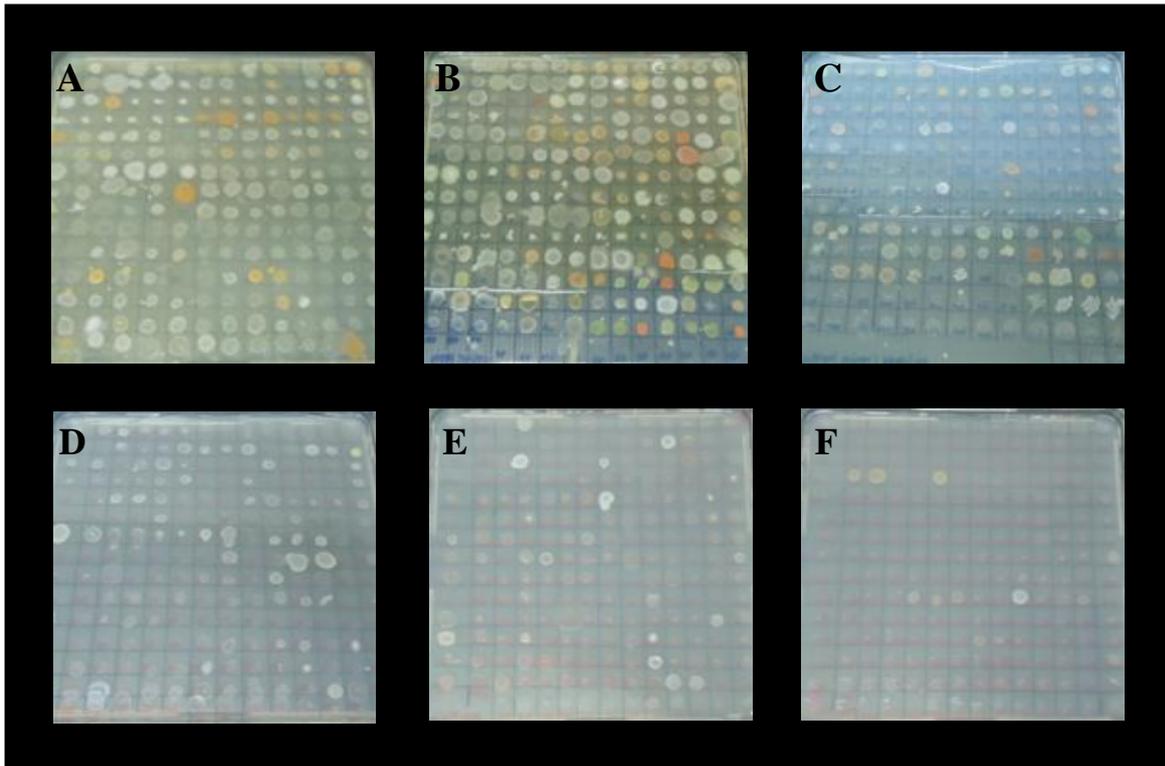


Figura 14. Controles positivos (A, B e C), cultivados em meio nutrient broth (PE 1 ao PE 383 e PE 537 ao PE 647), R2A (PE 384 ao PE 456), czapek-dox (PE 457 ao PE 503), marine broth (PE 504 ao PE 536), e controles negativos (D, E, F), cultivados em meio mínimo sólido, dos 647 isolados, crescidos em grids demarcados em placas de petri quadradas de dimensões 245 mm × 245 mm × 25 mm.

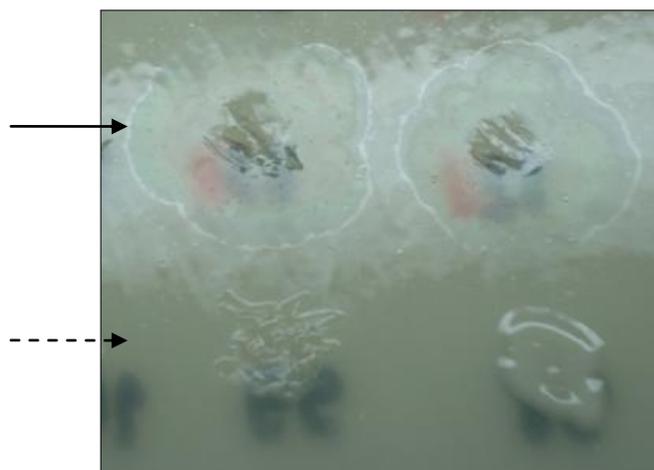


Figura 15. Halos de degradação de óleo mineral (→) e ausência destes (-----→) após cultivo em meio mínimo sólido contendo óleo mineral 1%.

6.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE DO 16S rRNA

As 54 colônias que apresentaram halo de degradação do óleo mineral foram cultivadas em meio nutrient broth e, conseqüentemente, submetidas à purificação de seus DNAs genômicos para posterior amplificação do gene do 16S rRNA. Os DNAs purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, como ilustrado na Figura 16. Os amplicons resultantes também foram submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, conforme mostra a Figura 17, e, consecutivamente, foram estocados a -20°C .

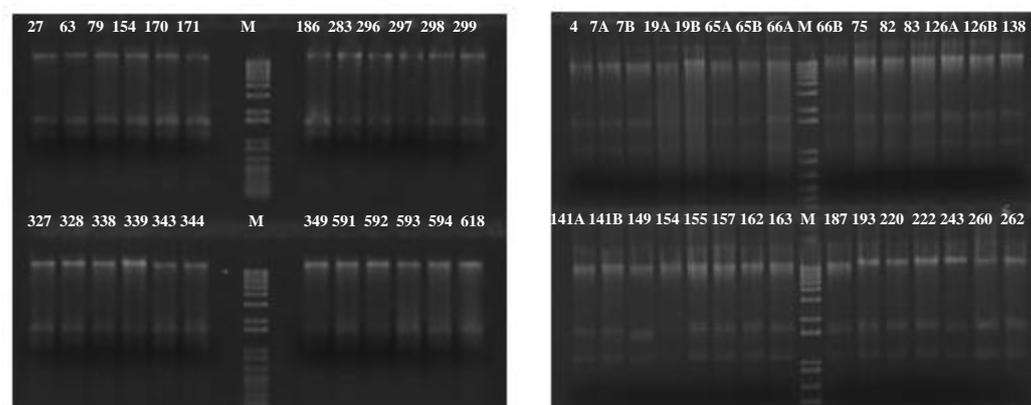


Figura 16. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo após eletroforese dos DNAs genômicos dos 54 isolados degradadores de óleo mineral. Cada isolado está identificado em seu respectivo local de aplicação no gel e o marcador 1 kb está representado por “M”.

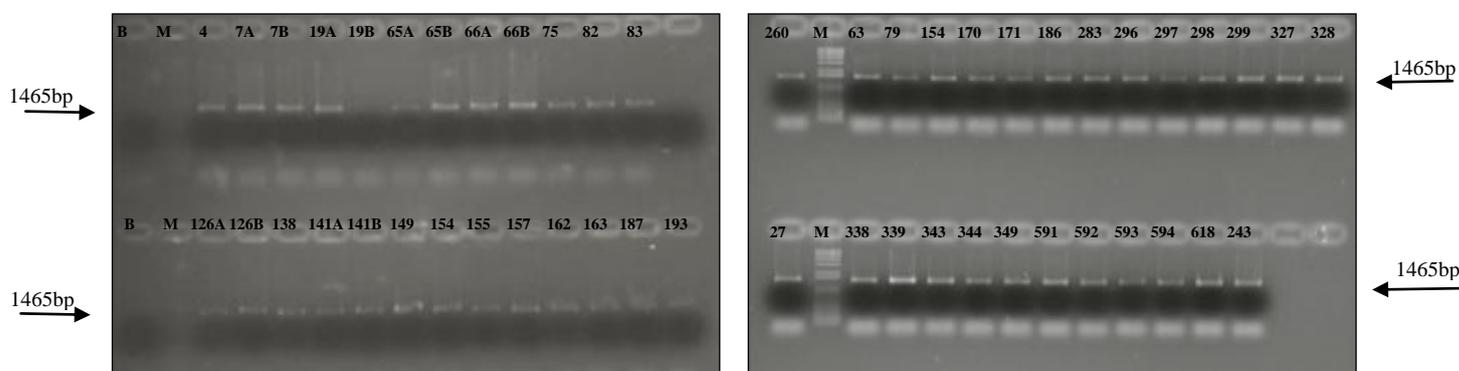


Figura 17. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídeo após eletroforese dos fragmentos do gene do 16S rRNA amplificados com os primers 27f e 1492r. Cada isolado está identificado em seu respectivo local de aplicação no gel e o marcador 1 kb está representado por “M”.

6.4 SELEÇÃO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE POLIETILENO

Após a etapa de pré-seleção que selecionou os 54 isolados degradadores de óleo mineral, estes microorganismos foram cultivados em tubos de ensaio de vidro pequenos contendo meio mínimo com polietileno em pó 0,1%, que apresenta maior superfície de contato do que as formas em filme, como única fonte de carbono e energia. Decorridos 12 dias de cultivo, as amostras foram submetidas à extração ácida de seus RNAs totais com Trizol Reagent (Invitrogen), seguindo o protocolo descrito na metodologia deste trabalho, que objetivou mensurar a presença de atividade metabólica.

A fim de mensurar a concentração de RNA purificado das células e estabelecer um paralelo entre esta e a taxa metabólica microbiana, os RNAs foram quantificados pelo Qubit (Invitrogen) utilizando-se o kit RNA quant it (Invitrogen), segundo especificações do fabricante. Para confirmar esse resultado, as amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% desnaturante de formaldeído, posteriormente corado com brometo de etídeo para análise, como observado na Figura 18. Para a aplicação dos RNAs no gel desnaturante de formaldeído não foi utilizado tampão de amostra, visto que este consiste em uma típica fonte de contaminação por RNases (Chomczynski & Sacchi, 2006). Isso foi possível devido à maior densidade da formamida deionizada em relação ao tampão de corrida MOPS 1X.



Figura 18. Gel desnaturante de formaldeído corado com brometo de etídeo após eletroforese dos RNAs totais extraídos das amostras após 12 dias de cultivo em meio mínimo com polietileno em pó

0,1%. Cada isolado apresentado nessa análise foi identificado em seus respectivos locais de aplicação no gel. As concentrações foram precisamente quantificadas pelo Qubit (Invitrogen) utilizando-se o kit RNA Quant-it (Invitrogen), específico para RNAs.

Um total de 28 isolados apresentaram atividade metabólica após cultivo com polietileno em pó como única fonte de carbono e energia, no entanto, selecionou-se para análises específicas de adesão e viabilidade celulares apenas os isolados cujas concentrações de RNA excederam 5µg/mL. Para essa análise, esses isolados foram cultivados em meios mínimos líquidos contendo um filme de polietileno de aproximadamente 1 cm × 1 cm, e os respectivos controles negativos foram cultivados apenas com uma lamínula de vidro como substrato para adesão. Esse contingente cuja concentração de RNA foi maior do que o limite estipulado totalizou 17 amostras – PE 63, PE 79, PE 138, PE 154, PE 157, PE 162, PE 187, PE 171, PE 186, PE 298, PE 299, PE 327, PE 328, PE 338, PE 343, PE 349 e PE 591 – as quais tiveram seus genes 16S rDNA sequenciados para fins de identificação taxonômica.

6.5 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS SELECIONADOS

Os 17 produtos de PCR referentes aos possíveis degradadores de polietileno foram purificados pela eluição dos DNAs de géis de agarose 1% utilizando-se o kit GeneJET PCR Purification (Fermentas) adaptado para possibilitar a eluição da banda do gel. A adaptação permitiu a eluição da banda correta, com base na massa molecular estimada com auxílio do marcador 1kb DNA ladder (Promega). Isso propicia um sequenciamento mais robusto, pois evita a interferência dos produtos de PCR inespecíficos e do DNA genômico vestigial na reação. Após esse procedimento, as amostras foram submetidas ao sequenciamento de ácidos nucleicos pela plataforma Sanger da empresa Macrogen (Coreia).

Em seguida, confirmou-se o resultado do sequenciamento de alguns dos amplicons a partir da clonagem dos fragmentos correspondentes ao gene do 16S rRNA em vetores para que o

plasmídeo resultante também pudesse ser seqüenciado, garantindo-se, assim, uma maior confiabilidade no resultado. As amostras PE 138, PE 171, PE 186 e PE 327 tiveram seus amplicons seqüenciados, enquanto todas as outras foram identificadas por meio do seqüenciamento de seus clones do gene do 16S rRNA. As sequências de genes do 16S rRNA dos clones mencionados foram alinhadas com o algoritmo Clustal X (Larkin *et al.*, 2007). O alinhamento foi editado manualmente no Bioedit, inclusive a realização do complemento reverso das amostras PE 298, PE 299 e PE 343, cujo fragmento do gene do 16S rRNA inseriu-se no vetor na direção oposta. As sequências foram comparadas aos bancos de dados do NCBI e do Greengenes (De Santis *et al.*, 2006) para classificação taxonômica, através da ferramentas Blastn e Mothur (Schloss *et al.*, 2009), respectivamente. Essa análise possibilitou a identificação de 4 diferentes gêneros: *Comamonas sp.* (PE63), *Alcaligenes sp.* (PE 187), *Delftia sp.* (PE 79, PE 138, PE 154, PE 157, PE 162, PE 171 e PE 186) e *Stenotrophomonas sp.* (PE 298, PE 299, PE 327, PE 328, PE 338, PE 343, PE 349 e PE 591).

As sequências do gene do 16S rRNA das amostras foram alinhadas às sequências de representantes dos gêneros identificados, os quais serviram como referência na construção de um cladograma de similaridade no sentido de permitir a estimativa das possíveis classificações dos isolados nessa construção taxonômica (Figura 19). O cladograma de similaridade das seqüências foi construído pelo programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) pelo alinhamento múltiplo das seqüências investigadas com as disponíveis em bancos de dados, por meio do método de máxima verossimilhança.

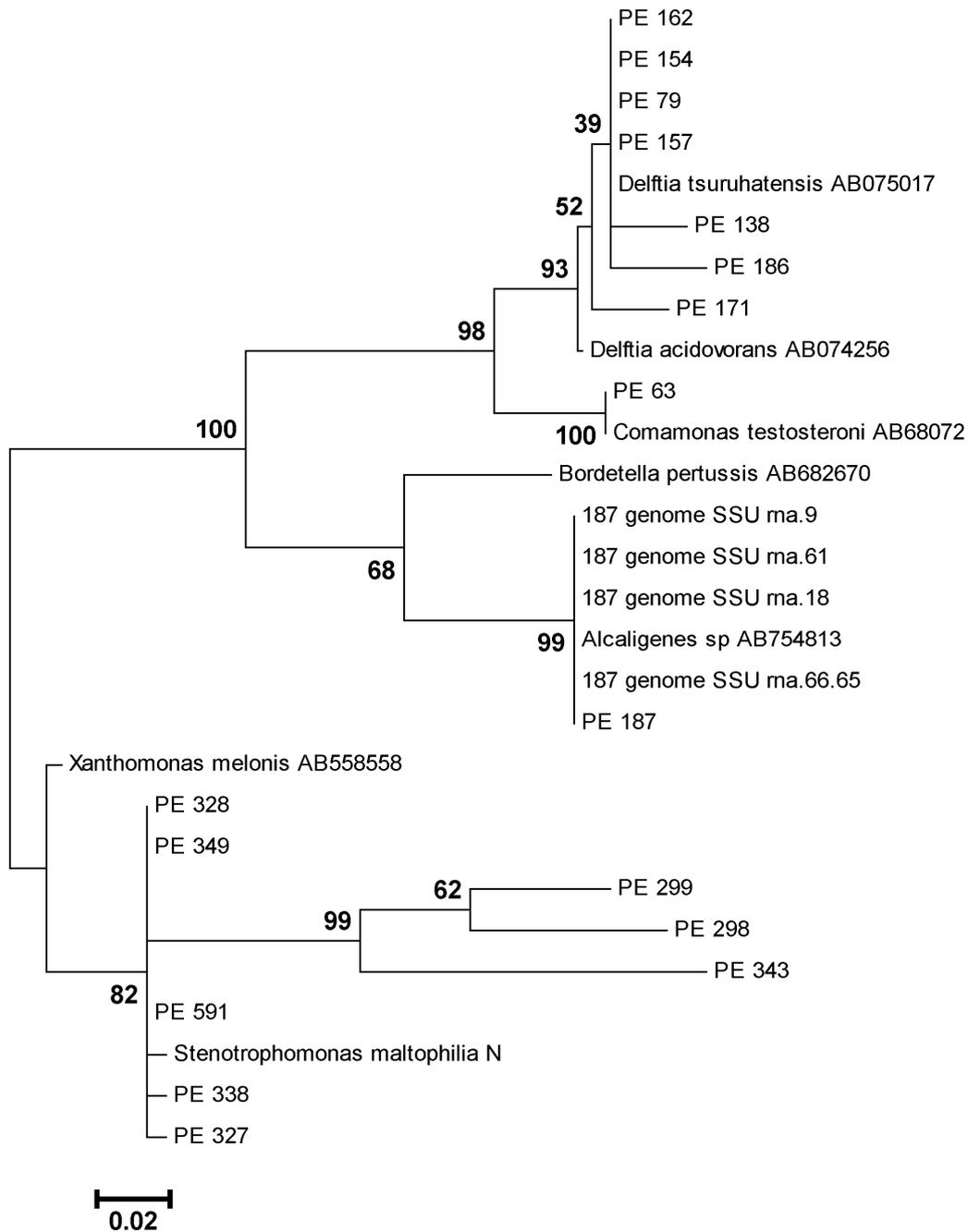


Figura 19. Cladograma de similaridade de seqüências dos genes do 16S rRNA dos isolados com atividade metabólica após cultivo em meio mínimo com polietileno como única fonte de carbono e das bactérias de referência, incluindo o nome e número de acesso ao GeneBank destas. O cladograma foi construído após alinhamento das seqüências dos genes 16S dos isolados com as seqüências de bactérias de referência. Também utilizou-se nessa construção as seqüências dos genes 16S anotadas pelo RAST provenientes do genoma do isolado PE 187. Para tanto, utilizou-se o programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) pelo método de máxima verossimilhança, apresentando-se

antepostos aos cladogramas os valores de bootstrap (Felsenstein, 1985). A escala indica a distância de similaridade dos ramos.

6.6 CULTIVO DOS ISOLADOS E ANÁLISE DOS FILMES DE POLIETILENO

Paralelamente ao sequenciamento, as 17 amostras possivelmente degradadoras de polietileno e dois padrões tipicamente não biodegradadores de polietileno representantes dos grupos gram positivos e gram negativos, *B. subtilis* e *E. coli*, foram cultivados em frascos de vidro contendo meio mínimo líquido com um filme de polietileno de baixa densidade de aproximadamente 1 cm de lado. Para cada amostra, foram gerados controles negativos sob as mesmas condições, mas, ao invés da adição do filme de polietileno como fonte de carbono, adicionou-se uma lamínula apenas como substrato para adesão. Decorridos os períodos de 12, 15 e 20 dias, retirou-se os filmes e lamínulas dos frascos para corá-los com o kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Invitrogen) e analisá-los em microscopia de fluorescência a 530 nm e 640 nm, a fim de mensurar a presença e a proporção de células vivas e mortas aderidas, respectivamente. Esse kit é composto por dois fluoróforos repórteres de viabilidade celular, SYTO9® e iodeto de propídio, resultando na emissão de fluorescência verde pelas células viáveis e na fluorescência vermelha pelas inviáveis. Isso possibilitou essa estimativa simultânea da adesão e da viabilidade celulares após análises em microscopia de fluorescência.

As micrografias foram obtidas separadamente para cada comprimento de onda, mantendo-se a mesma posição focal. As imagens foram registradas, editadas e sobrepostas pelo software ZEN (Zeiss). A edição foi cuidadosamente realizada a fim de facilitar a visualização sem, no entanto, alterar os dados representados na imagem. Basicamente, a edição consistiu em escurecer o plano de fundo para aumentar o contraste da fluorescência até o limite da visualização de todos os seus pontos relevantes. A sobreposição das imagens foi realizada após a edição destas, com a finalidade de facilitar a visualização da distribuição das células viáveis e inviáveis ao longo da superfície do plástico.

Os controles negativos dos isolados e dos padrões foram cultivados em tubos de ensaio de vidro pequenos, mantendo-se a mesma proporção entre células e meio de cultura em relação aos cultivos em frascos com filmes de polietileno: 3mL de meio mínimo inoculados com 1mL de cultura de células. Com o propósito de simular a adesão microbiana aos filmes de polietileno, foram adicionadas lamínulas, previamente lavadas e esterilizadas, nos tubos de ensaio contendo a cultura a ser investigada. O objetivo foi realizar as análises dos controles nas mesmas condições e metodologias das amostras de polietileno. A comparação das amostras aos seus controles permitiu avaliar o impacto da presença de polietileno para a viabilidade celular. Dos 17 isolados que apresentaram atividade metabólica após cultivo com polietileno em pó 0,1% como única fonte de carbono, 9 apresentaram-se como potenciais biodegradadores de polietileno após essas análises em microscopia de fluorescência: PE 63 (*Comamonas sp.*), PE 138, PE 157 (*Delftia sp.*), PE 298, PE 328, PE 338, PE 343, PE 349 e PE 591 (*Stenotrophomonas sp.*). As Figuras 20-25 apresentam as imagens individuais e sobrepostas nos três diferentes períodos de cultivo para cada amostra e seus respectivos controles negativos dos dois padrões e de 4 isolados representantes de cada gênero identificado no presente trabalho, escolhendo-se prioritariamente os potenciais biodegradadores de polietileno: PE 63, PE 157, PE 187 e PE 591. As imagens referentes aos demais isolados encontram-se no Anexo I. A Tabela 10 apresenta um resumo dos resultados obtidos após as análises de adesão e viabilidade celulares por microscopia de fluorescência, com base na proporção de viáveis em relação às inviáveis nos diferentes períodos de cultivo para as amostras e seus controles negativos. Os isolados que apresentaram uma fração expressiva de células viáveis em contraste à pequena fração de inviáveis são representados por "++", e aqueles cuja presença de inviáveis é significativamente predominante são representados por "- -". Os símbolos "+", "+-" e "-" representam gradações intermediárias entre "++" e "- -" dessa proporção de viáveis em relação às inviáveis.

Tabela 10 . Resumo da presença de viabilidade celular dos microorganismos aderidos ao filme de polietileno (PE) e de seus controles negativos (C-) após 12, 15 e 20 dias de cultivo

Isolado	Gênero	PE			C-		
		12 dias	15 dias	20 dias	12 dias	15 dias	20 dias
PE 63*	<i>Comamonas</i>	++	++	++	-	--	--
PE 79	<i>Delftia</i>	+	+	+	+	-	+
PE 138*	<i>Delftia</i>	++	++	++	++	-	--
PE 154	<i>Delftia</i>	+	-	-	-	-	+
PE 157*	<i>Delftia</i>	+	++	++	+	-	--
PE 162	<i>Delftia</i>	+	+	+	+	+	-
PE 171	<i>Delftia</i>	+	++	+	+	+	+
PE 186	<i>Delftia</i>	+	++	+	-	-	-
PE 187	<i>Alcaligenes</i>	++	+	+	++	++	-
PE 298*	<i>Stenotrophomonas</i>	+	++	+	-	-	--
PE 299	<i>Stenotrophomonas</i>	+	+	+-	-	-	-
PE 327	<i>Stenotrophomonas</i>	+	++	+	++	-	+
PE 328*	<i>Stenotrophomonas</i>	++	+	++	++	-	--
PE 338*	<i>Stenotrophomonas</i>	++	++	++	-	-	-
PE 343*	<i>Stenotrophomonas</i>	++	++	++	+-	-	-
PE 349*	<i>Stenotrophomonas</i>	++	++	++	-	-	-
PE 591*	<i>Stenotrophomonas</i>	++	++	++	+	-	--

*Potenciais biodegradadores de polietileno

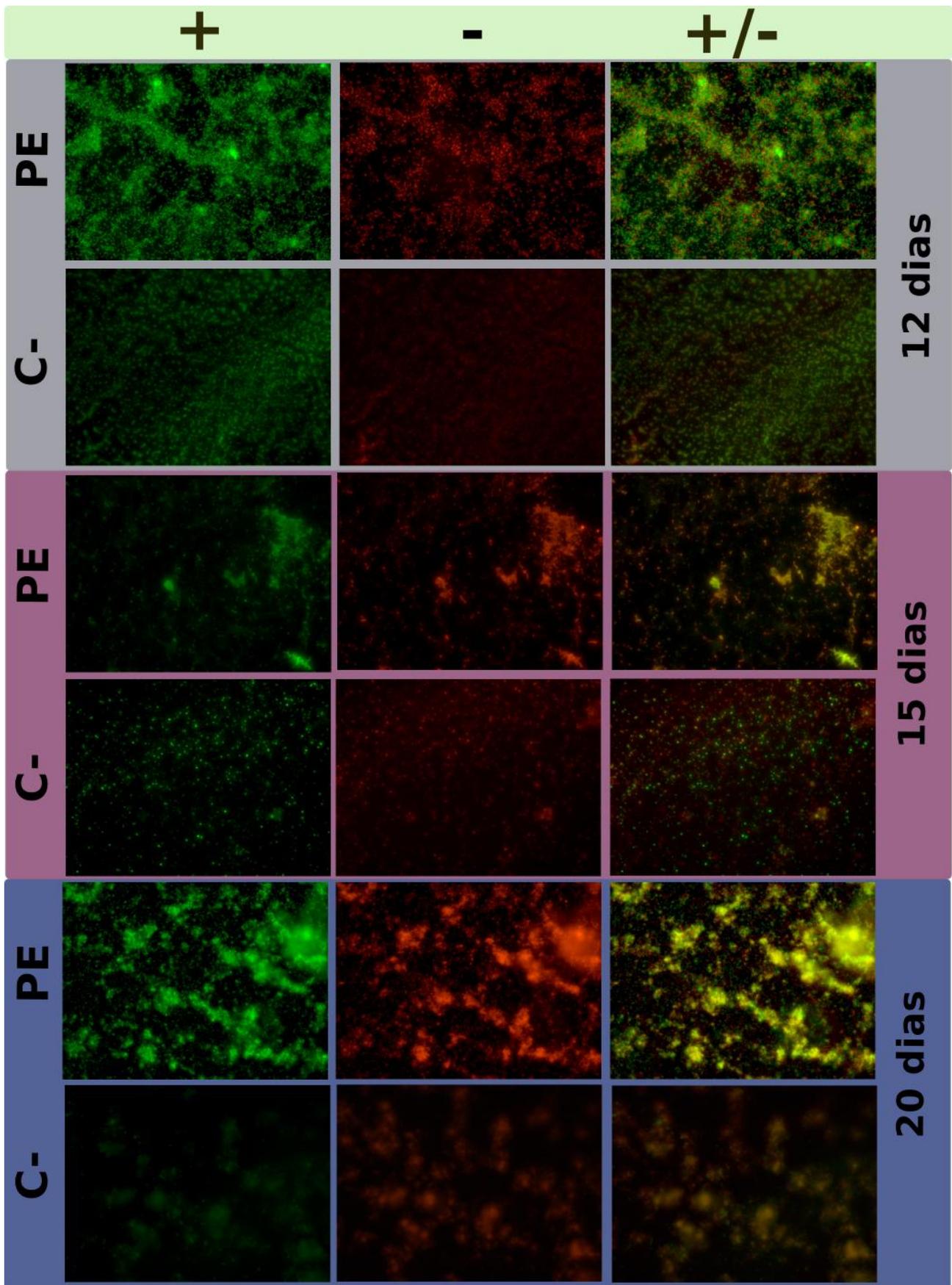


Figura 20. Adesão e viabilidade celulares de *B. subtilis* após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

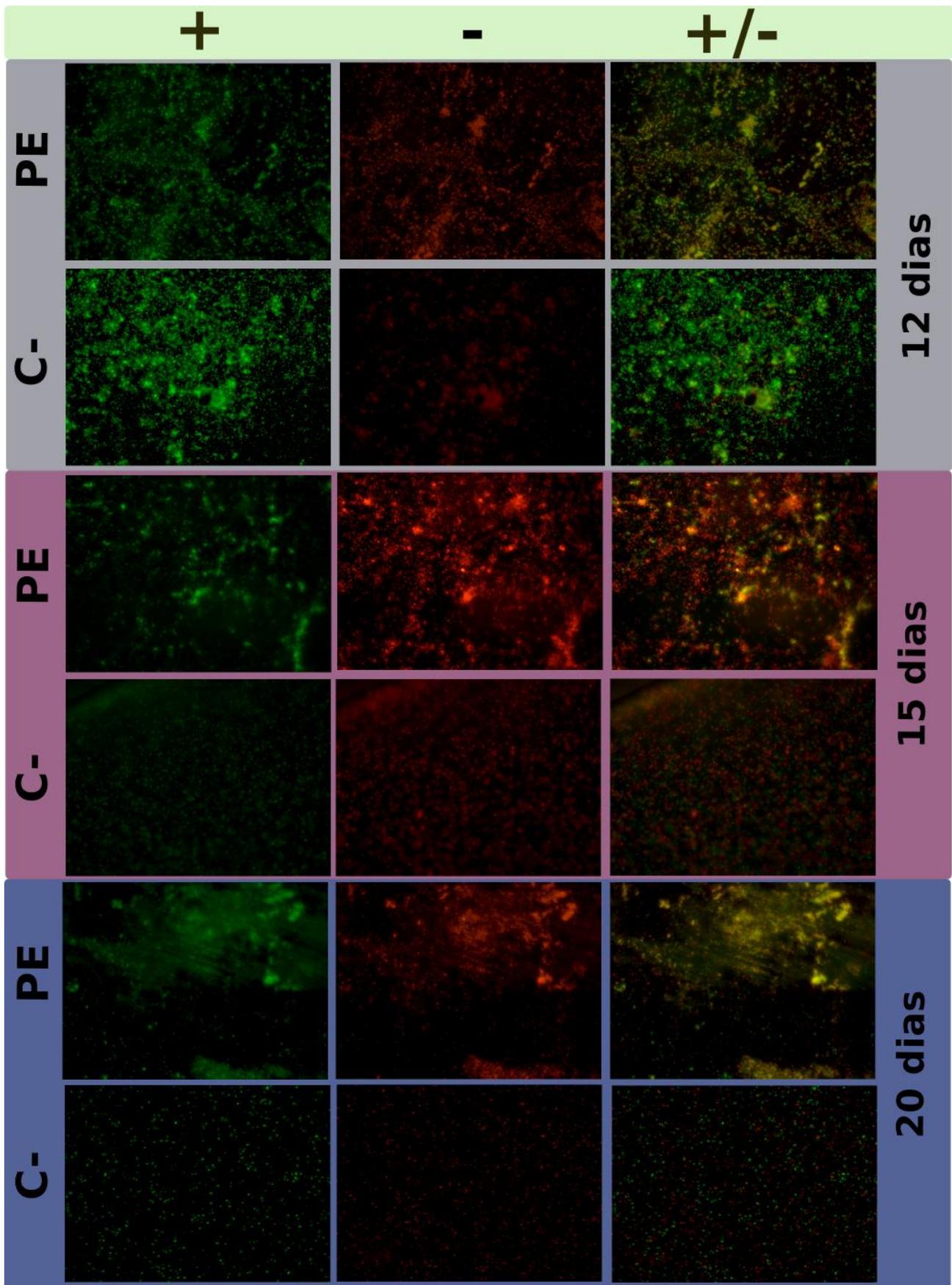


Figura 21. Adesão e viabilidade celulares de *E. coli* após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

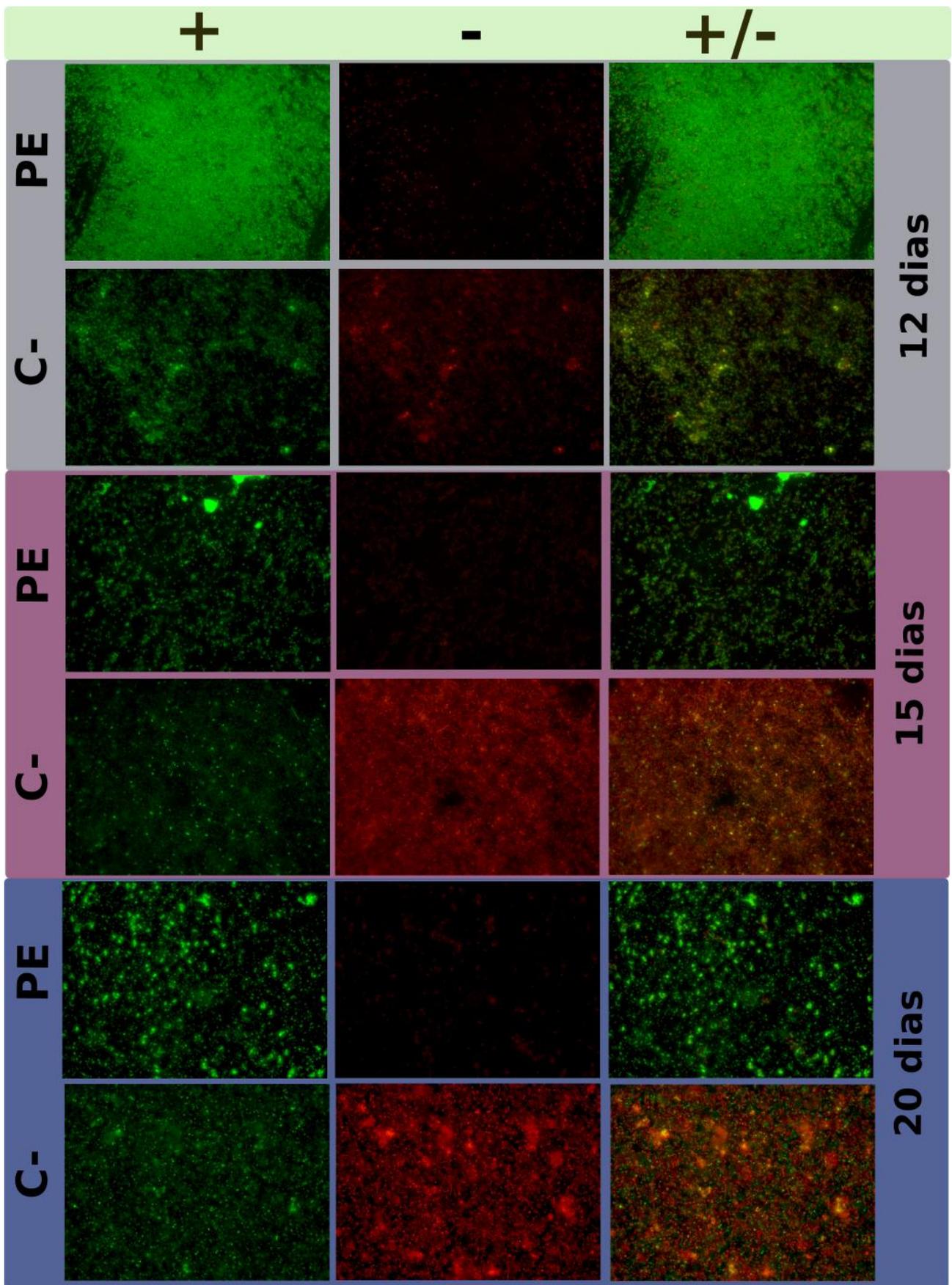


Figura 22. Adesão e viabilidade celulares de **PE 63** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

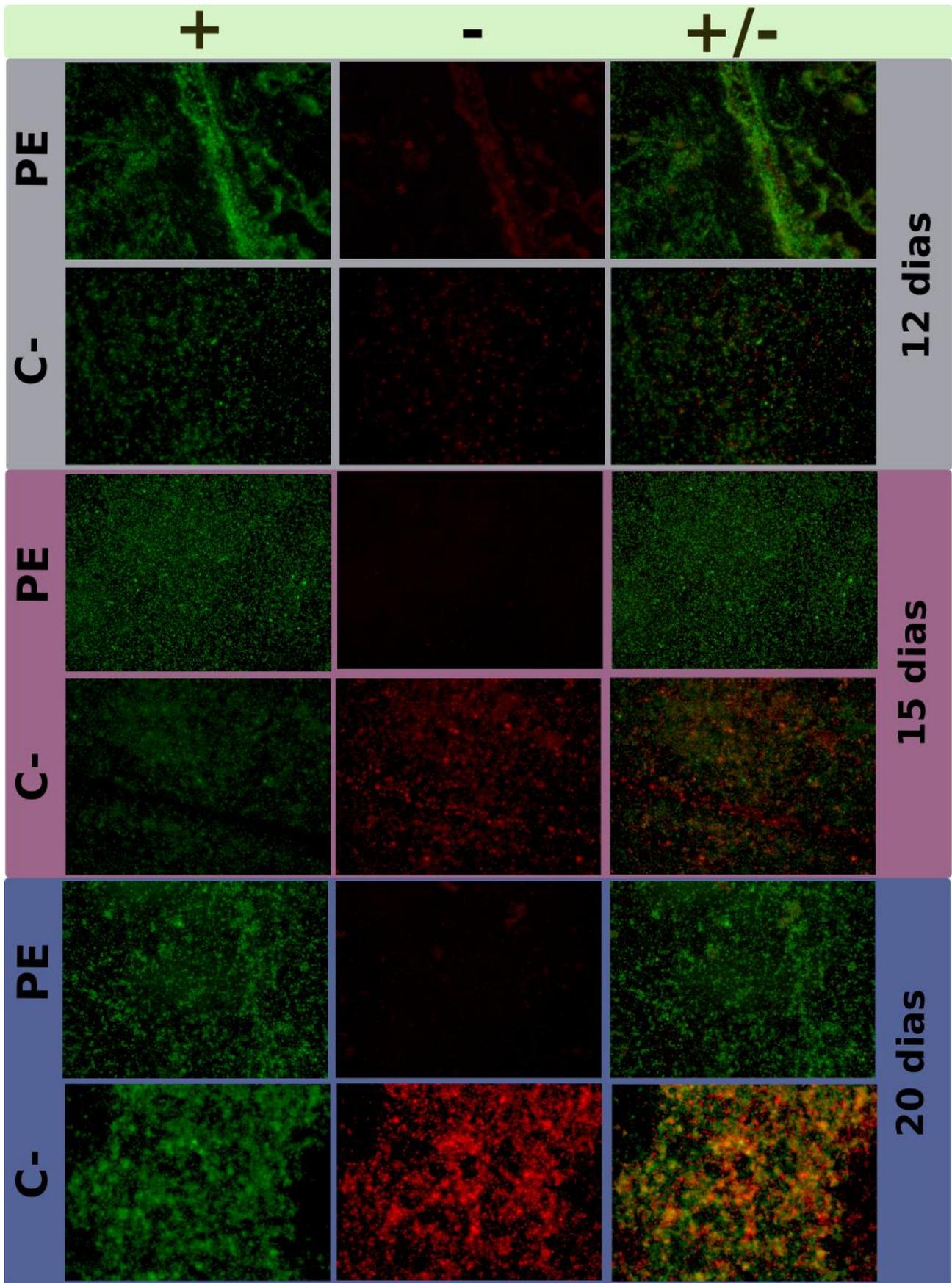


Figura 23. Adesão e viabilidade celulares de **PE 157** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

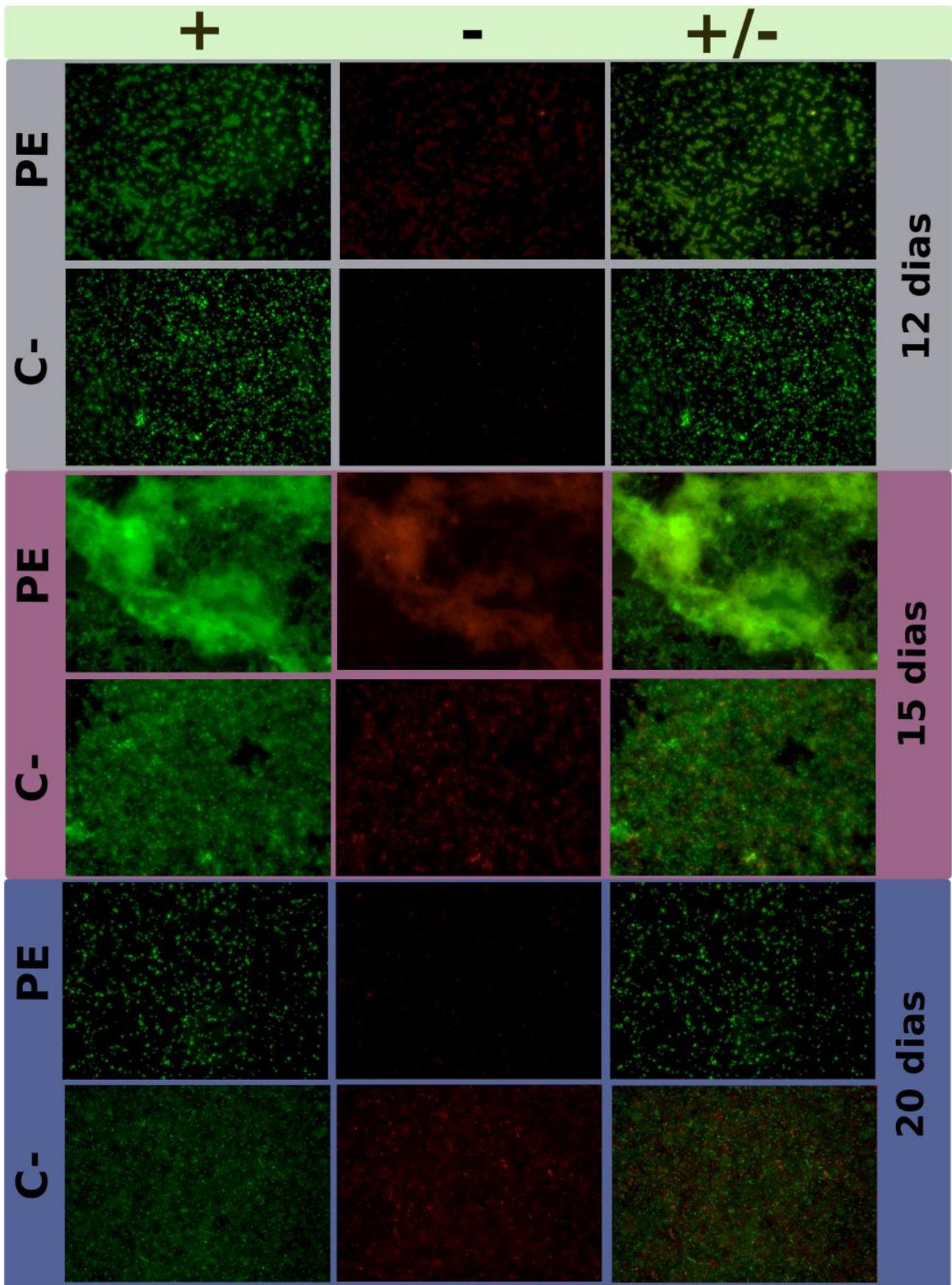


Figura 24. Adesão e viabilidade celulares de **PE 187** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

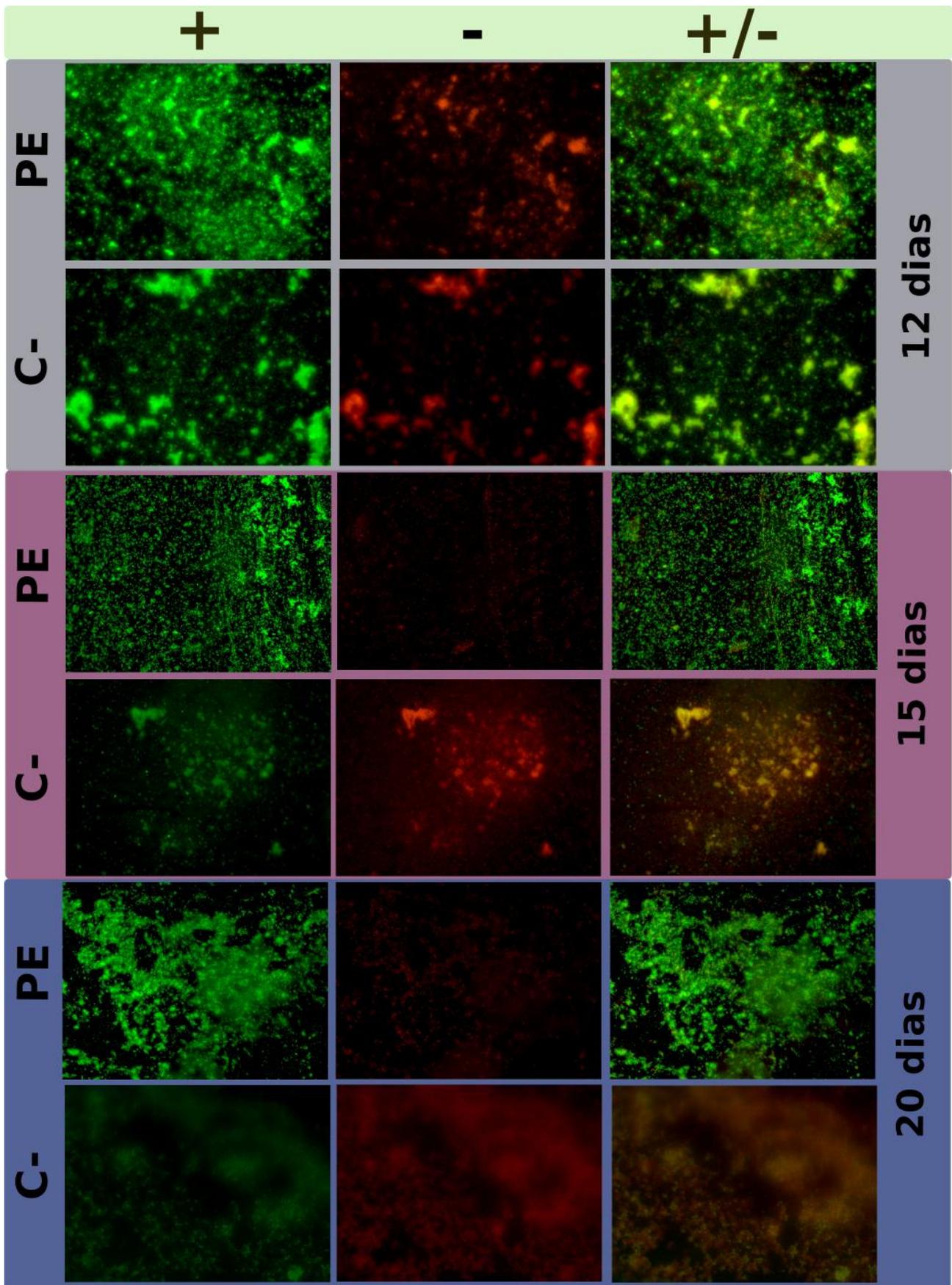


Figura 25. Adesão e viabilidade celulares de PE 591 após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

6.7 SEQÜENCIAMENTO DO GENOMA DO ISOLADO PE 187

Em virtude do destaque apresentado pelo isolado PE 187 após cultivo com polietileno como única fonte de carbono, este foi selecionado para seqüenciamento de seu genoma pela plataforma Ion Torrent. Essa amostra foi escolhida apenas com base em sua alta concentração de RNA após o cultivo descrito anteriormente, tendo em vista que, no momento de envio da amostra para a empresa Life Technologies, ainda não obtinham-se informações acerca da identificação desses isolados e nem da viabilidade e adesão destes após cultivo com polietileno em filme por meio da técnica de microscopia.

A partir do seqüenciamento, foram obtidos 7.010.060 reads de tamanho médio de 209bp, representando uma cobertura de 344× em relação ao número de bases do genoma de referência, *Alcaligenes sp.* HPC1271. Obteve-se uma qualidade constante média de Q30, comprovando a qualidade do seqüenciamento. Isso significa que a taxa de erro imposta pelo seqüenciamento foi de 1 erro a cada 1000 bases seqüenciadas. Do total de reads obtidos, 6.171.300 (88%) foram mapeados e 183.355 variantes foram encontradas, estas correspondendo a SNPs e INDELS. Para a montagem *de novo* foram utilizados 60% dos reads obtidos no seqüenciamento, resultando em um consenso de 4.241.411bp, composto por 68 contigs.

O software RAST é apropriado para a anotação de genomas de bactérias e arqueias (Henry *et al.* 2011), permitindo a análise funcional do genoma seqüenciado a partir da comparação dos contigs a bancos de dados de genomas de microorganismos semelhantes. A taxonomia completa mostrou que o isolado PE 187 é pertencente ao domínio *Bacteria*; filo *Proteobacteria*; classe *Betaproteobacteria*; ordem *Burkholderiales*; família *Alcaligenaceae*; gênero *Alcaligenes*; cujo genoma apresenta 4.241.411bp e 3867 seqüências codificadoras, das quais 1916 foram anotadas. Com essa anotação, foi possível observar inúmeras particularidades em relação ao isolado em questão. A Figura 26 corresponde às categorias gênicas identificadas pelo software, apresentando a distribuição proporcional destas no genoma.

O genoma confirmou a presença de genes relacionados à produção de cápsula, flagelos e, apesar de tratar-se de um gram negativo, também apresentou genes relacionados à biossíntese de ácido teicurônico, glicopolímeros de parede típicos de gram positivos (Weidenmaier & Peschel, 2008). Apresentam, também, duas bacteriocinas, peptídeos antibacterianos: marinocina, proteína antibacteriana de amplo espectro, e colicina V (Feldgarden & Riley; 1999). Existem pelo menos 68 conjuntos de genes relacionados à resistência a antibióticos e compostos tóxicos, como o locus de resistência a múltiplos antibióticos MAR, principalmente beta-lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas e tetraciclina (Randall & Woodward, 2002); bombas de efluxo; beta-lactamase; tolerância a cobre; resistência a arsênio, à fluoroquinolona, a cobalto-zinco-cádmio, à fosfomicina e a compostos de cromo. Possui operons de virulência descritos para *Mycobacterium* envolvidos na síntese proteica, na transcrição e na biossíntese de quinolinato, não possuindo genes mais específicos relacionados à virulência, como ilhas de patogenicidade. Interessante ressaltar que apesar de ser uma bactéria não esporulante, apresenta genes relacionados à desidratação para esporulação e à síntese de proteínas associadas a esta com funções diversas.

Em relação à degradação de moléculas complexas, foram encontrados genes relacionados à degradação de lignina e ao metabolismo de compostos aromáticos, como fenol, catecol, tolueno, quinato, benzoato, p-hidroxibenzoato, bifênil, aromáticos heterocíclicos e cloroaromáticos. Também apresenta 38 conjuntos de genes para o metabolismo de polihidroxibutirado (PHB), muito utilizado na produção de bioplásticos. Foram localizados genes relativos ao metabolismo de enxofre e nitrogênio. Dentre estes, pode-se citar a assimilação de amônia e desnitrificação, e, dentre aqueles, a assimilação de enxofre orgânico e inorgânico, além da oxidação de compostos dessa natureza.

Destaca-se a presença de inúmeros mecanismos de resposta ao estresse, sendo um deles particularmente importante para o presente trabalho: resistência à depleção de carbono, ou *carbon starvation*. Os genes encontrados codificam as proteínas RspA e RspB (Starvation sensing protein), Cst A e CstAP (Carbon starvation protein), Slp e SlpP (Starvation lipoprotein), além das SspA e SspB (Stringent starvation protein), todas relacionadas a essa resistência. Ademais, esse micro-

organismo é considerado fermentador, visto que apresenta genes para a síntese de butanol e acetolactato, além da fermentação de acetyl-coA a butirato.

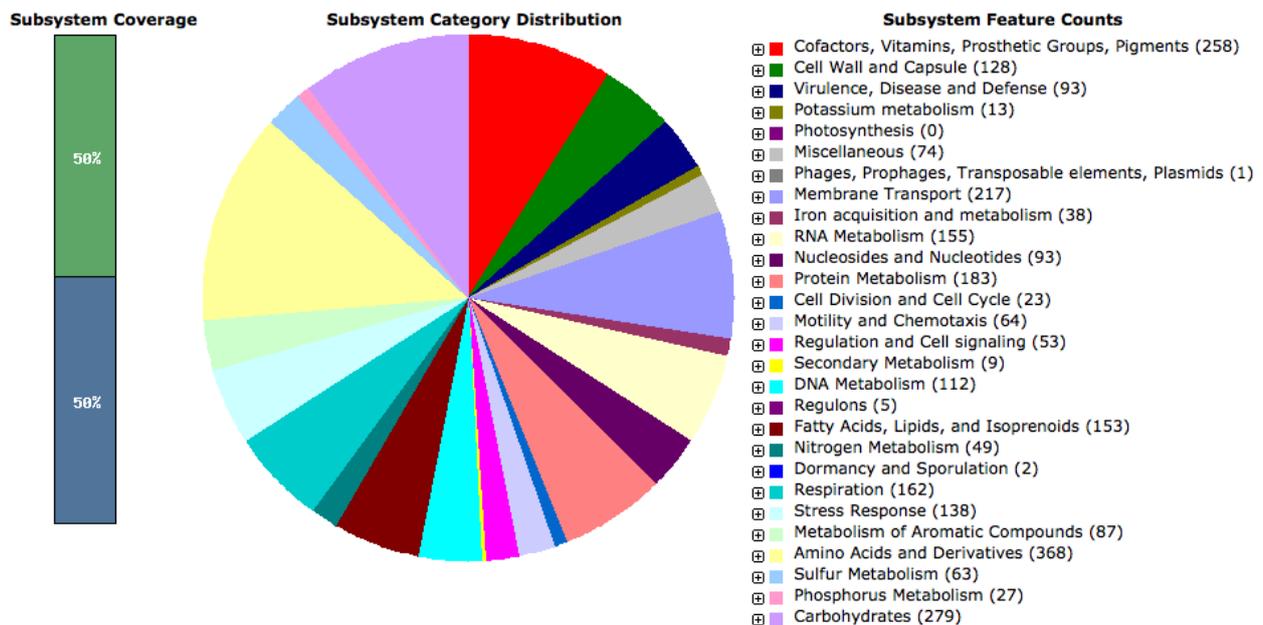


Figura 26. Cobertura do genoma anotado (50%), proporção da distribuição dos genes entre as respectivas categorias de genes identificadas e, entre parentesis, o número de clusters gênicos em cada categoria.

7. DISCUSSÃO

Aproximadamente 140 milhões de toneladas de polímeros sintéticos são produzidos mundialmente a cada ano. Por serem compostos extremamente estáveis, estes se acumulam nos ecossistemas gerando alarmantes problemas ambientais (Hueck, 1974; Shima, 2001; Sivan, 2011). Diante desse panorama, estudos acerca da biodegradação desses materiais emergem, na tentativa de restabelecer a sustentabilidade na relação homem-ambiente. Assim, o presente estudo tem por objetivo acessar microorganismos capazes de degradar esses materiais, particularmente o polietileno, a partir de técnicas de isolamento e cultivo de microorganismos.

O planejamento da coleta, no que diz respeito à busca por plásticos pós-consumo descartados em ambientes naturais, objetivou aumentar a probabilidade de seleção de microorganismos fenótipos positivo para degradação de polietileno. De maneira simplista, é coerente inferir que, como aqueles materiais já apresentavam indícios macroscópicos de degradação e, provavelmente, já haviam sido descartados há um tempo razoável em um ambiente de grande riqueza e diversidade de microorganismos, sua comunidade microbiana já estava sob pressão seletiva (Pospisil & Nespurek, 1997; Shah *et al.*, 2007). Portanto, a chance de triar-se algum organismo portando o fenótipo desejado seria consideravelmente elevada.

Para acessar e resgatar esse potencial microbiano presente nos materiais coletados, foi necessária uma metodologia que afetasse minimamente a variedade e quantidade de microorganismos ali dispostos. Conseqüentemente, esses microorganismos foram ressuspensos em solução de NaCl 0,9%, visando apenas a manter a osmolaridade e a disponibilizar as células para o subsequente cultivo. Diferentes meios de cultura foram utilizados a fim de isolar uma grande variedade de microorganismos por meio da técnica de semeadura por esgotamento, sendo estes os meios R2A, marine broth, middelbrook, nutrient broth, czapek-dox e meio mínimo contendo parafina 1%. O meio R2A tem a finalidade de isolar bactérias de crescimento lento, que geralmente são suprimidas pelas de crescimento mais rápido, enquanto o meio marine broth isola bactérias de ambientes marinhos. Por sua vez, o meio middelbrook foi utilizado com o propósito de isolar

micobactérias e o meio nutrient broth utilizado como meio genérico para isolamento de bactérias. A fim de isolar-se fungos, empregou-se o meio czapek-dox em virtude da habilidade destes em crescer nesse meio de cultura. Com o propósito de garantir o efetivo isolamento das células, as colônias eram semeadas em pelo menos três diferentes placas sucessivas e, somente após a presença exclusiva de colônias de mesma morfologia, estas foram selecionadas e cultivadas em meio líquido para posterior estoque em glicerol 15% a -80°C. Com essa metodologia, foi possível isolar mais de 800 colônias e estocar 647 destas (Figura 14).

A montagem dessa coleção microbiana foi primordial, subsidiando o processo de prospecção de microorganismos potencialmente degradadores de polietileno a partir de um desenho metodológico embasado na eliminação progressiva de candidatos que não apresentem as características desejadas em cada etapa do experimento. A primeira etapa dessa metodologia foi a pré-seleção de microorganismos que apresentem características que fomentem a possibilidade de ocorrência de biodegradação do referido polímero.

O óleo mineral, ou parafina líquida, consiste em uma mistura de alcanos cujas cadeias carbônicas compreendem de 15 a 40 carbonos e massa molecular menor que 500g/mol, sendo, assim, caracterizado como uma mistura de compostos orgânicos assimiláveis, susceptíveis ao metabolismo microbiano (Potts *et al.*, 1972; Albertsson & Karlsson, 1990). Tendo em vista o fato de suas características químicas serem bastante semelhantes às do polietileno, utilizou-se esse óleo como estratégia de pré-seleção de microorganismos potencialmente degradadores desse polímero (Albertsson *et al.*, 1987; Gilan, 2004; Hadad *et al.*, 2005). Para determinar a capacidade de um microorganismo para degradar o polietileno, primeiramente é recomendável avaliar se ele é capaz de metabolizar compostos de mesma natureza deste, com o intuito de simplificar o processo de triagem. Assim, justifica-se a escolha do óleo mineral como etapa inicial da prospecção proposta, visando a otimizar, facilitar e viabilizar esta.

Para possibilitar uma avaliação mais precisa da ocorrência ou não de biodegradação da parafina líquida, foram necessários controles negativos e positivos, sendo estes o cultivo dos

microorganismos nos meios de cultura sólidos empregados para isolá-los e aqueles o cultivo em meio mínimo sólido. Utilizou-se o controle positivo para testar a efetividade da preservação microbiana em glicerol 15% a -80°C e avaliar se, mesmo após a submissão dos isolados a baixíssimas temperaturas, estes continuam viáveis. Com base na Figura 15 é possível observar que todos os componentes da biblioteca microbiana mostraram-se capazes de duplicar-se quando em presença de condições ambientais e nutricionais favoráveis. Por sua vez, o controle negativo objetivou demonstrar tanto o impacto da presença de ágar para o crescimento microbiano, quanto a morfologia da colônia na ausência do óleo mineral, além da ausência de halo da degradação deste. Verifica-se que, mesmo quando cultivados em meio mínimo contendo nada mais que ágar 1,5% como componente orgânico, inúmeras colônias são formadas, o que pode implicar a metabolização do ágar pelos microorganismos, ou a utilização de células mortas como fonte de carbono para subsidiar o crescimento microbiano (Figura 14). Não obstante, esse controle foi fundamental na identificação dos halos de degradação do óleo mineral, consistindo em uma evidência comparativa da presença destes. Todos os isolados plaqueados em meio mínimo com óleo mineral 1% que apresentaram halos de degradação deste ao redor de suas colônias foram registrados e, posteriormente, cultivados em culturas líquidas de meio mínimo contendo polietileno em pó 0,1% para determinar se também utilizariam esse polímero como fonte de carbono e energia.

Em virtude das características químicas e estruturais do polietileno, no que diz respeito à resistência à biodegradação, um dos grandes desafios foi desenvolver uma metodologia que permitisse selecionar os potenciais microorganismos degradadores desse polímero. Para minimizar esse problema relacionado à resistência contra o ataque microbiano e favorecer a ocorrência da biodegradação, utilizou-se o polietileno em pó em vez de filmes plásticos, objetivando-se aumentar a superfície de contato do material. Ademais, todo material utilizado no cultivo foi de vidro, a fim de garantir que, de fato, a única fonte de carbono presente seria o polietileno, evitando a interferência de outros plásticos no experimento, como o poliestireno de placas com poços ou o polipropileno de falcons. Para tanto, foi imprescindível uma limpeza adequada das vidrarias, com o

propósito de evitar quaisquer resíduos orgânicos vestigiais. Primeiramente, as vidrarias foram lavadas com SDS 10% e, após repetidas lavagens com água, duas vezes com etanol absoluto para solubilizar e eliminar o SDS remanescente. Em seguida, o material foi lavado o.n. com NaOH 0,5M, o que permite a remoção do carbono residual, e, após a retirada dessa base, esse foi sucessivamente lavado com água bidestilada e autoclavado.

Para o preparo dos meios mínimos segundo o protocolo descrito por Priedham e Gottlieb (Priedham & Gottlieb; 1948), foram utilizados reagentes novos e de alta pureza, destinados exclusivamente a essa finalidade. Como solvente, empregou-se água milli Q e, depois do preparo, os meios foram autoclavados ou filtrados em filtros millipore 0,22 μ m. Entretanto, em ambos os modos de esterilização observava-se a formação de precipitados, provavelmente em decorrência da formação de sais de fosfato insolúveis em água. Visando a contornar esse problema, manteve-se as culturas sob agitação suficiente para manter o meio de cultura constantemente homogêneo.

As células a serem cultivadas com o polietileno, inclusive seus controles negativos, foram inoculadas somente após a remoção dos nutrientes residuais do meio nutrient broth, visto que esses nutrientes poderiam atuar como subsistência das células, resultando na formação de falsos-positivos. Apesar de o meio de cultura mínimo ser previamente esterilizado, o mesmo não é possível para o plástico. Isso é devido à ocorrência de degradação térmica da molécula, que, além de gerar um viés para o experimento por facilitar a biodegradação, também implica a formação de compostos tóxicos para a célula (Hoff & Jacobsson, 1981; Hawley-Fedder *et al.*, 1984; Albertsson *et al.*, 1987; Albertsson *et al.*, 1991; Kaminsky *et al.*, 1996; Aracil *et al.*, 2004; Siddiqui & Redhwi, 2009; Sivan, 2011). Em virtude desse fato, a embalagem de polietileno em pó só era aberta no interior do fluxo laminar, para minimizar a probabilidade de ocorrência de contaminação microbiana, evitando interferências indesejadas no experimento.

Decorridos 12 dias de cultivo, as amostras foram testadas para avaliação de sua viabilidade celular após a depleção de carbono. A *rationale* do processo tem como base a estimativa do metabolismo microbiano a partir da purificação de seu RNA total, visto que a presença dessas

moléculas evidencia a atividade celular. Os RNAs são produzidos em resposta a determinadas condições momentâneas às quais a célula encontra-se exposta, regendo a adaptação metabólica a essas condições. Tratam-se de moléculas relativamente instáveis e, geralmente, são rapidamente degradadas após cumprirem suas funções, seja como transportador de aminoácidos para a síntese proteica, como molde para esta, ou como ribozimas. O objetivo desse desenho experimental é mensurar a biodegradação indiretamente por meio da extração do RNA total, visto que a síntese desse ácido nucleico representa a presença de atividade metabólica, sendo pré-requisito fundamental para esta.

O fato de algumas amostras não se apresentarem metabolicamente ativas reforça a idéia de que as ativas realmente possuem algum diferencial que as permita sobreviver nas condições apresentadas, o qual pode ser tanto a utilização do polietileno disponível no meio como fonte de carbono e energia, como a ativação de mecanismos de resistência à depleção de moléculas orgânicas (Matin *et al.*, 1989). Independente de qual seja esse diferencial, é certo que um microorganismo degradador de polietileno deve, necessariamente, apresentar-se ativo na presença deste. Assim, esse método mostra-se eficaz para selecionar as amostras a serem submetidas a ensaios analíticos de maior sensibilidade e precisão.

A confirmação da ocorrência de biodegradação desse plástico realizou-se por meio da análise da adesão microbiana ao filme de polietileno e da conseqüente viabilidade celular (Sivan *et al.*, 2006). Por ser uma metodologia laboriosa e demorada, a etapa precedente foi imprescindível, uma vez que seria inviável avaliar, para todos os 54 isolados degradadores de óleo mineral, a evolução da adesão e viabilidade pela análise em três diferentes períodos, além de seus respectivos controles negativos. Esse ensaio consistiu no cultivo dos isolados potencialmente degradadores de polietileno em frascos de vidro contendo meio mínimo com um filme de polietileno (Sivan *et al.*, 2006). Os períodos de análise foram escolhidos sabendo-se que sinais de degradação do polietileno eram observados, geralmente, após 16 dias de cultura (Sivan *et al.*, 2006). Assim, decorridos 12, 15 e 20 dias, realizou-se a análise de cada plástico após corá-los com os fluoróforos SYTO®9 e iodeto

de propídio, pelo kit Live/Dead BacLight Bacterial Viability (Invitrogen) (Sivan et al, 2006; Berney *et al.*, 2007). Esse método propiciou a avaliação simultânea da proporção entre viáveis e inviáveis e da dimensão da adesão microbiana na superfície desse material.

Os fluoróforos diferem pela sua habilidade em penetrar nas células, provavelmente por diferenças em suas solubilidades, de modo que, provavelmente por esse motivo, o solvente utilizado em ambos seja o DMSO, que dissolve tanto compostos polares quanto apolares. O fluoróforo verde, SYTO® 9, difunde-se livremente pelas membranas enquanto o fluoróforo vermelho, iodeto de propídio, penetra apenas em células com membranas danificadas, reduzindo o SYTO® 9 quando os dois estão presentes (O'Neill *et al.*, 2004; Laflamme *et al.*, 2004). Embora ocorra essa redução, muitas vezes observa-se a presença de ambos os fluoróforos na mesma célula, indicando que a redução não foi efetiva ou que ainda não ocorreu. Quando isso acontece, subentende-se que a célula esteja morta, visto que apenas neste caso o iodeto de propídio é capaz de penetrar na célula.

Assim, as 19 amostras, incluindo os controles modelos *B. subtilis* e *E. coli*, foram cuidadosamente analisadas, registrando-se sucessivas imagens representativas do material, a fim de descrevê-lo com fidelidade. Uma grande dificuldade nesse registro foi o ajuste do foco em um plano específico devido à tridimensionalidade do material, decorrente da espessura do filme sobre a lâmina e da presença de microorganismos em ambas as faces do plástico. Isso resultou a formação de alguns artefatos, relativos à fluorescência de células de outros planos focais. Apesar da edição das imagens, alguns artefatos não puderam ser eliminados sem que se perdesse informações relevantes das micrografias. Portanto, optou-se pela manutenção dos detalhes desta, mesmo que, porventura, apresentassem resquícios de artefatos. Desse modo, as imagens foram editadas na tentativa de reduzir a interferência desses artefatos e aumentar o contraste entre as células e o plano de fundo. A sobreposição das imagens registradas nos dois diferentes comprimentos de onda visou a facilitar a visualização espacial das células, favorecendo a identificação direta da proporção entre viáveis e inviáveis, de modo que, quando ambos os fluoróforos penetravam nas mesmas células, a imagem gerada pelo software era amarela, representando as células mortas, que, provavelmente,

não sofreram a redução do SYTO®9 pelo iodeto de propídio.

Para cada uma das amostras, foram realizados controles negativos sem fonte de carbono, os quais foram cultivados com uma lamínula a fim de simular a presença do filme de polietileno como substrato para a adesão microbiana. Os filmes plásticos e seus respectivos controles negativos foram analisados e registrados individualmente, para subsequente estudo comparativo. A finalidade desse experimento foi avaliar a evolução do comportamento microbiano diante dessas condições restritivas, observando-se a quantidade de células aderidas e a proporção entre as mortas e vivas ao longo do tempo. Porém, para que se possa fazer qualquer inferência a respeito da biodegradação, são necessários os controles negativos, para ilustrar como seria o comportamento das células na ausência do polietileno, permitindo estimar o impacto da presença deste para as culturas de microorganismos.

Sabe-se que a adesão está intimamente relacionada às interações eletrostáticas entre as células e a superfície (Rosemberg *et al.*, 1980). Com o intuito de obter-se uma análise geral a respeito da influência dessas interações para a adesão, avaliaram-se, inclusive, variações quanto à superfície externa de gram positivos e gram negativos, utilizando-se como padrões os microorganismos *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente. O objetivo dessa comparação foi estimar o impacto dessas variações sobre a adesão, considerando-se o invólucro de peptidoglicano, ácidos teicóicos e glicoproteínas das gram positivas, em contraste à membrana externa da parede celular de gram negativos. Assim, é estabelecida uma relação entre a ocorrência de adesão por meras interações eletrostáticas, as quais são independentes do metabolismo microbiano, e a ocorrência desta como resposta a situações de estresse nutricional na tentativa de revertê-lo.

Nos controles negativos, foi observado que algumas células apresentavam-se viáveis mesmo após a restrição de carbono. Hipotetiza-se que, com a morte e lise de células, seus conteúdos celulares extravasados no meio, ou até mesmo toda a estrutura celular remanescente, servem como nutrientes para a manutenção e o crescimento de microorganismos ainda viáveis. Nas culturas de *E. coli* é importante observar a presença de relevante fração de células vivas em ambos os cultivos

com e sem polietileno, o que pode ser explicado pelo seu clássico mecanismo de resistência à depleção de carbono, ou *carbon starvation*, que envolve a expressão de 40 a 80 genes que o ativam e potencializam, culminando na atuação de proteínas relacionadas ao estresse. Essas proteínas protetoras, provavelmente, coordenam o resgate de macromoléculas danificadas, que fornecem a subsistência basal necessária à manutenção celular (Matin, 1991).

No geral, observa-se que, nos cultivos dos potenciais degradadores de polietileno com filmes desse polímero, os microorganismos viáveis são aqueles aderidos diretamente ao plástico. Paralelamente, os biofilmes formados apresentam uma proporção de células mortas bastante superior em relação às células vivas. Ambos os fatos sustentam a ocorrência de biodegradação do material.

Ao investigar-se as características apresentadas pelas culturas dos padrões, *E. coli* e *B. subtilis*, observa-se a ocorrência de algumas particularidades. Em *B. subtilis*, apesar de a adesão ao polietileno ser aparentemente mais efetiva que à lamínula, não houve alteração significativa na viabilidade celular em decorrência da presença de polietileno, visto que a proporção entre mortas e vivas em ambos os ensaios se manteve constante. No entanto, nota-se que o efeito do tempo para as culturas foi expressivo, pois a proporção de células mortas aumentou significativamente ao longo deste. Por sua vez, não se observou diferenças relevantes no grau de adesão das células para as culturas de *E. coli* e seus controles negativos, o qual não se apresentou constante entre as amostras. Em contraste, percebe-se que para as análises após 12 dias de cultivo, a presença de polietileno parece prejudicar a viabilidade celular ao comparar-se com o controle negativo, que encontra-se bastante colonizado pela bactéria, além de apresentar um elevado grau de viabilidade celular. Importante ressaltar o mecanismo de resistência à depleção de carbono da espécie, visando a justificar a massiva presença de células vivas colonizando a lamínula (Matin, 1991). O impacto temporal na cultura dessas bactérias também se mostrou efetivo a partir de 15 dias de cultivo, visualizando-se grande porção de células inviáveis.

Os isolados foram identificados como representantes de quatro diferentes gêneros:

Comamonas sp., *Alcaligenes sp.*, *Delftia sp.* e *Stenotrophomonas sp.*, sendo os resultados da avaliação de ocorrência de biodegradação de polietileno bastante variáveis entre estes e dentro destes. Há relatos na literatura sobre a degradação de polietileno por *Delftia tsruhatensis*, no entanto, este fenótipo ainda não foi descrito para os outros gêneros identificados (Smits et al., 1999; Yoon et al., 2012). Apesar disso, já foram encontradas alceno hidroxilases, enzimas especializadas na catalização da primeira etapa do processo de degradação de alcanos, em *Stenotrophomonas maltophilia* e *Comamonas testosteronii*. Isso fornece suporte para concluir-se que, pelo menos os representantes desses três grupos, sejam prováveis degradadores de polietileno. Em relação às amostras prospectadas, diversos aspectos ressaltam aos olhos, ensejando cuidadosa análise e reflexão.

O primeiro grande destaque por apresentar fortes evidências de ser uma bactéria biodegradadora de polietileno é a amostra PE 63, identificada como pertencente ao gênero *Comamonas*, provavelmente da espécie *Comamonas testosteroni*. O gênero é composto por bastonetes gram negativos, com motilidade flagelar e não-esporulantes integrantes do filo *Proteobacteria* (Zhang et al., 2013). Essas bactérias já são descritas por apresentarem conhecido mecanismo de degradação de compostos aromáticos, como tereftalato, vanilato, hidroxibenzoato e ftalatos (Sasoh et al., 2006), etanol (Jong et al., 2008), poliuretano (Nakajima-Kambe et al., 1995; Shima, 2011; Usha et al., 2011), óleo mineral (Smit et al., 1999) entre outras. Com isso, entende-se que o gênero apresenta grande potencial metabólico no que diz respeito à biorremediação de ambientes naturais e urbanos e à exploração de seu potencial biotecnológico. De acordo com a Figura 23, é notória a diferença entre a viabilidade do isolado PE 63 quando em presença ou ausência de polietileno. Apenas uma baixíssima fração de células mortas são encontradas aderidas ao polietileno, em contraste à elevada fração destas quando na ausência do polímero sintético, muito embora a adesão seja efetiva em ambos os casos. Observa-se claramente a grande e permanente viabilidade celular ao longo do cultivo com polietileno, contrastando com os controles, que entram em uma notória fase de declínio ao longo dos 20 dias. Tendo em vista a existência de alceno

hidroxilases descrita para espécies do gênero, pode-se afirmar com certa confiabilidade que esse isolado é, de fato, um biodegradador.

Os isolados PE 79, PE 138, PE 154, PE 157, PE 162, PE 171 e PE 186 foram identificados como *Delftia tsuruhatensis*, bacilo gram negativo da família *Comamonadaceae*, filo *Proteobacteria*. Cabe ressaltar que essa espécie já foi descrita como biodegradadora de polímeros sintéticos (Yoon *et al.*, 2012). Apesar disso, seus resultados quanto à viabilidade celular no cultivo restrito com polietileno foram bastante divergentes. O isolado PE 79, embora tenha se apresentado em uma aparente fase de declínio ao longo do tempo, encontra-se ativo quando aderido diretamente ao plástico. Isso pode ser um indício para a biodegradação de polietileno, no entanto, não é possível inferir nenhuma conclusão a partir das imagens obtidas. Para isso, análises mais sensíveis e específicas são necessárias. Semelhantemente, o PE 154 torna-se progressivamente inviável com o passar dos dias, atingindo alto grau de mortalidade celular em 20 dias, fornecendo indícios de que não há uma revelante presença de metabolização do plástico, visto que isso teria impacto no metabolismo microbiano.

Ainda que sejam membros da mesma espécie bacteriana dos isolados PE 79 e PE 154, ainda considera-se como possibilidade a biodegradação do polietileno pelo PE 162. Afirma-se isso devido à grande colonização do plástico e viabilidade das bactérias a este aderidas, sem, no entanto, apresentar número elevado de células mortas nos controles. Isso indica uma incerteza quanto ao mecanismo de sobrevivência desses organismos nessas condições: podem estar degradando o polímero ou ativando mecanismos de resistência à restrição em moléculas orgânicas. De modo semelhante, o PE 157 também apresenta fortes indícios de biodegradação de polietileno. A evolução do cultivo do controle negativo encontra-se em uma progressiva morte celular, diferentemente da amostra cultivada com polietileno. Em adição, observa-se que o isolado PE 186 apresenta grande contraste quantitativo entre as células mortas dos cultivos com polietileno ou lamínula. Isso pode indicar que, como a única diferença entre as culturas está na presença ou não do polímero, é justamente esta que está influenciando a manutenção da viabilidade celular. Analisando-se as

imagens referentes ao cultivo desse isolado ao longo dos 20 dias, observa-se que não há alteração significativa entre a proporção de viáveis e inviáveis aderidos ao polietileno, de modo que esta é muito inferior àquela, opostamente ao percebido para as células do controle, onde as células inviáveis estão em elevado número. A fim de tornar a variabilidade de fenótipos para essa mesma espécie ainda mais acentuada, esses fenótipos positivos contrastam com a incerteza relacionada ao cultivo de PE 171. De acordo com a figura A5, não é possível realizar-se inferências acerca da presença ou não de degradação de polietileno, visto que não observam-se diferenças significativas entre o teste e o controle. Por fim, a adesão do isolado PE 138 ao polietileno mostra-se expressiva quando comparada à adesão à lamínula e, além disso, sua proporção entre células viáveis e inviáveis é nitidamente superior. Nota-se que as células viáveis aumentam quantitativamente ao longo do tempo, representando a adequação das células às condições de cultivo e à fonte de carbono disponível. Com isso, afirma-se que existe grande probabilidade de que o PE 138 seja degradador desse polímero sintético, qualificando-se como um promissor micro-organismo biodegradador.

O último gênero identificado entre os isolados potencialmente degradadores de polietileno é *Stenotrophomonas*, composto por bactérias gram negativas, sendo pertencentes a este as amostras PE 298, PE 299, PE 327, PE 328, PE 338, PE 343, PE 344, PE 349 e PE 591. De maneira semelhante ao observado para *Delftia sp.*, houve grande variação entre os isolados quanto ao fenótipo relacionado à biodegradação do plástico. Porém, de modo geral, grande parte dos isolados referentes a esse gênero apresentou-se como positivos para esse fenótipo. Dentre estes estão o PE 298, PE 299, PE 328, PE 338, PE 343, PE 349 e PE 591, excetuando-se desse grupo apenas o isolado PE 327. Há inúmeros relatos na literatura sobre aplicações relativas à biorremediação realizada por *Stenotrophomonas sp.*, incluindo compostos aromáticos, clorados e resíduos petroquímicos (Boonchan *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Papizadeh *et al.*, 2011; Cerqueira *et al.*, 2012; Mukherjee & Roy, 2012). O presente trabalho agrega mais uma promissora atividade biorremediadora ao gênero: biodegradação de polietileno.

De acordo com as Figuras A7 e A10, observa-se que os isolados PE 298 e PE 328

apresentam baixa proporção de células inviáveis em relação às células viáveis, que colonizam integralmente o filme, o que se mantém ao longo dos 20 dias. O controle se contrapõe a esse fato, visto que ocorre uma explícita morte progressiva com o decorrer dos dias. Tal observação torna-se ainda mais evidente para as amostras PE 338, PE 343, PE 349 e PE 591, representadas pelas Figuras A11 - A13 e Figura 25, respectivamente, que não apenas mantiveram a viabilidade no cultivo com o polietileno ao longo desse período, como também apresentaram significativo número de células viáveis aderidas ao polietileno. Seu controle também revela massiva morte celular conforme o decurso dos dias, corroborando para sua classificação como provável degradador de PE. Entretanto, apesar dessa aparente capacidade biodegradadora dos isolados citados acima, o PE 299 e o PE 327 não apresentaram resultados satisfatórios no que diz respeito a essa capacidade. Isso porque não está clara a manutenção da viabilidade ao longo do tempo, e, portanto, não se pode inferir essa atividade degradadora. Uma possível solução seria cultivá-las por um maior período, a fim de assegurar se o efeito do tempo é favorável ou deletério.

Com base nos resultados encontrados, foi possível observar que, curiosamente, os 9 microorganismos potencialmente degradadores de polietileno, pertencentes aos três diferentes gêneros, tratam-se de bactérias gram negativas. De fato, era esperado obter-se uma variedade de bactérias degradadoras superior à de fungos, visto que foram utilizados mais meios de cultura específicos para o isolamento daqueles. Finalmente, conclui-se que aproximadamente 1,4% do total de microorganismos isolados e preservados, o que corresponde a 647 microorganismos, foram identificados como potenciais biodegradadores de polietileno. Isso qualifica esses isolados para posteriores análises em espectroscopia de infra-vermelho a fim de estimar diretamente a degradação desse material em termos quantitativos.

7.1 ANÁLISE DO GENOMA DE *Alcaligenes sp.*

O isolado PE 187, identificado como o bacilo gram negativo *Alcaligenes sp.*, teve o seu genoma completo seqüenciado a fim de avaliar-se a presença de genes que possam estar

relacionados à biodegradação e à depleção de carbono. Apesar de não se apresentar como um explícito biodegradador de polietileno, visto que observou-se viabilidade no controle negativo, o gênero está relacionado a características importantíssimas para o processo de biorremediação, entre essas a degradação de diversos alcanos, óleo cru, compostos aromáticos e clorados, como fenol, 1,4-diclorobenzeno, ácido 2,4-diclorofenoxiacético e tricloroetileno (Schraa *et al.*, 1986; Harker & Kim, 1990; Lal & Khanna, 2008; Kumar *et al.*, 2013). Isso agrega grande interesse biotecnológico ao micro-organismo, tendo em vista sua versatilidade no contexto da sustentabilidade. Além da resistência à depleção de carbono pela ativação de genes de resposta ao estresse, outro importante mecanismo é a síntese e degradação do polímero PHB (polihidroxibutirato). Existem relatos na literatura sobre a síntese de polihidroxibutirato despolimerase por *A. Faecalis* (Saito *et al.*, 1989; Marin, 1991; Schultz & Marin, 1991). É importante mencionar esse fato porque é justamente pela degradação dessa molécula estocada em vesículas no meio intracelular que a célula consegue manter-se viva durante os períodos de carência nutricional. Tendo em vista o desconhecimento da existência ou não desse ou de outros mecanismos de resistência a essa depleção em relação a essa bactéria, investigou-se seu genoma a fim de identificar-se genes relacionados a esses mecanismos, objetivando-se explorar essa novidade científica a fim de identificar os mecanismos de sobrevivência da espécie nessas condições.

Com o intuito de investigar a presença de genes de interesse no genoma de *A. faecalis*, sequências codificadoras de diferentes proteínas e enzimas constantes de bancos de dados serviram como input para essa busca, que se realizou por meio do software RAST. Entre os genes investigados estão os relacionados à depleção de carbono, à biodegradação de compostos aromáticos e de óleo mineral, além dos relacionados à degradação de polímeros sintéticos, até então descritos na literatura, como alcano hidroxilases, lacases, peroxidases e policaprolactona desidrogenase.

De fato, encontrou-se dois possíveis mecanismos de *carbon starvation* presentes: genes relacionados à síntese e degradação de polihidroxialcanoatos e polihidroxibutiratos, e genes

relacionados à resposta ao estresse pela depleção de carbono. Essa resposta é iniciada por meio de mecanismos de quorum sensing, que induzem a expressão da subunidade sigma s da RNA polimerase, responsável pela ativação de genes relacionados a essa situação de estresse (Huisman & Kolter, 1994). Essa pode ser uma possível explicação para a sobrevivência das células após longos períodos sem fontes de carbono, o que ainda não refuta a possibilidade de ocorrência da biodegradação de polietileno, visto que, mesmo após 20 dias, as micrografias apresentaram uma grande proporção de células viáveis em relação às inviáveis, diferentemente do observado no controle (Figura 24).

Diversos compostos aromáticos apresentaram mecanismos para sua degradação explicitados no genoma do isolado PE 187, entre eles o fenol, o catecol, o tolueno, o quinato, o benzoato, o p-hidroxibenzoato, o bifenil, aromáticos heterocíclicos e cloroaromáticos. Isso confere a essa bactéria uma particular importância biotecnológica, dada a infinidade de aplicações possíveis para esse fenótipo, entre estas a biorremediação de ecossistemas após contaminação com agrotóxicos. Algumas seqüências conservadas de genes *alkB*, que codificam alcano hidroxilases, foram comparadas ao genoma, mas não o gene em questão não foi encontrado. Apesar disso, o isolado apresentou fenótipo de degradação do óleo mineral, além de existir embasamento bibliográfico da degradação de alcanos por microorganismos desse gênero (Lal & Khanna, 1996), indicando que outros genes devam estar relacionados a esse processo para o isolado.

Foram encontrados genes relacionados à degradação de lignina, molécula bastante complexa cuja degradação geralmente é relacionada à degradação de polímeros sintéticos, em virtude dessa complexidade (Sivan, 2011). Isso consiste em um indício de ocorrência de biodegradação dos polímeros sintéticos, particularmente o polietileno. Além disso, a presença desses genes confere mais um expressivo interesse biotecnológico para esse microorganismo, em decorrência da importância das enzimas codificadas por esses genes na otimização da produção de biocombustíveis. Etanol e outros biocombustíveis são produzidos a partir da biomassa vegetal, no entanto, a presença de lignina impõe um relevante obstáculo na quebra dos polissacarídeos de

parede celulares a açúcares simples, e a subsequente conversão destes a combustíveis. Nesse sentido, o isolamento de enzimas capazes de degradar esses compostos que impedem essa produção são muito promissores, emergindo como um alvo recorrente na indústria de biocombustíveis (Weng *et al.*, 2008).

Ainda com relação à biodegradação de polietileno, também foram localizados 4 genes de peroxidases, que poderão ser posteriormente investigados a fim de obter-se maiores informações sobre seus possíveis substratos e efeitos degradativos em relação a esse polímero. Com esses dados, é possível obter-se análises preliminares a respeito da vasta gama de possíveis aplicações biotecnológicas existentes para o microorganismo *Alcaligenes sp.* isolado no presente trabalho . Nesse contexto, genes relacionados à biorremediação e às aplicações biotecnológicas encontrados nesse genoma serão amplificados e clonados em cepas e vetores para super-expressão, a fim de acessar o grande potencial desse isolado.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As técnicas de cultivo, apesar de apresentarem limitações, ainda são estratégias promissoras para acessar o potencial microbiológico existente nas mais diferentes amostras. Essa técnica mostrou-se bastante eficaz no sentido de isolar microorganismos para posterior prospecção. A partir de sucessivas etapas de triagem é possível restringir progressivamente o número de possíveis candidatos.

Utilizando-se a metodologia inovadora apresentada pelo presente trabalho, foi possível isolar, identificar, preservar e selecionar microorganismos potencialmente degradadores de polietileno, atingindo-se, assim, os objetivos propostos. Importante ressaltar que essa metodologia pode ser extrapolada para virtualmente todos os polímeros sintéticos, termoplásticos ou não.

Com base nas análises comparativas é possível concluir que 9 dos 647 isolados - PE 63, PE 138, PE 157, PE 298, PE 328, PE 338, PE 343, PE 349 e PE 591 - identificados como pertencentes aos gêneros *Comamonas sp.*, *Delftia sp.* e *Stenotrophomonas sp.*, respectivamente, são prováveis biodegradadores do polímero sintético em questão. Até então, não existem relatos na literatura envolvendo dois dos três gêneros identificados, *Comamonas* e *Stenotrophomonas*, a processos degradativos relacionados a plásticos, o que destaca o caráter original dos resultados. Em adição, existem fortes evidências bibliográficas que dão suporte aos resultados encontrados. Tendo em vista a existência de relatos na literatura que associam o gênero *Delftia* à biodegradação de polietileno, comprova-se que a metodologia proposta é capaz de selecionar biodegradadores desse polímero sintético. Por sua vez, não há relatos envolvendo os gêneros *Stenotrophomonas* e *Comamonas* a esses processos degradativos. No entanto, estes são reportados por estarem relacionados à degradação de óleo mineral, o que fornece suporte para os dados encontrados nesse trabalho. Já que ambos o óleo mineral e o polietileno são quimicamente semelhantes, pode-se afirmar que existe um grande potencial dos isolados degradadores de óleo mineral em também degradar o polietileno. Com isso, é possível afirmar que, de fato, foram encontrados dois novos gêneros potencialmente biodegradadores de polietileno.

Ademais, o presente trabalho subsidiará estudos posteriores, a fim de investigar os efeitos abióticos na biodegradação, a expressão gênica relacionada a esse metabolismo e as rotas metabólicas envolvidas nesse processo. Consecutivamente, esforços serão concentrados no sentido de isolar enzimas ou complexos enzimáticos para posteriores ensaios *in vitro* e *in silico*. Como produto final, as enzimas isoladas servirão como *input* em subprojetos de engenharia de proteínas objetivando a otimização de propriedades enzimáticas desejadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alauddin M, Choudkury I A, Baradie M A, Hashmi M S J. 1995. Plastics and their machining: a review. *Materials Processing Technology* 54:40–46.
- Albertsson A C., Andersson S. O. & Karlsson S. 1987. The Mechanism of Biodegradation of Polyethylene. *Polymer Degradation and Stability* 18:73-87.
- Albertsson A C., Karlsson S. 1990. The influence of biotic and abiotic environments on the degradation of polyethylene. *Progress in Polymer Science* 15:177-192.p
- Albertsson A C. And Karlsson S. 1993. Aspects of biodeterioration of inert and degradable polymers. *International Biodeterioration & Biodegradation* 31:161-170.
- American Chemical Society Homepage (ACS) <<http://portal.acs.org/portal/acs/corg/content>>. “The Foundation of Polymer Science by Hermann Staudinger”. Acesso em 20 de janeiro de 2012.
- Aracil I, Font R, Conesa J A. 2005. Semivolatile and volatile compounds from the pyrolysis and combustion of polyvinyl chloride. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 74:465–478.
- Artham T, Doble M. 2008. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular Bioscience* 8:14-24.
- Arutchelvi J, Sudhakar M, Arkatkar A, Doble M, Bhaduri S, Uppara P V. 2008. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology* 7:9-22.
- Augusta J, Müller R J, Widdecke H. 1992. Biologisch abbaubare Kunststoffe: Testverfahren und Beurteilungskriterien. *Chemie Ingenieur Technik* 64:410–5.
- Bandopadhyay D, Panda A B, Pramanik P. 2001. Surface modification of LDPE film by chemical processes with Ni²⁺ and ammonium persulfate. *Journal of applied polymer science* 82(2):406-415.
- Bassett D C. 1981. *Principles of Polymer Morphology – Cambridge Solid State Science Series*.
- Belhaj A, Desnoues N, Elmerich C. 2002. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa*

- strains isolated from a polluted zone: identification of *alkB* and *alkB*-related genes. *Research in Microbiology* 153(6):339-44.
- Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann H U, Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied Environmental Microbiology* 73: 3283–3290.
- Boonchan S, Britz M L, Stanley G A. 2000. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering* 59(4):482–494.
- Bottomley P J. 1993. Microbial activity in soil. *Current Opinion in Biotechnology* 4:318-322.
- Cerqueira V S, Maboni F, Camargo F A O, Peralba M C R, Bento F M. 2012. Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28(3):1203-1222.
- Chandra R, Rustgi R. 1998. Biodegradable Polymers. *Progress in Polymer Science* 23:1273–1335.
- Clift, R. 1997. Clean technology—The idea and practice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 68:347–350.
- Chatterjee S, Roy B, Roy D, Banerjee R. 2010. Enzyme-mediated biodegradation of heat treated commercial polyethylene by *Staphylococcal* species. *Polymer Degradation and Stability* 95:195-200.
- Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols* 1(2)581-585.
- Chomczynski P. 1992. Solubilization in formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Research* 20:3791-3792.
- Cooper G D, Prober M. 1960. The action of oxygen corona and of ozone on polyethylene. *Journal of Polymer Science* 44:397-409.

- DeSantis T Z, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie E L, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen G L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied Environmental Microbiology* 72(7):5069-5072.
- Doi Y, Kanesawa Y, Kawaguchi Y, Knuioka M. 1989. Hydrolytic degradation of microbial poly (hydroxyalkanoates). *Makromolekulare Chemie Rapid Communications* 10:227.
- Dommergues Y, Mangenot F. 1972. *Ecologie Microbienne du Sol*. Masson & Cie, Paris.
- Eggins H O W, Oxley T A. 2001. Biodeterioration and biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 48:12–15.
- Feldgarden M, Riley M A. 1999. The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12. *Evolution* 53(4):1019-27
- Fisher M. 2003. Plastics recycling. In *Plastics and the environment* (ed. A. Andrady), pp. 563–627. Hoboken, NJ: Wiley Interscience.
- Floriana Perugini, Mastellone M L, Arena U. 2005. Mechanical and Feedstock Recycling Options for Management of Plastic Packaging Wastes. *Environmental Progress* 24(2):137–154.
- Foerch R, McIntire N S, Hunter D H. 1990. Modification of Polymer Surfaces by Two-step Plasma Sensitized Reactions. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* 28:803-809.
- Gavrilov N, Yakusheva D, Kondyurin A. 1998. Structure of Polyethylene After Pulse Ion Beam Treatment. *Journal of Applied Polymer Science* 69:1071-1077.
- Gilan I, Hadar Y, Sivan A. 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65:97–104.
- Griffin G J L. 1974. Biodegradable Fillers in Thermoplastics. *Advances in Chemistry Series* 134:159-170.
- Gu J. 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52(2):69-91
- Hadad D, Geresh S and Sivan A. 2005. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic

- bacterium *Brevibacillus borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1093–1100
- Hamid S H, Amin M B, Maadhah A G. 1992. *Handbook of Polymer Degradation*. Editors, Marcel Decker, New York.
- Harker A R, Kim Y. 1990. Trichloroethylene degradation by two independent aromatic-degrading pathways in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Applied Environmental Microbiology* 56(4):1179-1181.
- Hawley-Fedder R A, Parsons M L, Karasek F W. 1984. Products obtained during combustion of polymers under simulated incinerator conditions. *Journal of Chromatography* 314:263-273.
- Hoff A, Jacobsson S. 1981. Thermo-oxidative degradation of low-density polyethylene close to industrial processing conditions. *Journal of Applied Polymer Science* 26: 3409–3423.
- Hopewell J, Dvorak R, Kosior E. 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of Royal Society serie B* 364:2115–2126.
- Huisman G W, Kolter R. 1994. Sensing starvation: a homoserine lactone--dependent signaling pathway in *Escherichia coli*. *Science*. 265(5171):537-9.
- Iiyoshi Y, Tsutsumi Y, Nishida T. 1998. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. *Journal of wood science* 44(3):222-229.
- Itävaara M, Vikman M. 1995. A simple screening test for studying biodegradability of insoluble polymers. *Chemosphere* 31(11112):4359-1373.
- Jong G A H, Geerlog A, Stoorvogel J, Jongejan J A, Vries S, Duine J A. 2008. Quinohaemoprotein Ethanol Dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *European Journal of Biochemistry* 230(3):899 - 905.
- Kaminsky W, Schlesselmann B, Simon C M. 1996. Thermal degradation of mixed plastic waste to aromatics and gas. *Polymer Degradation and Stability* 53:189-197.
- Karlsson S, Albertsson, A-C. 1990. The biodegradation of a biopolymeric additive in building materials. *Materials & Structure, RILEM*, 23:352.
- Karlsson S, Banhidi Z G, Albertsson A-C. 1988. Detection by high-performance liquid

- chromatography of polyamines formed by clostridial putrefaction of caseins. *Journal of Chromatography* 442:267.
- Kawai F. 1995. Breakdown of plastics and polymers by microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 52:151–94.
- Kefeli A A, Razumovskii S D, Zaikov G Y. 1971. Interaction of polyethylene with ozone. *Polymer Science USSR* 13(4): 904-911.
- Kumar A, Bhunia B, Dasgupta D, Mandal T, Dey A, Datta S, Bhattacharya P. 2013. Optimization of culture condition for growth and phenol degradation by *Alcaligenes faecalis* JF339228 using Taguchi Methodology *Desalination and Water Treatment* 51(16-18):3153-3163.
- Pavia D L, Lampman G M, Kriz G S. 1988. *Introduction to Organic Laboratory Techniques*. 3rd Ed. Fort Worth, TX: Saunders; 1988.
- Laflamme C, Lavigne S, Ho J, Duchaine C. 2004. Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *Journal of Applied Microbiology* 95(4):684-692.
- Lal B, Khanna S. 2008. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Journal of Applied Bacteriology* 81(4):355–362.
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow, M. (ed) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, pp 115-175
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21):2947-2948.
- Léa Lopes. 2007. *Evolução dos Materiais Poliméricos*. 1º Semana de Polímeros IMA/UFRJ. <http://www.ima.ufrj.br/uploads/2010/01/30/evolucao-dos-materiais-polimericos_2.pdf>.
- Lee B, Pometto A L, Fratzke A, Bailey T B. 1991. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by phanerochaete and streptomyces species. *Applied and environmental microbiology* 57(3):678-85.
- Lee E Y, Jun Y S, Cho K S, Ryu H W. 2002. Degradation Characteristics of Toluene, Benzene,

- Ethylbenzene, and Xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. Journal of the Air & Waste Management Association 52(4).
- Lee SY. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering 49:1–14.
- Liyoshi Y, Tsutsumi Y, Nishida T. 1998. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. Journal of Wood Science 44:222-229.
- Lucas N, Bienaime C, Belloy C, Queneudec M, Silvestre F, Nava-Saucedo J E. 2008. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. Chemosphere 73:429–442.
- Matin A, Auger A E, Blum P H, Schultz J E. 1989. Genetic Basis of Starvation Survival in Nondifferentiating Bacteria. Annual Review of Microbiology 43: 293-314.
- Matin A. 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 5(1):3–10.
- Meinel G, Peterlin A. 1970. Plastic Deformation of Polyethylene. I. Change of Morphology During Drawing of Polyethylene of High Density. Journal of Polymer Science PART A-2 8:1723-1740.
- Meinel G, Peterlin A. 1971a. Plastic Deformation of Polyethylene II. Change of Mechanical Properties during Drawing. Journal of Polymer Science PART A-2 9:67-83.
- Meinel G, Peterlin A. 1971b. Plastic deformation of polyethylene - III. Mechanical properties and morfology of drawn low density polyethylene. European Polymer Journal 7:657—670.
- Mukherjee P, Roy P. 2012. Identification and Characterisation of a Bacterial Isolate Capable of Growth on Trichloroethylene as the Sole Carbon Source. Advances in Microbiology 2:284-294
- Müller R J, Kleeberg I, Deckwer W D. 2001. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. Journal of Biotechnology 86:87–95.
- Müller R J. 2003. Biodegradability of Polymers: Regulations and Methods for Testing. Biopolymers Online.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and chareacterization of a

- bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiology Letters 129: 39-42
- Nam Y-D, Seo M-J; Lim S-I, Lee S-Y. 2012. Genome sequence of *Lysinibacillus boronitolerans* F1182, isolated from a traditional Korean fermented soybean product. Journal of bacteriology 194(21):5988.
- Nowak B, Pajak J, Drozd-Bratkowicz M, Rymarz G. 2011. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. International Biodeterioration & Biodegradation 65:757-767.
- Ojumu TV, Yu J, Solomon BO. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. African Journal of Biotechnology 3:18–24.
- O'Neill A J, Miller K, Oliva B, Chopra I. 2004. Comparison of assays for detection of agents causing membrane damage in *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54 (6):1127-1129.
- Papizadeh M, Ardakani M R, Motamedi H, Rasouli I, Zarei M. 2011. *C–S Targeted Biodegradation of Dibenzothiophene by Stenotrophomonas sp. NISOC-04. Applied Biochemistry and Biotechnology 165(3-4):938-948.*
- Pelmont J, 1995. Enzymes. Catalyseurs du monde vivant. EDP Sciences, Les Ulis.
- Pospisil J, Nespurek S. 1997. Highlights in chemistry and physics of polymer stabilization. Macromoleculas Symposia 115:143–63.
- Pridham TG, Gottlieb D. 1948. The Utilization of Carbon Compounds by Some Actinomycetales as an Aid for Species Determination. Journal of bacteriology 56(1):107-14.
- Randall L P, Woodward M J. 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. Research in Veterinary Science 72(2):87–93.
- Razumovskii S D, Zaikov G Y. 1982. Effect of ozone on saturated polymers. Review*. Polymer Science USSR 24(10):2305-2325.
- Rosenberg M, Gutnick d, Rosenberg E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple

method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9(1): 29-33

Rothberg J M, Hinz W, Rearik E T M. 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475(7356):348-52.

Saadoun I, Alawawdeh M, Jaradat Z, Ababneh Q. 2008. Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil on diesel and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (alkB) by PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2191-2198.

Saito T, Suziki K, Yamamoto J, Fukui T, Miwa K, Tomita K, Nakanishi S, Odani S, Suzuki J, Ishikawa K. 1989. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Bacteriology* 171(1):184-189.

Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sakharovski V V, Nikitin D L, Sakharovski V G. 1999. Physiological characterization of the survival of some gram negative bacteria under conditions of carbon deficiency. *Applied Biochemistry and Microbiology* 35:380-388.

Smits T H, Röthlisberger M, Witholt B, van Beilen J B. 1999. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. *Environmental Microbiology* 1: 307-317.

Sanin S L, Sanin F D, Bryers J D. 2003. Effect of starvation on adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38:909-918.

Sasoh M, Masai E, Ishibashi S, Hara H, Kamimura N, Miyauchi K, Fukuda M. 2006. Characterization of the Terephthalate Degradation Genes of *Comamonas* sp. Strain E6. *Applied Environmental Microbiology* 72(3):1825–1832.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley

- BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75 (23):7537-7541.
- Schimieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27(6):863-4.
- Schraa G, Boone M L, Jetten M S, Neerven A R, Colberg, Zehnder A J. 1986. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Alcaligenes* sp. strain A175. *Applied Environmental Microbiology* 52(6):1374-1381.
- Siddiqui M N, Redhwi H H. 2009. Pyrolysis of mixed plastics for the recovery of useful products. *Fuel Processing Technology* 90:545–552.
- Siddiqui M N. 2009. Conversion of hazardous plastic wastes into useful chemical products. *Journal of Hazardous Materials* 167:728–735.
- Sivan A, Szanto M, Pavlov V. 2006. Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72:346–352.
- Sivan A. 2011. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology* 22:422–426.
- Shah A A, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances* 26: 246–265.
- Shard A G, Badyal J P S. 1992. Surface oxidation of Polyethylene, Polystyrene and PEEK: The Synton Approach. *Macromolecules* 25:2053-2054.
- Shimao M. 2001. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology* 12:242–7.
- Schultz J E, Matin A. 1991. Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 218(1)5:129–140.
- Song J H, Murphy R J, Narayan R, Davies G B H. 2009. Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical Transactions of Royal Society serie B*

364:2127–2139.

- Spear L B, Ainley D G, Ribic C A. 1995. Incidence of plastic in seabirds from the tropical Pacific 1984-91: Relation with distribution of species, sex, age, season, year and body weight. *Marine Environmental Research* 40: 123-141.
- Sperling L H. 2006. *Introduction to Physical Polymer Science*. ISBN 0-471-70606-X Copyright © 2006 by John Wiley & Sons, Inc.
- Secchi E R, Zarzur S. 1999. Plastic debris ingested by a Blainville's beaked whale, *Mesoplodon densirostris*, Washed ashore in Brazil. *Aquatic Mammals* 25(1): 21-24.
- Steinbüchel A. 1992. Biodegradable Plastics. *Current Opinion in Biotechnology* 3:291-297.
- Sudesh K, Abe H, Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* 25:1503-1555.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731—2739.
- Teuten E L, Saquing J M, Knappe D R U, Barlaz M A, Jonsson S, Björn A, Rowland S J, Thompson R C, Galloway T S, Yamashita R, Ochi D, Watanuki Y, Moore C, Viet P H, Tana T S, Prudente M, Boonyatumanond R, Zakaria M P, Akkhavong K, Ogata Y, Hirai H, Iwasa S, Mizukawa K, Hagino Y, Imamura A, Saha M, Takada H. 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of Royal Society serie B* 364:2027-2045.
- Thompson R C, Swan S H, Moore C J, Saal F S. 2009. Our Plastic Age. *Philosophical Transactions of Royal Society serie B* 364:1973–1976.
- Tsuchii A, Suzuki T, Fukuoka F. 1980. Microbial degradation of polyethylene oligomers. *Report of the Fermentation Research Institute* 55:10.
- Usha R, Sangeetha T, Palaniswamy M. 2011. Screening of Polyethylene Degrading Microorganisms from Garbage Soil. *Libyan Agriculture Research Center Journal International* 2(4):200-

204.

- Vona I A, Costanza J R, Cantor H A, Roberts W J. 1965. *Manufacture of Plastics*, vol. 1. New York: Wiley. p. 141–2.
- Weidenmaier C, Peschel A. 2008. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology* 6:276–287.
- Williams P T, Williams E A. 1999. Interaction of Plastics in Mixed-Plastics Pyrolysis. *Energy & Fuels* 13:188–196.
- Witt U, Muller R J, Deckwer W D. 1997. Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance. *Journal of Environmental Polymer Degradation* 15:81–9.
- Thompson R C, Swan S H, Moore C J, vom Saal F S. 2009. Our Plastic Age. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B Biological sciences* 364(1526):1973–6.
- Tokiwa Y, Calabia B P. 2004. Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters* 26:1181–9.
- Yamada-Onodera K, Mukumoto H, Katsuyaya Y, Saiganji A, Tani Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polymer degradation and stability* 72(2):323–327.
- Zahra S, Abbas S S, Mahsa M-T T, Mohsen N. 2010. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste management* 30(3):396–401.
- Zhang J, Wang Y, Zhou S, Wu C, He J, Li F. 2012. *Comamonas guangdongensis* sp. nov., isolated from subterranean forest sediment, and emended description of the genus *Comamonas* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63(3):809–14.
- Zhao J, Guo Z, Ma X, Liang Z, Wang J. 2003. Novel Surface Modification of High-Density Polyethylene Films by Using Enzymatic Catalysis. *Journal of Applied Polymer Science* 91:3673–3678.

ANEXO I

As figuras suplementares de A1 a A13 representam as imagens individuais e sobrepostas nos três diferentes períodos de cultivo para cada amostra e seus respectivos controles dos 13 isolados não apresentados no corpo do texto: PE 79, PE 138, PE 154, PE 162, PE 171, PE 186, PE 298, PE 299, PE 327, PE 328, PE 338, PE 343 e PE 349.

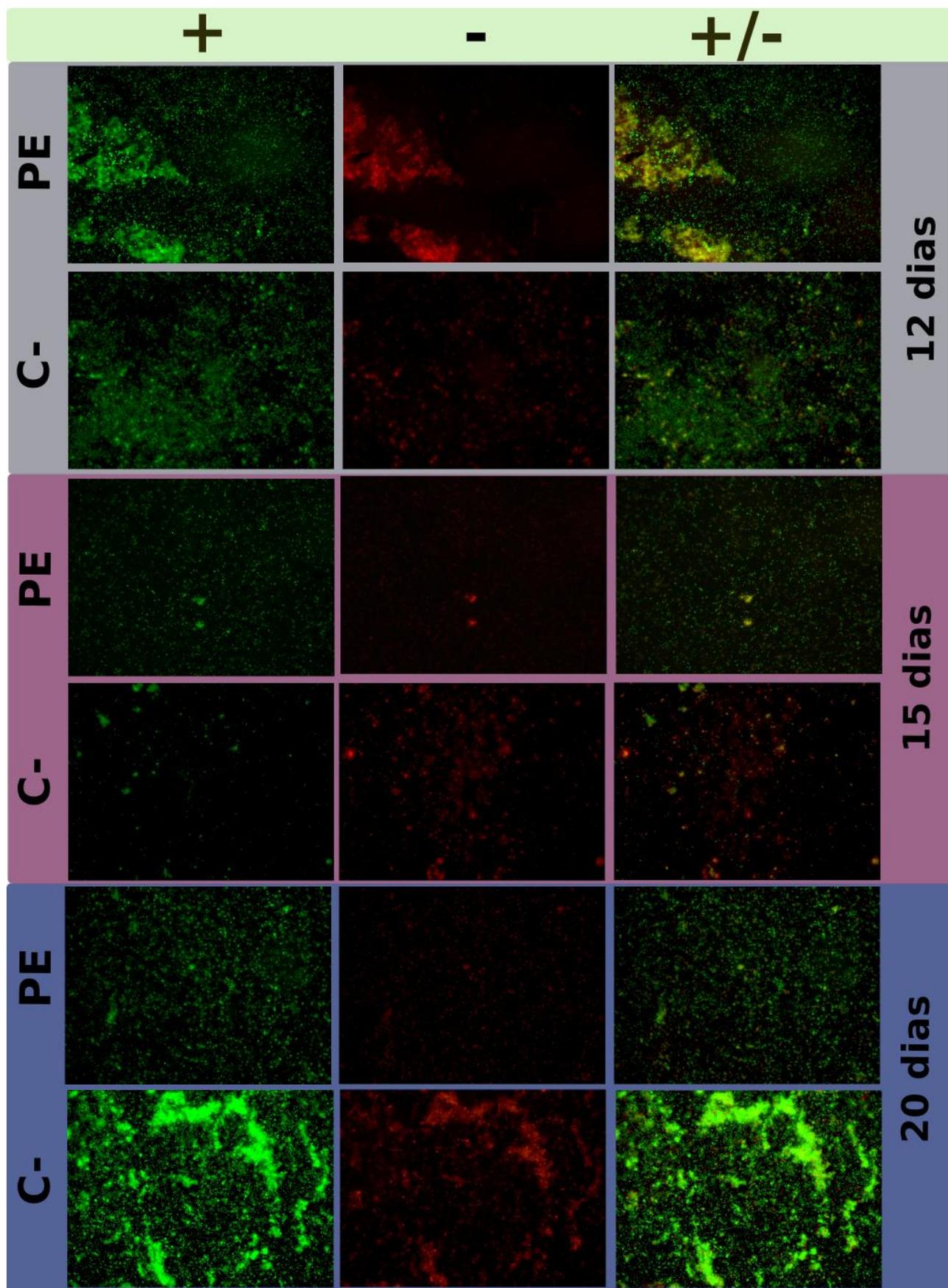


Figura A1. Adesão e viabilidade celulares de **PE 79** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

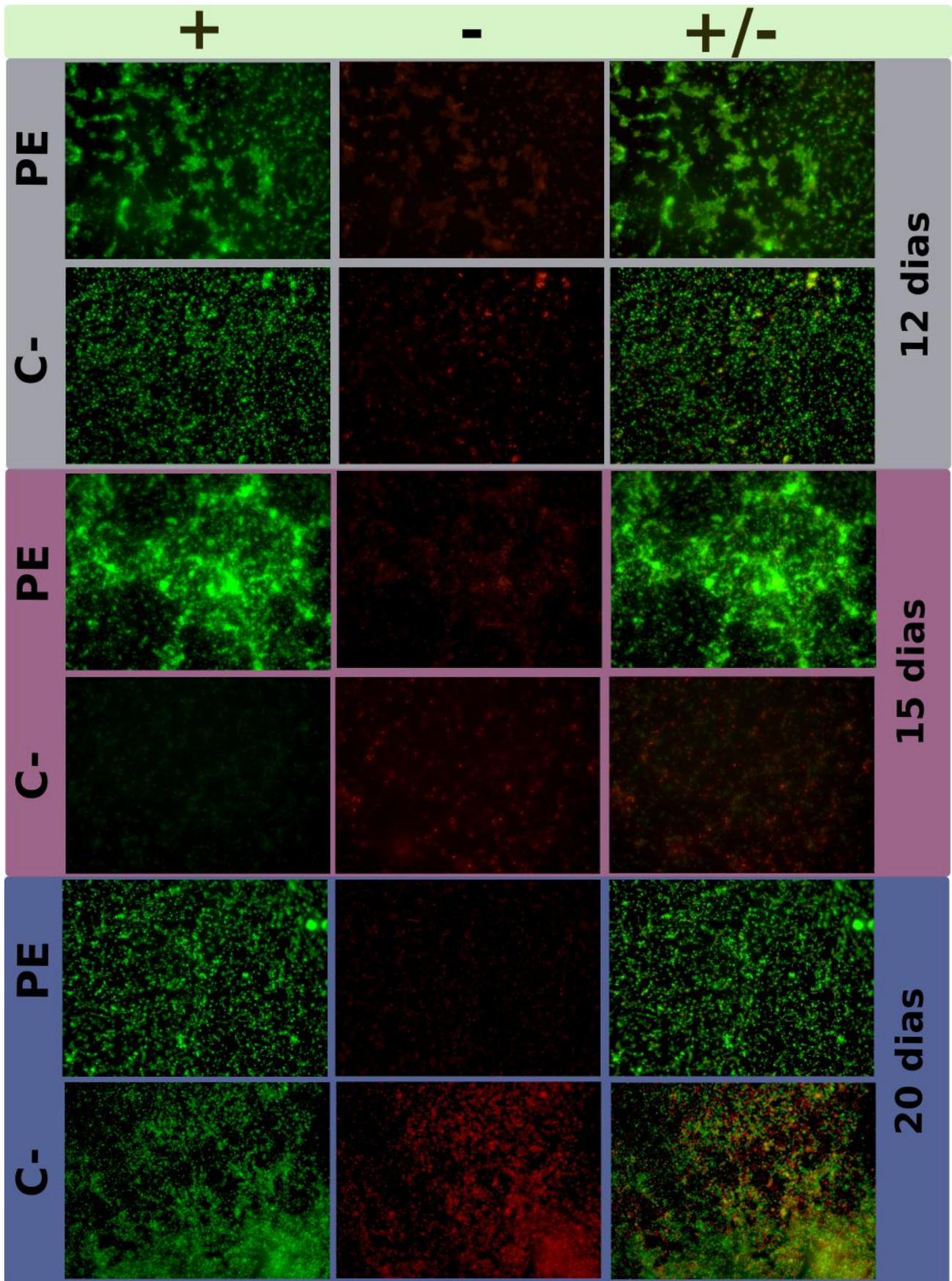


Figura A2. Adesão e viabilidade celulares de PE 138 após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

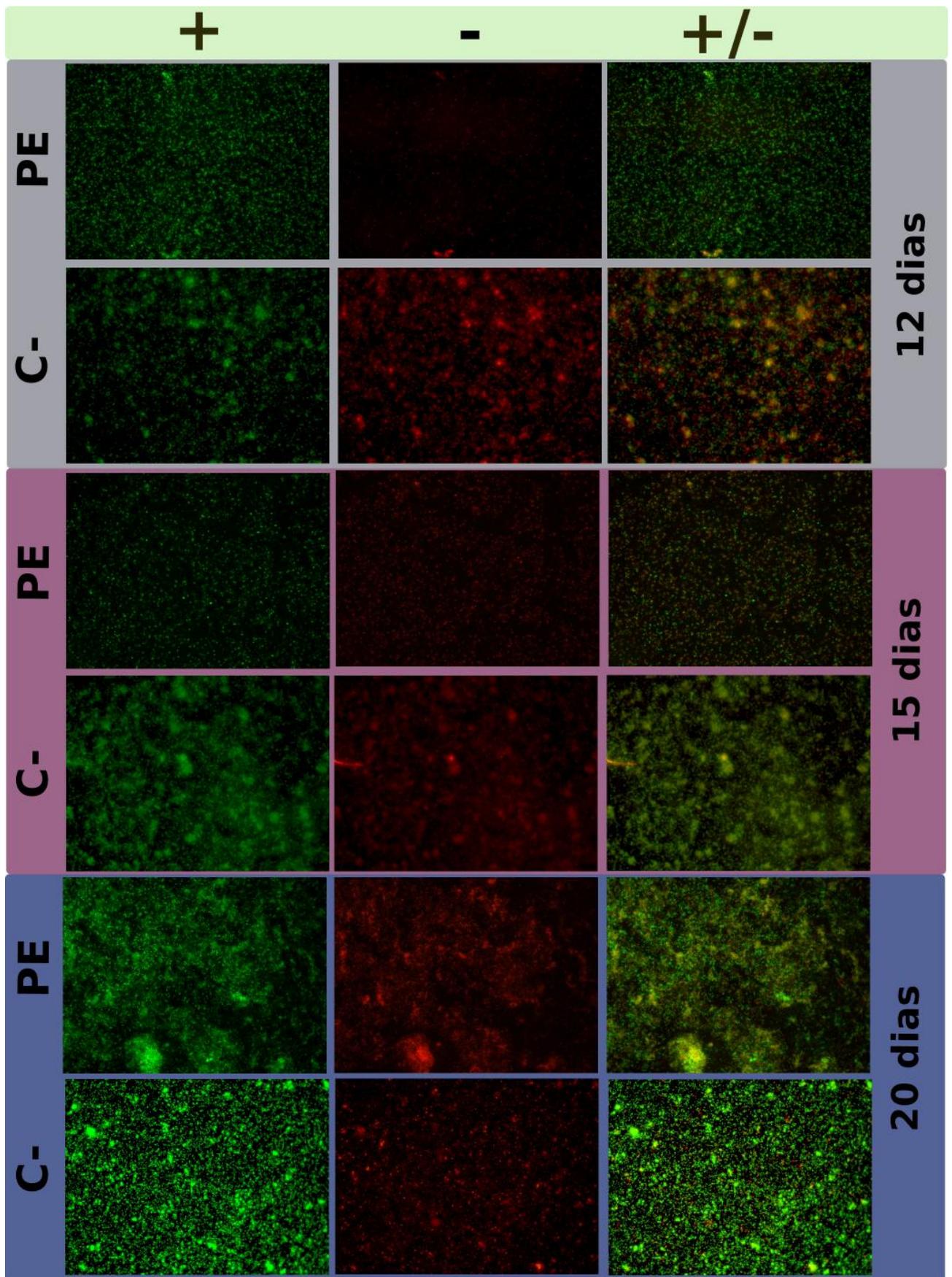


Figura A3. Adesão e viabilidade celulares de **PE 154** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

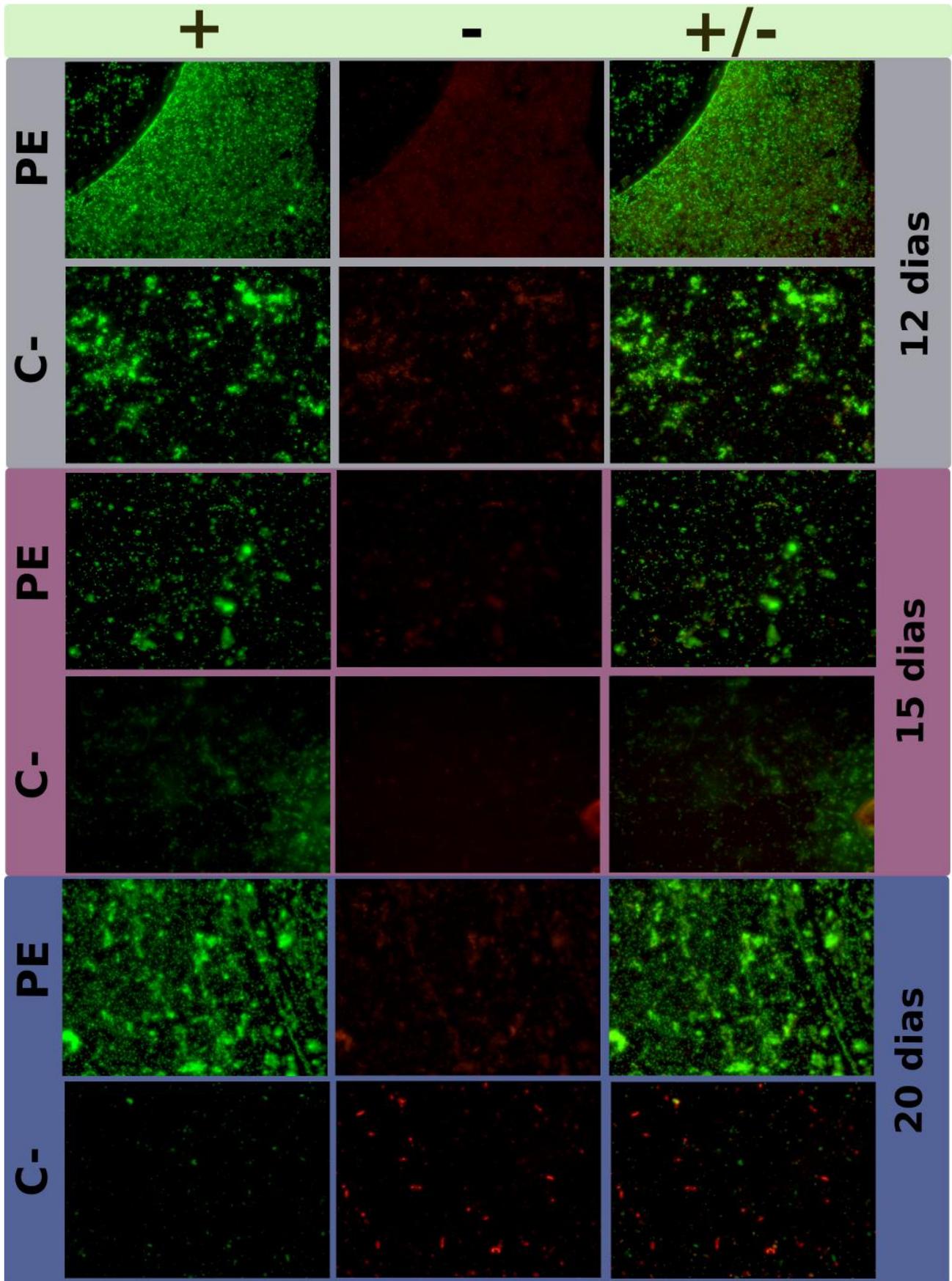


Figura A4. Adesão e viabilidade celulares de **PE 162** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

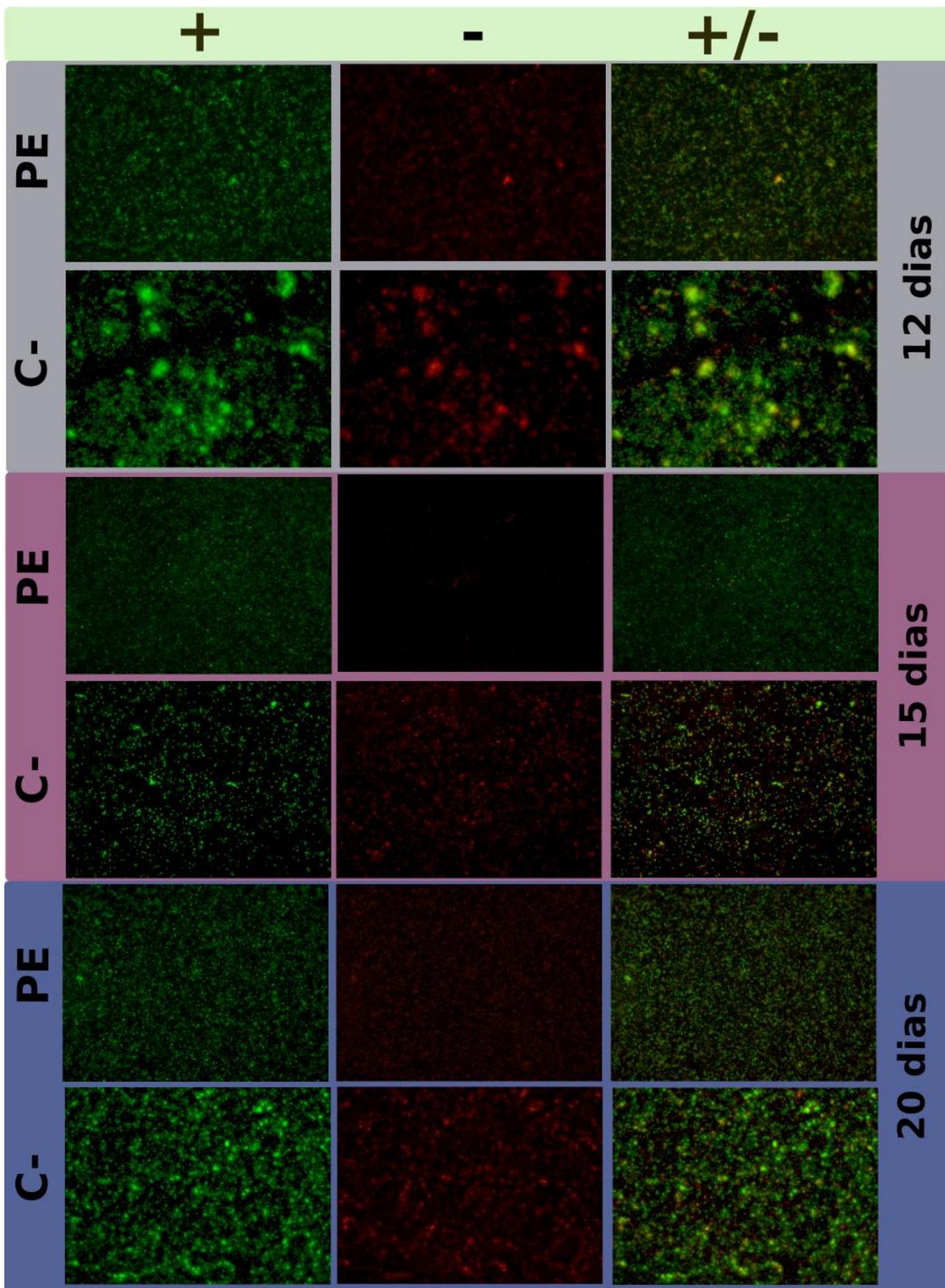


Figura A5. Adesão e viabilidade celulares de **PE 171** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

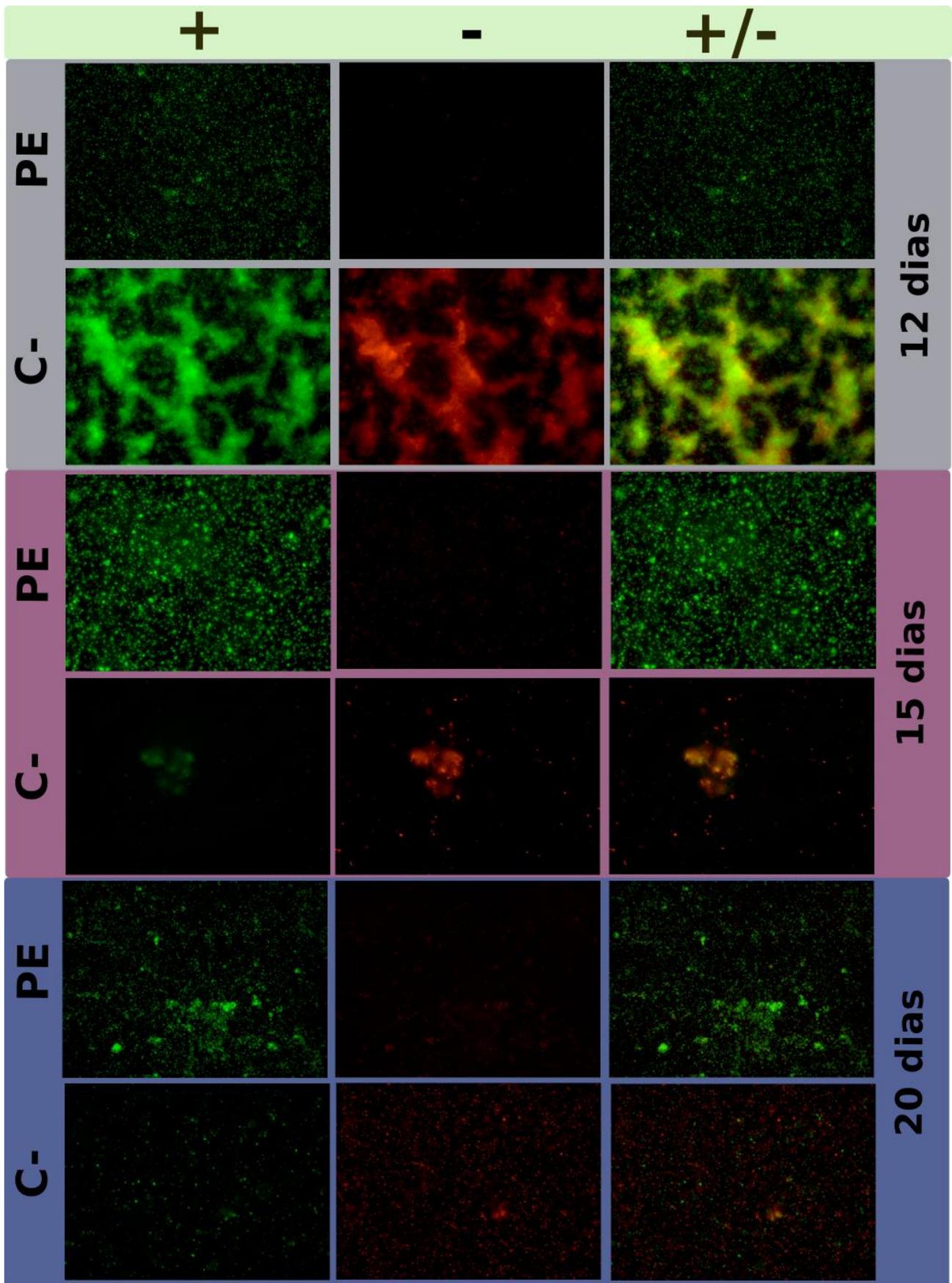


Figura A6. Adesão e viabilidade celulares de **PE 186** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

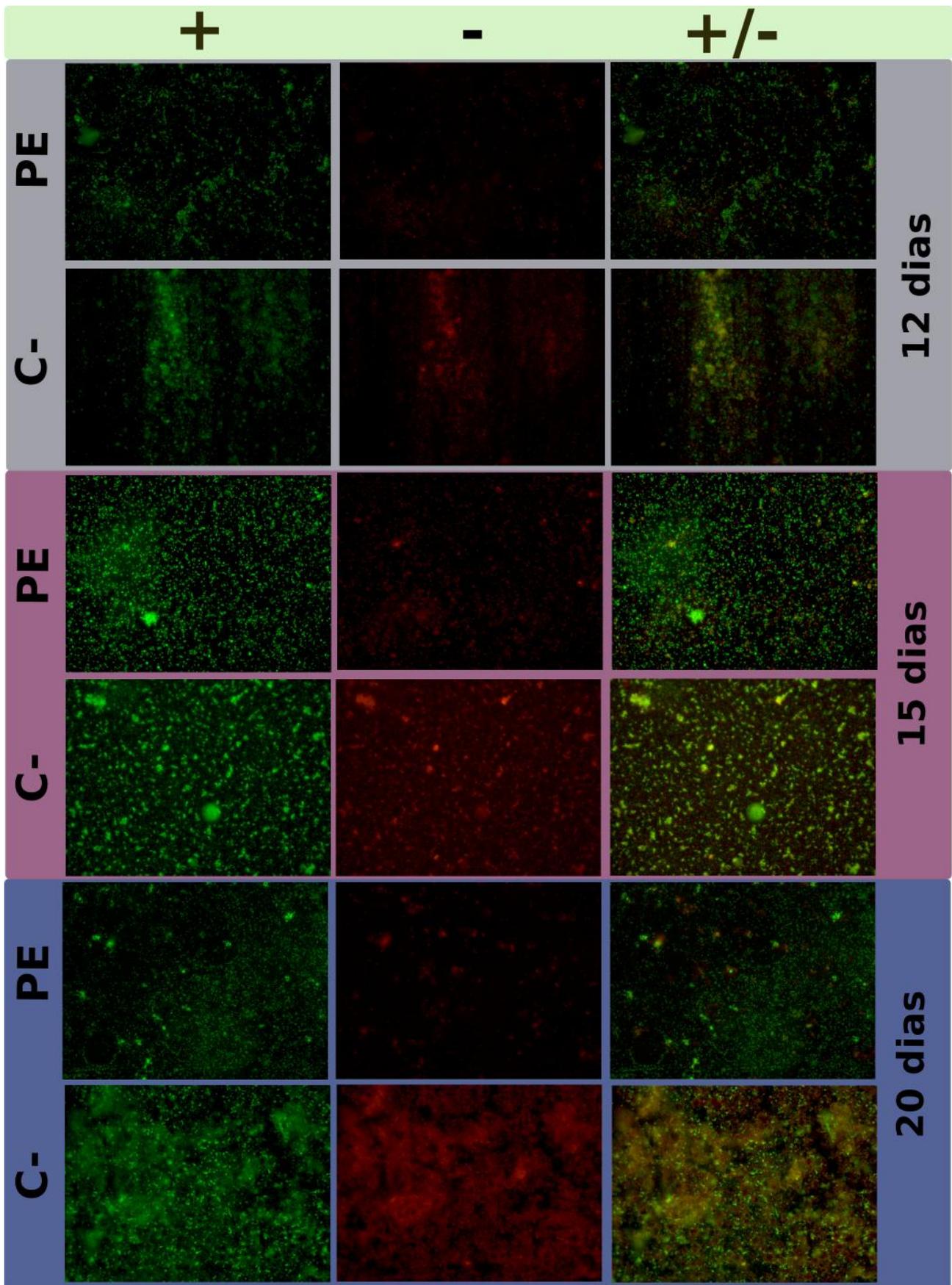
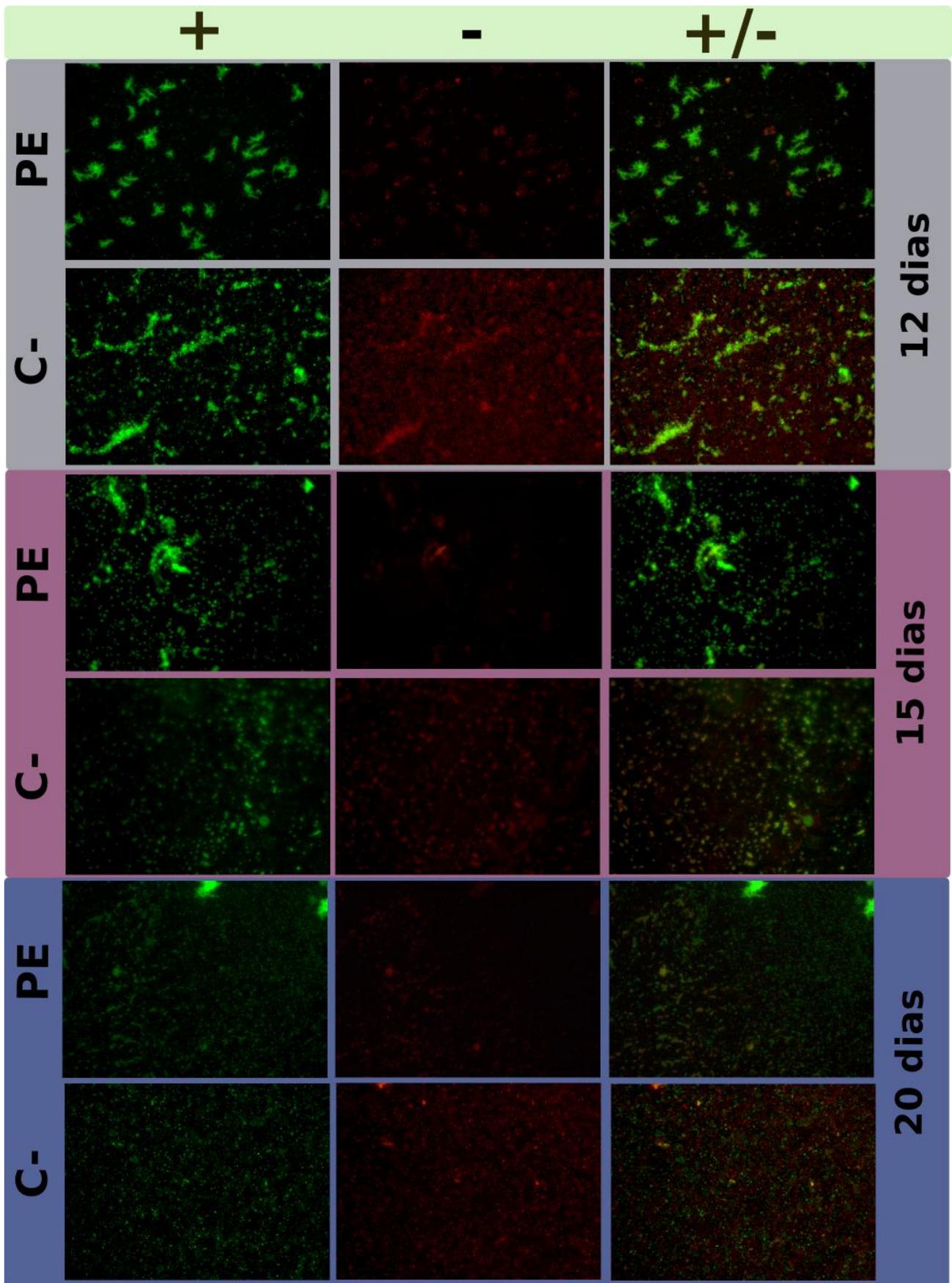


Figura A7. Adesão e viabilidade celulares de **PE 298** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)



FiguraA 8. Adesão e viabilidade celulares de **PE 299** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

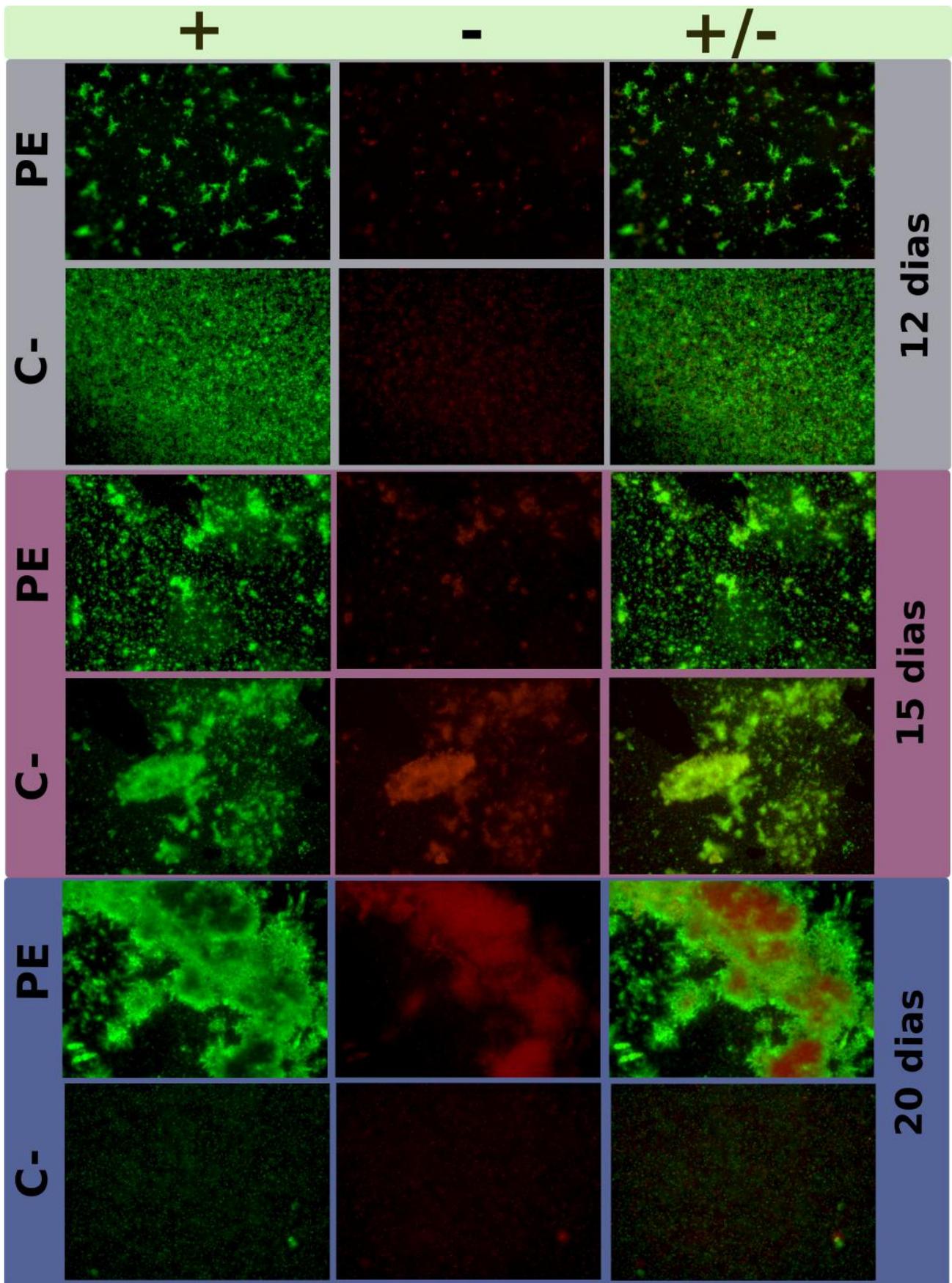


Figura A9. Adesão e viabilidade celulares de **PE 327** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

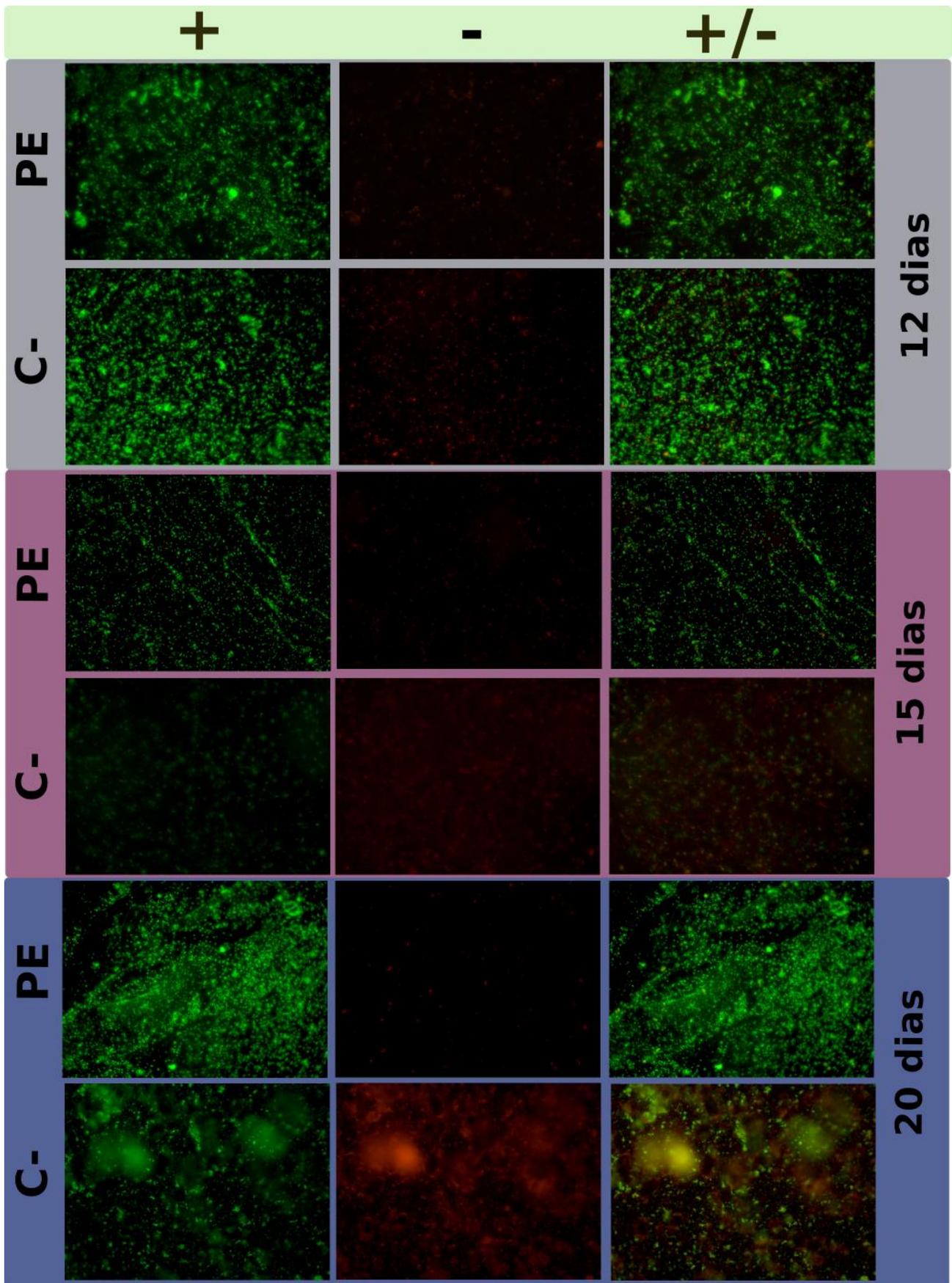


Figura A10. Adesão e viabilidade celulares de **PE 328** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

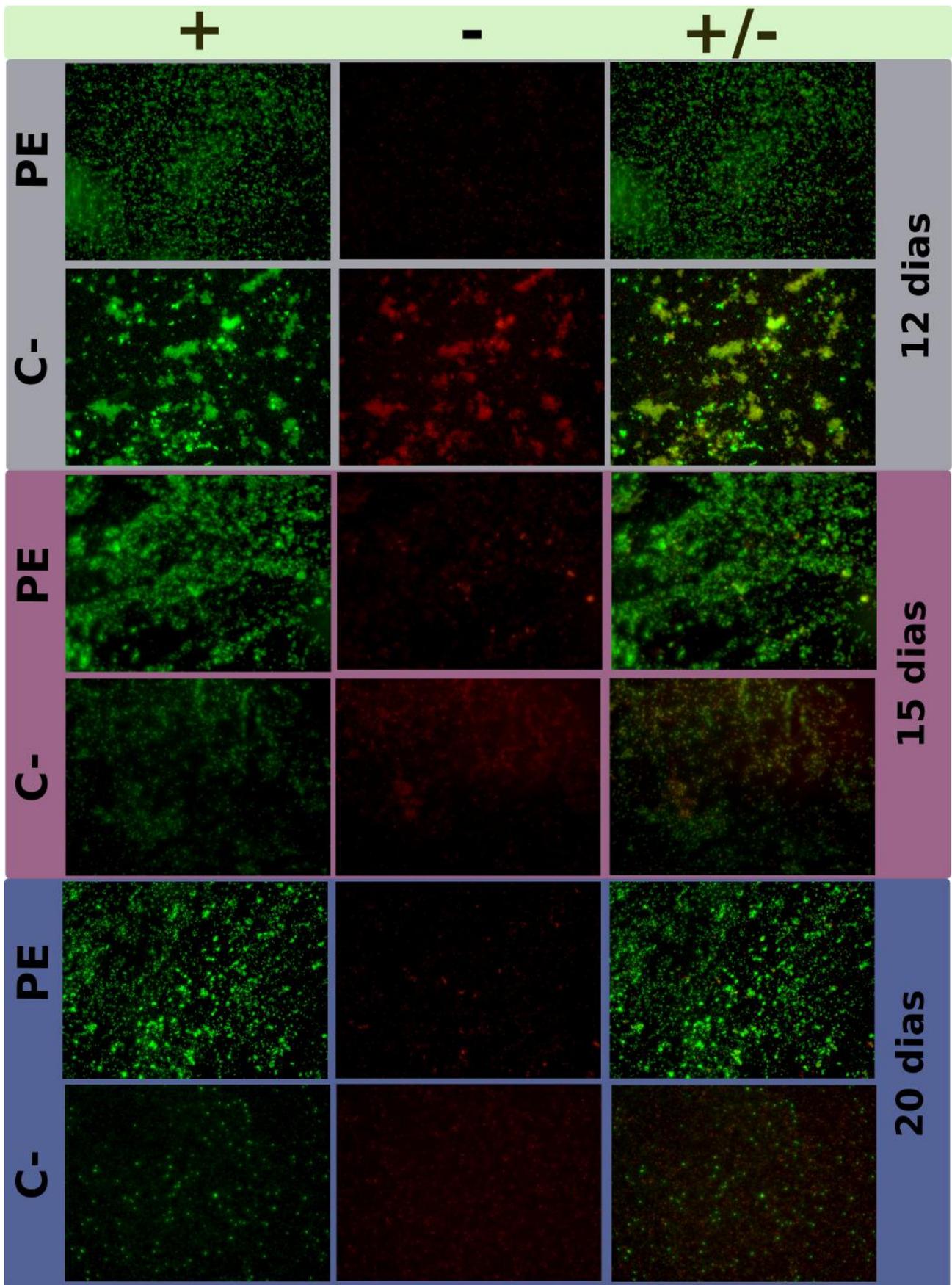


Figura A11. Adesão e viabilidade celulares de **PE 338** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

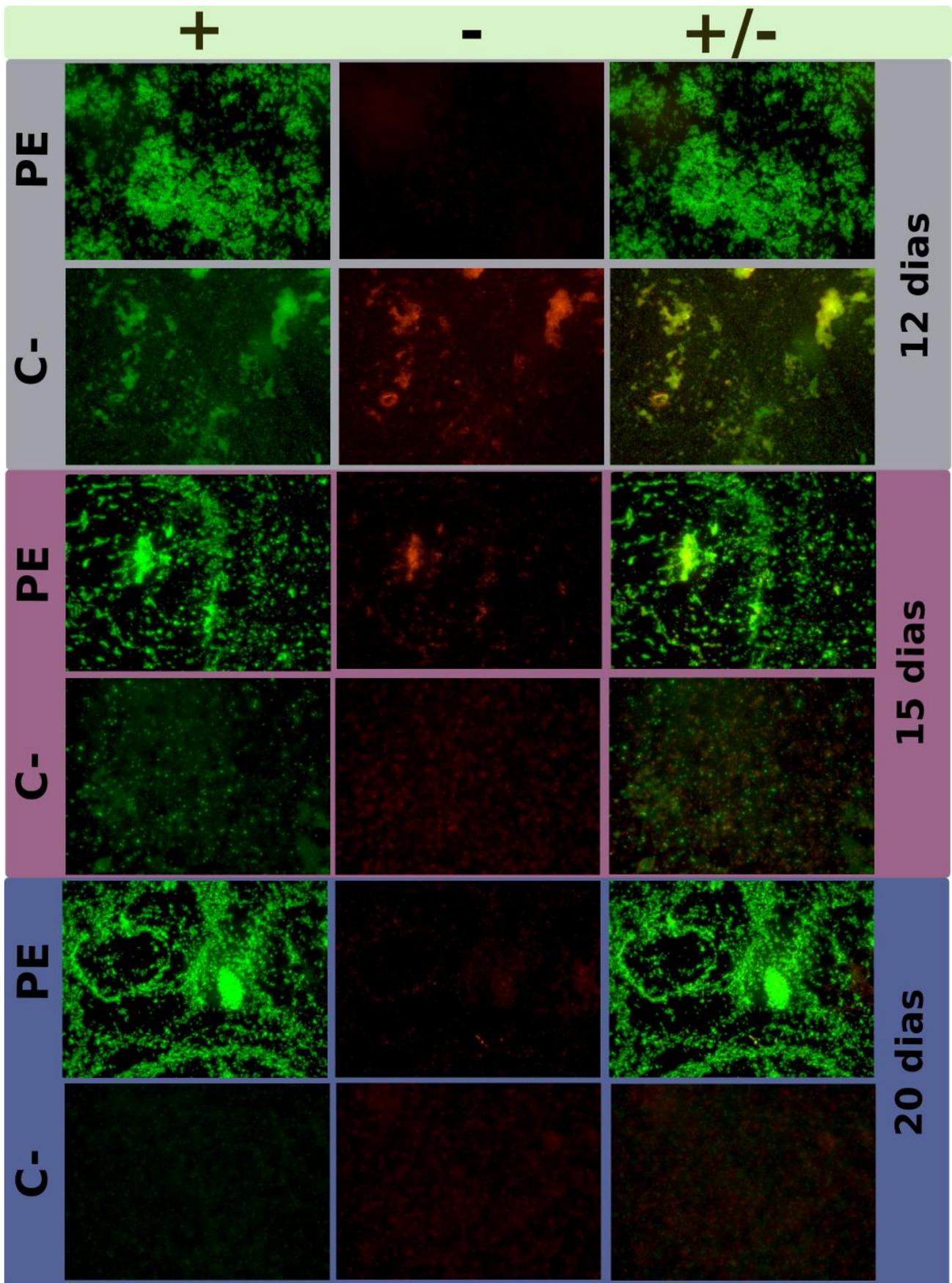


Figura A12. Adesão e viabilidade celulares de **PE 343** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

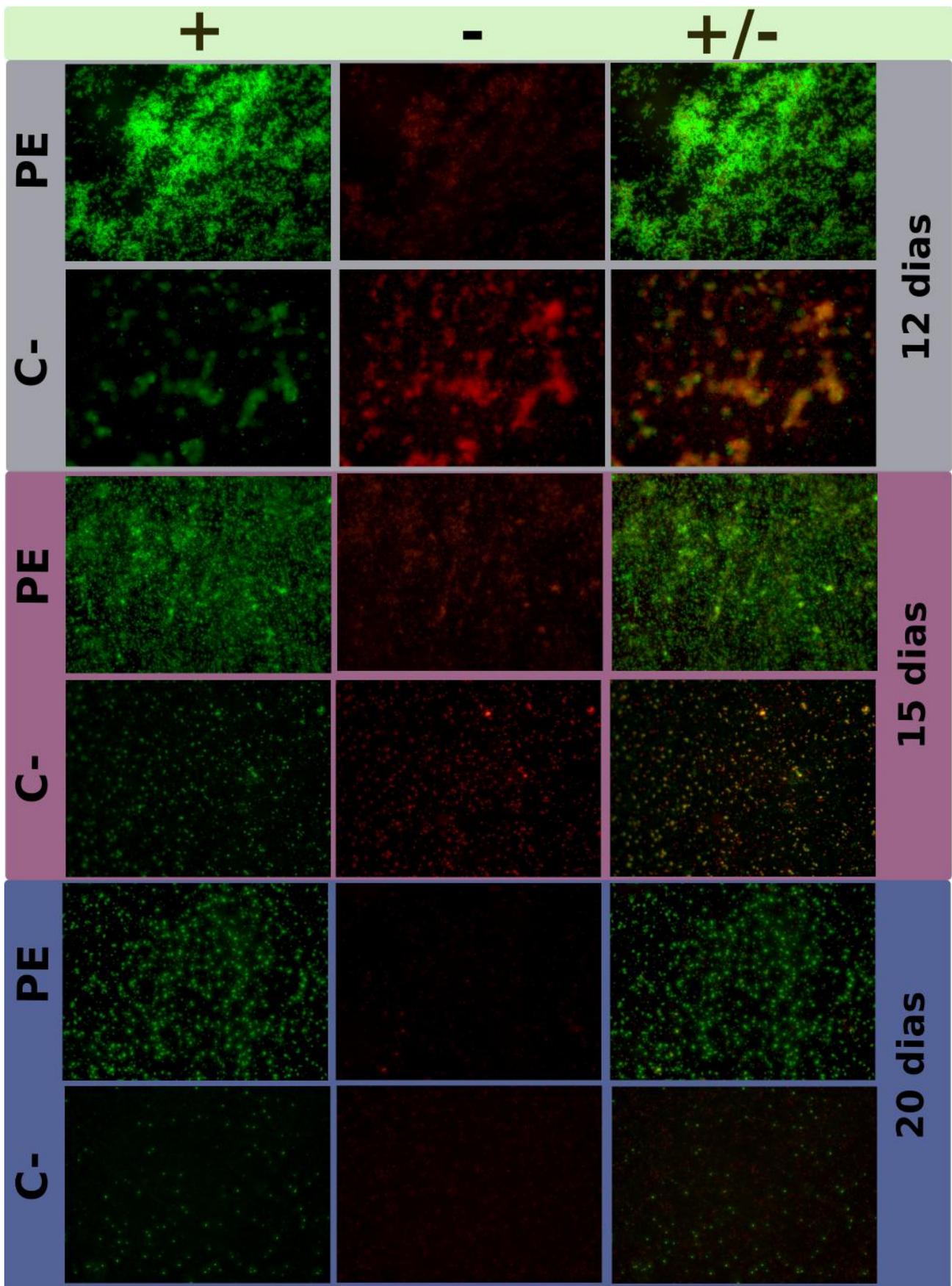


Figura A13. Adesão e viabilidade celulares de **PE 349** após 12, 15 e 20 dias de cultivo em meio mínimo com (PE) ou sem (C-) polietileno: viáveis (+), inviáveis (-) e suas sobreposições (+/-)

ANEXO II.

>PE_154

GGGTGCGAGGTCCCTGGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGA
TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGG
TGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAG
AGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGG
CCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAA
AAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATG
AAGGCCTTCGGGTTGTAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCTTC
TAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCAGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTTGTGACTGCACGGCTAGAGTACGGTA
GAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTA
ACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGTAACCTCA
AAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTTCG
ATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAG
AGATGGATTTCGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTG
TCGTACGCTCGTGTCTGCGGGATGTTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAACGC
AACCCCTTTGTCATTAGTTGCTACATTCAGTTGAACACTCTAATGAAACTG
CCGGTGACAAACCCGAAGGAAAGGTGGGGGATGAACTCCAAGTCCATCAG
GGCCCTTTANAGGTGGGGGGTACCAACGCCTTACAATGGGCTGGGTACAA
AGGGTTGGCCAACCCGCAAGGGGGACCTAACCCCTTAAAACAATCNTAAT
TCCGGATTCAATTCTGCGATNCACTGGCGTGAATCNGNAACCCTANTAAT
CCCGNATAACAATCGCCCGGGGAAAAATTTCCCGGTTTTTTGAAACCCCC
CCCTCAACCTGGGAAAGGGTCCCNCAAANTAGGTCTANCCCCAAAGGGG
GCGTCCCCCGGGGGGTTTNGGTTGGGGGNAGTCTAAAAGGAACCACCCC
TTTATTTCCCGGCTGGGGGACATAAGAGACCCAACGGTGGTAACCTGGTA
ATTGCCCAATTGGGTAAATC

>PE_157

AATGCCAGGTGCGAGTCGCTGCTCCGGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAATTC
GATTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACA
CATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACG
GGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAA
AGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCG
GGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGAT
AAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGA
TGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCT

TCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAACAAGCACCGGCTAAC
TACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATC
CCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTGC GG
TAGAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGATATGCGG
AGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTAAGTACGCTCATG
CACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
CTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGC
TAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTC
AAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTC
GATGCAACGCGAAAAGCCTTACCCACCTTTTGACATGGCAGGAAGTTTCC
AGAGATGGATTCNTGCTCGAAAGAGAACTTGCACACAGGTGCTGCATGGC
TGTCGTCAGCTCGTGGCGTGAAATGTTGGGTTAATCCCAGCAACGAGCCC
AACCTTGGCATTAGTTGCTACATTCAGTTGAGCCCTCTAATGAAACTGC
CGGTGACAAACCNGAAGGACGGTAGGTATTAATCCAATCCCCAGGGCC
CTTTATAGTGGGGGCTACCACCGTCTNACAATGGCTTGTTACAAAGGGTT
CCNNACCCNCNAAGGGGGACCTAATCCCTTAAAACCCNCTTTAATCCGG
TACCGANTCTGGCACTTCCATTTGNNGAATCCCGAAACCTNTTTTTCC
CCGATATCCTGACCCCGGTGAAAAACTTCCCTCGGTGTTTTATCCATACC
CNCGCANATTGGAGGATCGGGTTTATCTAATATTNATGNNACGNGCANAC
GAAAGGTGTTAACCCGAGTNTCCCTCTACCGGNTTAC

>PE_162

GGGGGGCGGAGTCGCTGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGGAATTCGA
TTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACA
TGCAAGTTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGG
TGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAG
AGTAGCCAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGG
CCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAA
AAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATG
AAGGCCTTCGGGTTGTAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAAGCTCCTTC
TAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTA
GAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTCAAATGCGTAGATATGCGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTAAGTACGCTCATGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTA
ACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGA
GATGGATTCGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAAC
CCTTGTCATTAATTGCTACATTCAGTTGAGCACTCTAATGAAAATGCCGG
TGACAAACNGGAAGAAGGGGGGGATGACTCCAATCCCCATGGCCCTTATA
AGTGGGCTACCCCGTCAACAAAGCCTGGTACGAAGGGTTGCCACCCNCNA
AGGGGAGCTAATCCCTAAAACANCTTTATCCGGATCCAGTTCGGAACCC
CACGGGGGAAAGCGAAAACCTAAAACCCGGAACCACTGCCGGGGGAAA

TATTCCCGGTTTTGCCACCCGCCGCCACNCAGGGAAGGTGTCCCAAATN
ATTANTACCAAAGAGGGGCTCACTGTGGGGGTGTCCTTGAGGTATGCGAGC
GGCCCCAATTATAACCTCACACCGCACATAGGGCCCA

>PE_187

GAGGGGCGCAGTCACTGCTCCCGGCCGCATGGCGGCCGCGGGAATTCGA
TTAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTAGCGGGATGCTTTACACA
TGCAAGCCGAACGGCAGCGCGAGAGAGCTTGTCTCTTGGCGGCGAGTGG
CGGACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGGATAACTA
CTCGAAAGAGTGGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGGGGGGGA
TCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCGGATTAGCTAGTTGG
TGGGGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTTGAGAGGACG
ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCATCCCGCGT
GTATGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTGGCAGAGAAGAAAAG
GTATCCCCTAATACGGGATACTGCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCACCG
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGTGTAGGCGGTTTCGGAAAGAAAGATGT
GAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTTAACTGCCGAGCTAGA
GTATGTCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAT
ATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAATACTAACG
CTCAGACACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTC
CACGCCCTAAACGATGTCAACTACCTGTTGGGGCCGTTAGGCCTTAGTAG
CGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGAGGAGTACGGTCGCAAGATTA
TAACTCATAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGACGTGGAT
TAATTCGATGCAACGCGGAAAACGTTACCTACCCTTTGACTTGTCTGGAA
AGCCGAANAAGATTGGCCCCTGCTCANACCAGGACCGGGAACCAAGGTGC
TGCCTTGGCCGTCTCCNCTCAGGGCCCTGGAAAATTGGGGTTAAGGCC
NGCAACGAGG

>PE_298

TGGTTCCCACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAATTCGA
TTGGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAA
GCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCCCAT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTGCAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAA
TGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAG
ACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCG
GCTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCG
TAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTAC
CGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCACCAATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATC
TCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA
TCGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCT
TTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGT
TAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCAACATCCAGTTCGCATCGT
TTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCCAATCCTGTCTGCTCCCCACGTTT
CGTGCCTCAGTGTCAATGTTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGT
TCCTCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCAGGAATTCCGCTACCC
TCTACCACATTCAGTCGCCAGTATCCAAGTTCAGTTCCAGGTTGAGCC
CAGGGCTTTCACAACGGACTTAAACGACCACCTACGCACGCTTTACGCC

AGTAATTCCGAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCATCCCAACCGGGTAT
TAGCCAGCTGGATTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCC
TTCTTCACCCACCCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCGTTGTCCAAA
ATTCCCCTACTGCTTGCTCCCCTAAGAAGTCTGGACCTGGTCTCATTCCCA
TGGTGGCTGATAATCTCCNCAGACAAACTACGGATAATTCCCCTTGGTTG
GCCTTTTACCCCGCAATAACTAAACCAAATNCGGGTTNATTAATCNCGN
AAGCCGGNAATCCCTGGTTTTNACNCGAGGGCTTAGCGGTATTAAGAAA
TTTCCCAGTTTCCCNCGANNAAGAATTCCAGTTATCCACNNCTCCCC
TCNCCCCCAAAGNAATTCNTGNTCNGTNNNTTGAGGTTAAGTNCCCC
GTTTCCTTNGAGGTAACCTACCAAANNATTCCCNCTGCCGCCATAAGGAA
CCCCTGAGTGGTTNNATCCAAANGGAAATG

>PE_299

GGGTGGCCACTCGCATGCTCCCCGGCCCCTGGCGGCCGCGGGAATTCGAT
TGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAAG
CGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCCCATG
GTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAAT
GCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGA
CTCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCGGC
TTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCG
GCGGTCTCCTTAGAGTTCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
ACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTC
TGGAAGGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATC
GAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTT
GAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTA
GCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGTTT
AGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCG
TGCCCTCAGTGTCAATGTTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTT
CTCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCAGGAATTCCGCTACCCTC
TACCACATTCTAGTCGCCCAGTATCCACTGCAGTTCCAGGTTGAGCCCA
GGGCTTTCACAACGGACTTAAACGACCACCTACGCACGCTTACGCCCCAG
TAATCCGAGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
AAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCATCCCAACCGGGTATTA
GCCAGCTGGATTTCTTTCCCAACAAAAGGGCTTACAACCCGAAGGCTTCT
TCACCCCCCGGTATGGCTGGATCAGGCTTGCCCCATTGTCCAAAATTC
CCCCTGCTGCCCCCCTAAGAATCTGGACCGGGTCCCATTTCATTGTG
GCTAATANTCCTTCCAAAAAACTACGGATCTTCCCCTTGGTGGGGCTTTA
CCCCNGCACNTAACTAATCCGAAATCCGCCATTTAATCNGCAANGTCGAA
AATCCCTNGTTTCCCNGNAGNCGTAGGCGGGTTAGNCGAAGTTCNCACG
TATCCCCCNAAAAAAGNATNNCANTGTTTCTCCNCTCGGNCTCNCNC
CAAGNAAATTCNTGGCCNCTTNAATTTTGNTTGGCNCNCCNGTTCNTGN
CGNGTAACTATCTATTAACNCCGNCGGGCCAAAGAACCCTTGAACCTGTA
AGGCAAAAAAAGATTCTTTAACCAATACAAAAA

>PE_328

AAAATTTTCATGTGCGACTCGCTGCTCTCTGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAA
TTCGATTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGACCGTTTGAGGTAGGCCTA
ACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACACGTTTGCTTGTCTCTGGGTGGCG

AGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGTGGGGGAT
AACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCA
GGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA
GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAC
CGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAG
AAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAG
CACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTACGAGCG
TACTCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTTAAAGTCC
GTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGA
CTAGAATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCG
TAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACAT
TGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC
GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG
AAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTA
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGT
CGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACCCGGGT
GCTGCATGGGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCNTGGAGATGTTGGGTAAAGTCCC
GCAACCGAGCCCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACCGTAATGGNGGGA
ACTCTAAGGAGAACGGCCGTTGCATAACCGGAAGGAAGGTGGGGGAATAC
ACTCAAGGTTTTTATGGCCCTTNACNGNACAAGGGCTACAACCGTTTTCT
AATNGGTNAGNNAAAAAGGGGTTGAA

>PE_338

AGGGTGCCCACTCGCTGCTCCCGGCCGCCATGGCGGGCCGCGGGAATTCGA
TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGG
CGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACGT
AGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGGA
TCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGG
CGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGT
GGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAATC
CAGCTGGCTAATGCCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTACT
CGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTTCGTTTAAAGTCCGTTGT
GAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGA
ATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAG
ATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACA
CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGT
ATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGA
ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACCCAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAACTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCAACA
AACGCAACCCTTGTCTTATTTGCCANACGTAATGGTGGGAACCCTAAAG
AAACCCCCCGTGCCAAACCCGAGGGAAGTGGGGTATAACGTCACTTTACA

ATGCCTTTAACGCCACGGGTACCTCTTATTCCACTGTTTGGGACNAGGG

>PE_343

GGGTTGCAAAGTCGCAGGCTCCCGGCCGCCTGGCGGCCGCGGGAATTCGA
TTGGTTACCTTGTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAA
GCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCCCAT
GGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAA
TGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAG
ACTCCAATCCGGACTGAGATAGGGTTTCTGGGATTGGCTTACCGTCGCCG
GCTTGCAGCTCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGCCG
TAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTAC
CGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGA
CGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATC
TCTGGAAAGTTCTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA
TCGAATTAACACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCT
TTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGGCAACTTAACGCGT
TAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCACCCAACATCCAGTTCGCATCGT
TTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT
CGTGCCTCAGTGTCAATGTTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGT
TCCTCCTGATCTCTACGCATTTACTGCTACACCAGGAATTCCGCTACCC
TCTACCACATTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAGTTCACAGGTTGAGCC
CAGGGCTTTCACAACGGACTTAACGACCACCTACGCACGCTTTACGCCC
AGTAATTCCGAGTAACGCTTGACACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTTGGGTACCGTCATCCCAACCGGGTAT
TAGCCAGCTGGATTTCTTTCCCAACAAAAGGCTTTACAACCCGAAAGGCT
TCTTTATCCACCCGGTATGGCTGGATTAAGGCTTGCCCCCATTGTCCAAA
ATTCCCCCTGCTGCTTCCCGTAGNAATCTGNACCGTGTCTCATTTCCCA
TTGGGCTGATCATCTTTCCAAACAAATTACGGATATTCCCCTTGTGGGGC
CTTTACCCCGGCACTANCTAAACCGAAATTGGGTTATTAATCNGGCCAAG
GCGAAAAACCCTGGTTTCCCCGNGAGNCTAANCNGNATTTACGAATTTCC
CACGTTTCCCCCNAAAANGAATTCCATGTNATCCTCCCTGTCCGCCTCG
CCCAAAAGGAATTCCTNTGGNNGTTNCTGTTTTTGGTCNCNCGTTTCT
TAGNTA

>PE_349

GGGTTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGCCGCNNGGATTCGA
TTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACA
TGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGG
CGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACGT
AGGGAAACTTACGCTAATACCGCATAACGACTACGGGTGAAAGCAGGGGA
TCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGG
CGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGT
GGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATC
CAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCG
GCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACT
CGGAATTAAGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGT
GAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGA
ATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAG

ATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGACA
CTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGT
ATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGAC
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAGA
ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGGCTG
CATGGCTGTCGTCAACTCTTGTCTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAAC
AGACGCAACCCTTGTCTTATTTGCCACACNGTAAAGGTGGGAACTCTAA
GGNGAACGCCCGTACAAACCGGAGGAAAGGGGGGGAAGCCCCAAATCAT
ATNGGGCCTTAACCGCCAGGGATCCCCTTACAAAAAATGGANGGAAAAA
AGGGTTCTANCCCGCGCACGGTAGCATTCCCGA

>PE_591

GGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXTGGCGGCCGCGGGAATTCG
ATTAGAGTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACAC
ATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTCTGGGTGGCGAGTG
GCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCTACTTTTTTCGTGGGGGATAACG
TAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGGGTGAAAGCAGGGG
ATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTG
GCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCG
TGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAT
CCAGCTGGCTAATACCGGTTGGGATGACGGTACCCAAAGAATAAGCACC
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAC
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTTAAGTCCGTTG
TGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAACTGCAGTGGATACTGGGCGACTAG
AATGTGGTAGAGGGTAGCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGA
GATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCAGCTACCTGGACCAACATTGAC
ACTGAAGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAG
TATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTG
GTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCGAG
AACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTG
CATGGCTGTCGTGAGCTCCTGTCTGAAATGTTGGGTAAATTCGCAACG
AGCGCAACCCTTGTCTTAAATGCCACCACGTAATGGTTGGGAATCTAAA
GAAACCGCCGTTGCAAACCGGAGGAAAGTGGGGGATGAGCTCAATTCTCC
TGGCCCTTACGGCAAGGGTACACCGTACTTCAATGGTTAGGAACAAGGCT
GCAACCCCGGGACGGTAACCAATCCCAAACCCCTACCCATTCCGGATGGG
AGTCGCACCCACTCCCGAAGCCGAATCCTNATAACCAATAACCATTGNCG
GGGAAAATTCGCGCTTTCAACCGCCNTCACCNGGATTTTTTCGAAAAAG
GGGCACTTCCAGGACGCTCCCTGGGGCCAAAGGGGAACCA

>PE_63

GGGGTGCAGTCGCTGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGA
TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACA
TGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGATGCTGACGAGTGGCGAACGGG
TGAGTAATACATCGGAACGTGCCTAGTAGTGGGGGATAACTACTCGAAAG
AGTAGCTAATACCGCATGAGATCTACGGATGAAAGCAGGGGACCTTCGGG

CCTTGTGCTACTAGAGCGGCTGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAA
AGGCTTACCAAGCCTGCGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATG
AAGGCCCTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCCTGGGGC
TAATATCCTCGGGTCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGACAGTGGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCCATTGTGACTGCAAGGCTAGAGTGCGGCA
GAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGGCCTGCACTGACGCTCATGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGTCTTAAGTACTGACTCAGTAACGAAGCTA
ACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCGCACAAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGAT
GCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGGACTTACCAGAG
ATGGTTTGGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCCACC
CTTGCCATTAGTTGCTACATTCAGTTGACCCTCTAATGGGCTGCCGGTGA
AAACCGGAGGAAGGGGGGGTGAATTCATCCTCATGGCCCTTTAAGTGG
GGCTACCNCGTCTAAAAGGCGGGACAAAGGGTGTACCCNCCAGGGGGA
GCTATCCTAAACCAGTCGTATCCGGTTCGATCTGGACTCCCTGGTGAATC
GGACCCTATAATCGGGTCAAATGNCNGGAAACTTCCCGGCTTGAACNCCC
NTCCCCTGGAANGGNTCCCAATNTGTACTACTAAGGGGGTTCACCGGGGT
TTGNGGNGAGTCAANGACCCATANATCCCCCGGGCTTAGACCCCCGGAC
NNT

>PE_79

GGGGGGCGACGTTTCGCTGCTCCCGGCCCGCTGGCGGCCGCGGGAATTCGA
TTAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACA
TGCAAGTTCGAACGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGG
TGAGTAATACATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAG
AGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGG
CCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTGGGATAA
AAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGCAGGATG
AAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCTCCTTC
TAATACAGGGGGCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAGACAGATGTGAAATCCC
CGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTACGGTA
GAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATGCGGAG
GAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTGTAAGTACTGACGCTCATGCA
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCT
AAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAGCTA
ACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGTTTAATTCGA
TGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATGGCAGGAAGTTTCCAGA
GATGGATTCGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCAACGAGCGCAAC

CCTTGTCATTAATTGCTACATTCAGTTGAACCCTCTAATGGGACTGCCGG
GTGCAAACCGGAGGAAAGTTGGGAATAANTTCAATTCCTCTTGGCCTTAT
AAGTGGGGCCNCACCGGTCTTCAATGGGTGGGTACAAAAGTTTTCAAACC
NGCGANGGGGAACCTATTCCCTAAAACAACCTTTATCCCAGGATTCATNCT
GAACTTCACNGGCGGATTCTGAATCCTTTAAACCCGGGAACACATCCCC
GGGGAAAAATTCCCAGGTTTTTAAACCCCGNTCCCATTGGAGGAGGGTT
TCCCAAATTTGTTTTACCCCAAGGGGGCTTTCCCTTATGGGTTGCTAGA
GGGGGAANCCATAGGGAACATTAATTTATTCCCCCTCGGCGTCTTAGGGC
CCCCTT

>PE_138

GGGGCAGTGCGGCTGCCTTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCG
GACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTCATTCATCGGAACGTGCCCAGT
CGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAG
GATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGC
AGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGC
TGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGCTGTAAACTGCTTTT
GTACTGACCGATAAAGCTCCTTCTAATACAGGGCGGTCAGGACTGGTCCG
TAGTACAATGCTCCGGCTAATTTCTTGCCTCCAGCAATTAAGATAGAGG
GCGCCAACGTTCAATTTGAGTTTGTGAGTGTCTCGCCTCGTTCGGGCGATC
GCGTGAATAAATACTGTGAGCCCTGACCTATAGTGGATTATTGTGTTTAA
TACTTGTTAACTATCGTTCTTATGTGGATAATAGATTAGTTAAGTTAATA
CTGATTTATTGCGTATATTTCTTTAGATAATTGTAGTAAATTTAATGTAA
TATCTATCTTGCTAGTTTATAGTCTTTTACTTCATTAGGTTTTCGCGGTTT
TTGCTGGTGGTTGTCTTTCCCTGTCTTCTTGTAGTCCCTCCGAACCGGAG
TAGTTGGGAGCTCTCCAGTGTGGTCTCGTTCTCNCCATCCGCTGTATTAC
TGACGCGAATTTTTCTGGCTNTCTGTCTTCGTTCTTCTCTAACCTTCCGT
CCTCAACTCAATCATACTAGTCTTAGTCTATTAATGAGCAACTCCCTTC
CTGGTAGATCTTTGNCCGCGTAGCAGTAACGTTATGAATATTAACGTTTT
TTTCTCTTTGTTTCTTTTTTTCAGCGGGTATACGTTTTTTGAGAGNNTATTA
TTGTATTNATGAACGGAGNCNCTGATCTTGAGGCGTGCCTCTATGTCTCC
CGCGGGCTTCTCTTCTCATTTTCATTTTTTTTTTCTCCTCGTNTTCTNTT
ATTTTANGNGTTAGTCTTTAATCTACTTAATCAATCNTCTCGTCTANACT
AATTACTACTTTAGTCTGGTAGGTCTTACTTTGCGCATTTCTGGAAGTCA
CAGGTTTCGCTGTTTGGCCATTGATTTTTTGTGTATTTCGTGCTAGACGCAC
TCAGAGATATTCCTGTGTGCGGTTGTTTTTAGTGTTAATCATCTTCTTT
CATTNGCACATT

>PE_171

GGGAAGTGCGCTGCCTTACCATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGA
CGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGCAATACATCGGAACGTGCCCAGTCG
TGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGA
TGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGCAG
ATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTG
GTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
AGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGT
TCGGTACTAAAAAGCTTCTTCTAATTTTCGTGGGGTGTGTGAAGGTACCTG
TTCAATAGTTACCTGAAATTATCTTTTTAGGAACCTACGTGAAACGTGCA

TTTATCTTTTTTATGTTTTTTGCTCTCTCGAACCCCTGGGTGCAAACGCC
TGTCAAAAAGTATTGAATATTTTTTCGGTTAGGAGAGTCTGATTAGTTTTGT
TTATATTCTTACCCCTTCTTGATACCCGGGATGGGTGGATTCTGCTA
TTGTTTCGTTACATCCGGTCACATTATTCTGAGGAGGGGAGTGTATTATTT
ATTTTATTTTTTTTTCTTTTTCTTTGCTGTTTCTGCCTCAGTTGCTAACT
CCGCCAAAGTCCCCTTAAGGAAGATAACCCGTATCGTGGGAGGACCCCTG
CCCTTTTGTCGGCTCTCTATCAGTAAATAAGAAGATAGGGGGGGGGACTG
CTTCTGGTGTTCGGCATCCTCGTCCGTCCTGAGGCCGATCTCCTCGTATT
TTTTTAAGTTCAGATATAGTTGCAAGGGGTGTTCTTCGATGCATTACTAT
GTCCTCTCTTTTATTAATAAATTATATTAATTTTTTATTATTGATTTT
TTCTGTGTTCTTATACCTTCTATCTCTTCTTTAGACTCGTTGTTGGCTTG
CCTTTTGTGTTTTTCTTTATCGTCAATTCAGCGTTTGATTGTATCCTCTT
TCCTCTTTTATGTTTCGCTGCTTTTCTTCCATTATTTCTGGTTTCCTTGT
GCTTTCTATCTGCTGTAAACAGCTGCCTGGGGGTCATTGCCTCTATCCGC
TCCGTTGCTTTTCCCAGCATCTTTACTTTTATTGGTTTTGTTCCCTTATCA
TTTTTTTGCTGTGGTGGTTACGCTTGGTCCCTATACTATTGTCTATTAAT
CAACCCGATTGTAATAATCATTATTTGATTGATCAGATCAAACCTGTGTAA
CTTCAC

>PE_186

GGGATAGGGCGGCTGCCTTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCG
GACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTCATACATCGGAACGTGCCCAGT
CGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATAACCGCATACGATCTGAG
GATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGCCGATGGC
AGATTAGGTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGC
TGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAACCTGCTTTT
GTACGGAACGAATAAGCGCCATCTACTTGCCGCTGCGGTTTGGAGGTATC
GCATAATTCTTTATTGGCAAATACTTGTCCCTTACACTGTTAGTAAGTT
AGGGCGTACTGTGTTTCTGAGGTATTGGGCTCTATGCGATCCTCTTTTTTC
TAGATGTTACGATAATTTGCGTCGTGTGAGGGGTGGTGGTGGGATTTGTT
GCAAGTTTTTTTCAGAATCCTATCTTTGTTCCCTGATTTCCCTTCGTTGCATG
TTATTCATTGATGTTTTTCGAAGATTGGGTTAATGTTGTTTATATTGAA
TGTAATTGATGTGTTTCAGTGCCGTTTATTTTTCTTTATTTTATTGTTG
TGACCATCTTTTGTAAATAATGCTCATTTCACCTTTGCCTGAACTGGGT
ATTTGATGTTAGATAGTGGGCTGTTACATCTTTAATTAGCTTTTTTAATTC
TTCGATCAGTTATCGAATCAATCATAATTTATTTGTATGTAATTTCCGTT
AAATCACTCTATATGATGCATAACGTGTAAATAGATAAACATAGGCGCGT
CGTGTTGTCACCGAGAGTCCCGTTTGTGTTAGAAACGCGTGCCTGTGTCG
AGACGCCGTATTATTATGTAATAATCTTTAGAGTGATTTGAGTTTTCCGCT
CTTAACAGTGGATTATAAAGAAAAATATAAAGGAAATAAAGCAAGACGAA
CTATGGGAAACGAACTTTAAGTATACTATATTTTATCTTTTATTTCTCTT
TCGTTTGACTTAACTTGATTTTATATTTCTACTCATGTTTTATTTTATCT
CGTTTTTATATCTACCTTACTATCTTCTTGTCTACATATCTAATCCCAGT
CTCCTCTGTCTATTCATGTTTTATGCTTGTGTCGCACTTGCTATGTTTCGT
TTAATGTTTCCCTCTTTTGTAGTATCTATTTTCCCTTACTCTGTCCCTTCTT
TATATGTTTCGTCTTATATTTCTTTTTCTTTCTTGATTGTTTTTATTGTG
CTTTTTTC

>PE_327

GGGGCAGGGCGGTAGCCTACACATGCAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGC
TTGCTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCT
ACTTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACG
ACCTACGGGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC GCGATTGAATGAGC
CGATGTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGT GAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAA
GCCTGATCCAGCCATAACGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTTATATCCCGGTTGGGATGA
TTGTACCCAATGAATAAGCTCCTGCTTACTTCGTGACTTCAGTCGCGGAA
ATTCCACATGGTGCATTAGTTATTTGATTTACTAGGGCTCTCCGCGTGCA
ATGGTGGTCTTAAAATATTTTTCTTTAATTTGCTAAGAAAATATAGGGAG
ATAATTTGTGTCATATGCAACTATTTTGC GGAATGTTTCTATGATATTTT
AAGTTTTATTCAAATTATTTAAATACAATATTTTCATAAGCTAAATTATTA
AAAAATAATCAGCATTCAACTATTGAATATTATTATAATAATTCTGGAC
ATTGTTATATGTAAAGAATGTTCTTATTTATTCATCAAGGTTCTTTGTAA
GTCATGTTTGACGGAAATGTCATTCGCGTTGTTATCTATACTTTATTCGT
TGATTTATTAGTTCTGTGAGTTATCTTATTA ACTATGAATACTTACAAGT
GAAATGATTTTTTACAGATCTTTAACAACTTCTAAATTGTTTTAATTTTC
CCTGACCTCATGGTTGGGGTGTTTAGGCACTAGTAATTATGTATACAGTC
TACTCTGTGTTTCCCTGCCAGATTGAGGTAGAAGAATAGATTATTATTTAT
TATTGCGTTTAAAGTTTGGAAATTTCAATGGAATCAATTAGAAATTTTGTGCG
CGCCCGTACACAATTCGAAAATATCATCTCGCATCTGACTACTGTAATCC
AAGAATTATTGATAATCGCTAGACTTACATAGGAGCAACTTTAGCATTGC
TTCCTGATTATAATGCTCTATCTCACTTTCGCTGTTTGT TTTATACTACC
GTGTTTTGTATTTCGTTACCTTTTCGTTCCGGTGT TATCTCCTAATTACGTT
TCGATGTCAATCCTCTATTTTTATACGGTTCGTAGGACTTCAGCAATGTTA
GATGTGTCCGAGGATTTCGTGTCTAGTCTTGA