

Biodegradação do microplástico polietileno por fungos filamentosos de manguezal e apicum

MARJORIE JASPER SILVA

SÃO VICENTE – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

CÂMPUS DO LITORAL PAULISTA

BIODEGRADAÇÃO DO MICROPLÁSTICO POLIETILENO
POR FUNGOS FILAMENTOSOS DE MANGUEZAL E
APICUM

Marjorie Jasper Silva

Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Bel. Arthur Pérez Aguiar

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências, Câmpus do
Litoral Paulista, UNESP, para obtenção do
título de grau de Bacharel em Ciências
Biológicas com habilitação em Biologia
Marinha.

SÃO VICENTE – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

S586b Silva, Marjorie Jasper
Biodegradação do microplástico polietileno por fungos filamentosos
de manguezal e apicum / Marjorie Jasper Silva. -- São Vicente, 2023 39
f. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas)
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni
Coorientador: Arthur Pérez Aguiar

1. Biotecnologia. 2. Degradação biológica. 3. Microbiologia. 4. Fungos
Filamentosos. 5. Microplástico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a mim por ter chegado até aqui e ter sobrevivido até essa conquista.

Aos membros da minha família pelo suporte, em especial, meus avós, que eu amo de todo o meu coração, por sempre me acolherem e apoiarem nas minhas decisões e questões da vida. E ao meu pai que sempre foi um modelo pra mim tanto pela sua dedicação na vida pessoal quanto na acadêmica, do qual me orgulho muito. Espero um dia lhe dar o mesmo orgulho.

À Fenda, minha família em São Vicente, pelo acolhimento e companheirismo nos momentos de felicidade e tristeza. Que as memórias desse tempo vivam para sempre. Em especial, a Beatriz, Mariana e Manu por terem sido minhas companheiras fiéis nos últimos anos, por me demonstrar o quão acolhida e amada uma pessoa pode ser e, por terem me aguentado na pandemia, me mantendo sã e estável emocionalmente durante todo o período de faculdade.

À Gabi por ter me acompanhado e sustentado de longe nesse percurso.

À todas as pessoas que conheci no meu período na faculdade deixo aqui meus agradecimentos por terem contribuído de alguma forma na minha vida acadêmica e pessoal.

À Atlética, órgão ao qual dediquei todo o meu tempo livre da graduação e que me relembrou o quanto o esporte e o trabalho em equipe é importante pra mim.

À Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni por ter me apoiado e orientado durante esse período, não só no laboratório, mas na minha vida. Vou levar para sempre os conselhos e os momentos felizes.

A todos do laboratório, em especial, ao Arthur, a Claudia e à Tropa, por toda a ajuda e o suporte nesse momento tão especial da graduação.

À Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP) e ao IEAMar pela infraestrutura e oportunidade de aprendizado, aos funcionários e docentes que possibilitaram a chegada até aqui.

E, por fim, à Karla, minha cúmplice preferida, por todo amor e apoio e, ter sido a minha guia por todo o período de faculdade.

RESUMO

O plástico (PL) é um material versátil e amplamente utilizado pela sociedade. Devido a sua ampla mobilidade, o PL é referenciado como um potente agente poluidor, impactando na vida terrestre e aquática. Diferentes microrganismos, como os actinomicetos, algas, bactérias e fungos são descritos como potenciais organismos capazes de mitigar a presença deste contaminante. Dentre os microrganismos referenciados, os fungos filamentosos são reconhecidos como degradadores de uma variedade de compostos recalcitrantes e xenobióticos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi isolar e selecionar fungos filamentosos oriundos de sedimentos de manguezal e apicum com capacidade de biodegradar microplástico de polietileno (PE). A identificação das espécies fúngicas foi realizada por meio de análise macroscópica e microscópica de colônias. Os ensaios de biodegradação de PE ocorreram em meio líquido sob agitação contínua a temperatura de 30 °C por um período de 28 dias. As espécies fúngicas isoladas foram identificadas como *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. e *Penicillium* sp. Os melhores resultados relacionados à biodegradação do microplástico PE foram obtidos com o fungo pertencente ao gênero *Aspergillus* sp., atingindo uma taxa de redução de 45%. Os fungos dos gêneros *Rhizopus* sp. apresentaram capacidade de degradar o PE reduzindo a sua presença na faixa de 37% a 19%. Neste contexto, o presente estudo apresenta necessidade e possibilidade de isolar, identificar e utilizar novas espécies fúngicas capazes de biorremediar áreas impactadas pelo microplástico PE, assim como, outros tipos de microplásticos pertencentes a outras classes.

Palavras-chave: Manguezal; fungos filamentosos; polietileno; biodegradação.

ABSTRACT

Plastic is a versatile material widely used by society. Due to its wide mobility, plastic is referenced as a potent polluting agent, impacting on terrestrial and aquatic life. Different microorganisms, such as actinomycetes, algae, bacteria and fungi are described as potential organisms capable of mitigating the presence of this contaminant. Among the referenced microorganisms, filamentous fungi are recognized as degraders of a variety of recalcitrant and xenobiotic compounds. In this context, the objective of the present study was to isolate and select filamentous fungi from mangrove and apicum sediments capable of biodegrading polyethylene microplastic. The identification of fungal species was performed through macroscopic and microscopic analysis of colonies. The PE biodegradation tests took place in liquid medium under continuous agitation at a temperature of 30 °C for a period of 28 days. The isolated fungal species were identified as *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. and *Penicillium* sp. The best results related to the biodegradation of the PE microplastic were obtained with the fungus belonging to the genus *Aspergillus* sp., reaching a reduction rate of 45%. Fungi of the genus *Rhizopus* sp. showed the ability to degrade PE, reducing its presence in the range of 37% to 19%. In this context, the present study presents the need and possibility of isolating, identifying and using new fungal species capable of bioremediating areas impacted by PE microplastics, as well as other types of microplastics belonging to other classes.

Keywords: Mangrove; filamentous fungi; polyethylene; biodegradation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	7
1.1 Plástico.....	7
1.2 Microplástico	8
1.3 Formas de degradação do microplástico.....	9
1.4 Fungos filamentosos como microrganismo degradador	11
2 OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Microplástico	15
3.2 Coleta e análise de sedimento	15
3.3 Isolamentos de fungos filamentosos	17
3.4 Seleção de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplástico de polietileno	17
3.5 Técnicas e parâmetros analíticos de biodegradação	18
3.5.1 Avaliação de crescimento celular	18
3.5.2 Avaliação do microplástico residual.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4. 1 Tamanho e morfologia dos microplásticos de polietileno	19
4.2 Análise de sedimento	21
4.3 Isolamentos de fungos filamentosos	21
4.4 Seleção de linhagens biodegradadoras de microplástico de polietileno	25
5. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Plástico

O plástico (PL) está presente de forma direta ou indireta na maioria dos itens que compõem a vida cotidiana. A utilização deste tipo de material e a poluição gerada por ele, principalmente pelo seu descarte inadequado, é guiada pelo seu consumo desenfreado (Geyer *et al.*, 2017). O cenário previsto para o ano de 2030, sugere que haverá aproximadamente 90 milhões de toneladas de PL sendo descartadas, exclusivamente, nos sistemas aquáticos. O aumento desse descarte pode estar relacionado à crescente ocupação das áreas costeiras, aumentando exponencialmente a produção, utilização e descarte desses compostos (Borrelle *et al.*, 2020).

De acordo com Zalasiewicz *et al.* (2016) a rápida expansão na distribuição de PL está muito atrelada a sua mobilidade. Os autores destacam a sua vasta mobilidade no transporte aquático. Também comparam com outros materiais produzidos pelo homem, como o vidro e a cerâmica, que levaram muitos anos para alcançarem a mesma distribuição global, sendo pouco encontrados em ambientes marinhos, a contraponto do PL.

A quantificação específica de detritos encontrados no mar é inviável. Essa é uma poluição esteticamente desagradável, encontrada majoritariamente em forma de embalagens, deixadas por turistas, lixos gerados pelos navios, materiais de pesca artesanal, entre outros. Há também uma grande quantidade de insumos vindo de áreas povoadas e densamente industrializadas, incluindo rios e estações de tratamento de águas residuais que liberam partículas plásticas involuntariamente (Amaral-Zettler *et al.*, 2020).

Os PLs são amplamente utilizados nas embalagens de alimentos, bebidas, medicamentos, cosméticos, detergentes e outros tipos de produtos (Wang *et al.*, 2016; Anjana *et al.*, 2020). Com a incidência da pandemia de COVID-19, o consumo de PL aumentou drasticamente, tendo destaque materiais hospitalares como máscaras faciais, luvas e outros equipamentos de proteção individual (Singh *et al.*, 2020). O aumento em pedidos de alimentos on-line e itens diversos em restaurantes e lojas, gerou um uso exacerbado de plásticos descartáveis, reforçando a necessidade de buscar alternativas para lidar com esses acúmulos (Mittal *et al.*, 2022).

Com relação a composição desses polímeros, existem muitos tipos, sendo os mais comuns: polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloreto de polivinil (PVC), poliamida (PA), tereftalato de polietileno (PET) e álcool polivinílico (PVA). Quando liberado no oceano, seu destino ambiental depende principalmente da densidade do polímero, que influencia a flutuabilidade, posição na coluna d'água e a consequente possibilidade de interagir com a biota (Wright *et al.*, 2013). Polímeros mais densos que a água do mar, como o PVC, afundam, enquanto aqueles com menor densidade, por exemplo, PE e PP, tendem a flutuar na coluna de água (Luo *et al.*, 2022).

1.2 Microplástico

Os microplásticos (MPs) são partículas caracterizadas por apresentarem diâmetro ≤ 5 mm e ≥ 1 μ m (Frias *et al.*, 2019). Podem ser classificados como primários ou secundários, sendo os primários aqueles já produzidos em escala micro, como por exemplo, microesferas, pellets, grânulos, entre outros. Os secundários resultam da decomposição dos primários, através principalmente de degradação ambiental, como fragmentos de sacolas, filme plástico, tiras de roupas e embalagens, espumas, entre outros (Mato *et al.*, 2001; Chang, 2015; Napper *et al.*, 2015; Van Wezel *et al.*, 2015).

Devido principalmente ao seu tamanho, o PL tem alta mobilidade. O movimento atmosférico, conforme revelado por pesquisas recentes, pode transportar MPs de terras para oceanos e até para áreas remotas (Sorasan *et al.*, 2022; Bergmann *et al.*, 2019). Os MPs têm sido amplamente observados em amostras de água, sedimentos e organismos (Zuo *et al.*, 2020). Em relação aos organismos, eles estão sujeitos a diversos modos de contaminação por MPs. As partículas acabam sendo atrativas, devido a sua coloração, formatos e ocasionalmente pelas algas que se aglutinam nos MPs. Pelo tamanho, são facilmente ingeridos pelos animais marinhos de diversas formas, como por exemplo filtrados pelos organismos filtradores. Quando ingeridos causam diversos efeitos no comportamento alimentar, redução do desempenho predatório e na reprodução, além de induzir respostas inflamatórias, alterações histológicas, danos ao DNA, citotoxicidade, danos físicos e mortalidade (Ribeiro *et al.*, 2019).

Essas partículas estão sendo encontradas em toda a coluna de água, nas linhas costeiras, nos sedimentos do fundo do mar, esgoto e acumulam, principalmente, metais pesados, que entram no contínuo alimentar. Esses poluentes são intensificados nos níveis

nutricionais mais elevados, resultando na extinção de muitas espécies marinhas e de fauna (Zazouli *et al.*, 2022). Os aditivos mais conhecidos são os plastificantes (ftalatos), bisfenol A e compostos polibromados (retardadores de chama), mas muitos outros também são usados como pigmentos, biocidas e metais. As partículas de MPs possuem uma área superficial muito elevada, permitindo que a adsorção de poluentes orgânicos seja frequente, fornecendo um vetor para o transporte desses poluentes por partículas flutuando na água do mar por longas distâncias. Esses ao serem ingeridos por diversos animais acabam sendo lixiviados das partículas e entrando nos tecidos animais, muitas vezes interrompendo os processos bioquímicos normais nas células (Rummel *et al.*, 2019).

1.3 Formas de degradação do microplástico

O PL é muito resistente no ambiente, levando anos ou até séculos para se decompor de forma natural (Colton *et al.*, 2018; Leblanc, 2018). Com o propósito da redução desses resíduos, várias soluções e propostas estão sendo consideradas e estudadas, e se encontram subdivididas nas categorias: contenção, mitigação e remediação. O método de contenção tem a reciclagem e gestão adequada de aterro como propósito, enquanto a mitigação tem como proposta estratégias de redução dos PL em circulação global, tais como uso de regulamentos e medidas legislativas, além do controle de origem e programas de limpeza (Arpia *et al.*, 2021).

A remediação tem como objetivo lidar com o PL já presente no meio ambiente, visando diminuir a concentração por meio da degradação. Esse processo, quando no ambiente natural, pode ser realizado tanto de modo biótico quanto abiótico. A degradação abiótica se dá por meio de mudanças nas propriedades físico-químicas, tendo influência das condições naturais como temperatura, pH, umidade, salinidade, nível de oxigênio e luz (Guo *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2022). Enquanto a degradação biológica refere-se à ação de microrganismos (MOs), que possuem a capacidade de degradar compostos variados em estruturas mais simples por meio de reações bioquímicas (Alimi *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2018; Bahl *et al.*, 2021).

Os métodos de biodegradação têm um enorme potencial para fornecer uma alternativa mais limpa e ecológica. Desde a última década, a pesquisa em torno do isolamento de novas linhagens microbianas hábeis na degradação do plástico ganhou

interesse global (Danso *et al.*, 2019; Rai *et al.*, 2021). Os MPs servem como fonte de carbono para os MOs quando eles realizam a colonização, além de auxiliarem o crescimento de outros organismos (Yuan *et al.*, 2020). Após o sucesso da colonização na superfície dos PL, os MOs sintetizam e liberam enzimas intracelulares e extracelulares, dando início às etapas de biodeterioração, biofragmentação, assimilação e mineralização (Tiwari *et al.*, 2020).

Na biodeterioração, a etapa inicial, as enzimas liberadas na superfície do PL começam a agir, alterando as propriedades físicas e químicas e enfraquecendo as ligações. Na biofragmentação ocorre a clivagem dos polímeros complexos em formatos mais simples, como oligômeros, dímeros e monômeros. Para que a assimilação seja feita, esses polímeros mais simples são metabolizados por enzimas intracelulares, tendo então suas moléculas incorporadas por MOs. Por fim acontece a mineralização que é a produção de metabólitos oxidados, tais como dióxido de carbono, água, nitrogênio (Tiwari *et al.*, 2020; Amobonye *et al.*, 2021).

Os fatores que afetam a biodegradação na natureza são variados. As interações que afetam a degradação de MPs ainda não estão muito elucidadas. Entretanto, existem dois pontos principais: um relacionado aos MOs, crescimento e manutenção, e outro relacionado às características físico-químicas dos MPs e sua interação com o ambiente. Os MPs sofrem influência de características como densidade, peso molecular e cristalinidade, além de substituintes e aditivos presentes em suas estruturas (Wilkes *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2020).

A biodegradação, quando no ambiente externo, sofre influência principalmente de luz, calor e umidade. Esse impacto inclui duas singularidades, de um ângulo o ambiente afeta o crescimento e metabolismo de MOs, incluindo a biomassa microbiana e atividade de degradação, que por não estar em ambiente controlado, pode ser realizado por mais de uma espécie. Por outro ângulo, o ambiente de oxidação externa pode causar envelhecimento e danos aos MPs, o que também acelera a degradação e utilização dos MPs pelos MOs (Wilkes *et al.*, 2017; Tiwari *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2020; Amobonye *et al.*, 2021).

Alguns tipos de polímeros requerem geralmente condições de umidade e temperatura altas para biodegradação, sendo aproximadamente 70% de umidade e 55 °C, condições que nem sempre são encontradas no ambiente natural. Contudo, a abundância

de MOs também tem um impacto significativo no nível de degradação dos MPs, sendo mais comum no ambiente natural (Liao, 2021). Por fim, é possível notar uma lacuna nos padrões e métodos de teste para averiguar a biodegradabilidade de PL em ecossistemas de água doce (incluindo lagos, córregos e rios) e ambientes marinhos (Harrison *et al.*, 2018).

Diferentes MOs podem realizar a biodegradação e nos últimos tempos diversos actinomicetos, algas, bactérias e fungos estão sendo estudados com esse intuito, totalizando hoje mais de 400 micróbios registrados como capazes de degradação do plástico (Lear *et al.*, 2021). Contudo, a taxa de degradação de MPs parece ser relativamente lenta, retardando assim a utilização desses para aplicações industriais em tempo real. Ao mesmo passo que fungos de diferentes espécies têm se mostrado potenciais degradadores, tendo em base a sua capacidade de utilizar esses polímeros como fonte primária/única de carbono ou energia (Amobonye *et al.*, 2021; Asiandu *et al.*, 2022).

1.4 Fungos filamentosos como microrganismo degradador

Os fungos filamentosos (Ffs) são organismos de um grupo taxonômico grande, encontrados em todos os habitats do mundo e crescem como uma rede de células conhecidas como hifas. Como vivem em ambientes diversos, produzem enzimas naturais para degradação, pois sua nutrição é baseada em saprofagia (material morto em decomposição), parasitismo e/ou predação. São importantes mantenedores dos ciclos biogeoquímicos da terra e de seus nutrientes essenciais. Os Ffs são vastamente utilizados em diversos segmentos industriais devido à alta capacidade de produzir metabólitos secundários (Sánchez, 2020; Amobonye *et al.*, 2021; Lübeck *et al.*, 2022).

Os Ffs são reconhecidos por serem uma opção para remoção de elementos contaminantes do solo, pois desenvolveram uma resistência a diferentes tipos de poluentes (Soares, 2011; Daccò *et al.*, 2020). Esses organismos são exímios biodegradadores de uma variedade de compostos, incluindo os MPs. Os Ffs isolados de ambientes extremófilos merecem destaque, uma vez que sobrevivem em condições extremas de pressão, temperatura, salinidade e ausência de nutrientes (Barone *et al.*, 2019).

A complexidade da biodegradação do PL se deve às suas características químico-físicas e geralmente esse processo envolve o crescimento de fungos em sua superfície. Esses MOs utilizam o PL para sua nutrição, secretando enzimas como cutinase, lipase, proteases, carboxilesterases, esterases, enzimas lignocelulolíticas e alguns íons pró-oxidantes para degradar o polímero de elevado peso molecular em baixo peso molecular (Srikanth *et al.*, 2022; Temporiti *et al.*, 2022).

Atualmente, muitos estudos estão sendo realizados para averiguar quais fungos são degradadores de PL. Amobonye *et al.* (2021) destaca que gênero *Aspergillus* é um dos mais reportados quanto à capacidade de biodegradar MPs. Sáenz *et al.* (2019) avaliou a capacidade dos Ffs *A. niger* e *A. terreus*, obtidos em um manguezal equatoriano, no processo de biodegradação de polietileno de baixa densidade (LDPE) para aumentar a taxa de degradação sem nenhum pré-tratamento, obtendo então até 30% de perda de peso de MPs. Os Ffs, *A. clavatus*, *A. fumigatus* e *A. niger* são mais algumas espécies de *Aspergillus* isoladas de diferentes habitats terrestres e demonstraram biodegradar PE (Gajendiran *et al.*, 2016), PU (Osman *et al.*, 2018) e PP (Usman *et al.*, 2020), respectivamente. Outros gêneros e espécies de fungos estudados para degradação são também *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusariumsolani*, *Alternariasolani*, *Spicaria* sp., *Geomycespannorum*, *Phanerochaete*, *Phoma* sp., *Penicillium* sp. (Muhonja *et al.*, 2018; Ru *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020; Venkatesh *et al.*, 2021).

O papel dos fungos marinhos e algumas estratégias mais comuns para a degradação de vários tipos de polímeros também estão sendo avaliados (Iram *et al.*, 2019; Zeghal *et al.*, 2021). Com base na literatura revisada por Ekanayaka *et al.* (2022) foi constatado 200 registros de fungos capazes de realizar a biodegradação e estes então classificados taxonomicamente, sendo pertencentes a três grandes filos de fungos, Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota. Contudo, existem também estudos para realizar o aprimoramento da biodegradação fúngica utilizando métodos para pré-tratamento, como diferentes substratos envolvendo diferentes alterações, como foto-tratamento e temperatura regulada, pré-tratamento com ácido, além de uma variedade de aditivos (Corti *et al.*, 2010; Mahalakshmi; Andrew, 2012; Jeyakumar *et al.*, 2013; Sánchez, 2020).

Diante das problemáticas apresentadas pela presença de MPs no meio ambiente e o papel dos Ffs na biorremediação, o presente estudo é importante para fomentar a

possibilidade de biodegradação de polímeros por organismos, retirados da biota local sem técnicas acelerantes desse processo.

2 OBJETIVO

Identificar fungos filamentosos oriundos de sedimentos do manguezal e apicum com capacidade de biodegradar microplástico de polietileno

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microplástico

MPs de PE obtidos no comércio local de São Vicente/SP foram utilizados como material polimérico para os ensaios. Os MPs possuem granulometria máxima de 600 μm , índice de fluidez (190 °C / 2,16 kg) de 27-33 g.10 min⁻¹, densidade aparente máxima de 370 g.L⁻¹ e ponto de fusão de 100-122 °C.

Alíquotas iniciais de 25 g de MPs de PE foram peneiradas em malhas com intervalo de 500, 355, 250, 180, 125 e 63 μm utilizando vibrador mecânico para avaliação de faixas de tamanho existentes. O material retido em cada peneira foi analisado com o auxílio de estereoscópio para avaliação de cada categoria morfológica existente, como descrito por Hidalgo-Ruz (2012). Posteriormente, maiores quantidades de massa foram peneiradas e submetidas ao processo de seleção manual de forma que foram selecionadas microesferas plásticas para maior homogeneidade das amostras.

Ao final, os MPs de PE selecionados foram esterilizados com álcool 70%, secos em temperatura ambiente e, em seguida, irradiados com luz UV durante 30 minutos.

3.2 Coleta e análise de sedimento

Amostras de sedimentos foram obtidas na área de manguezal e apicum do Rio Una Prelado na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, em Peruíbe/SP (Figura 1). A cada ponto de amostragem, cerca de 50 g de sedimento foram coletados a uma profundidade de 1 a 5 cm em um quadrante de 5 cm².



Figura 1. Área de coleta de sedimentos a beira do Rio Una Prelado, Peruíbe/SP (Google Earth, 2022).

Nota: Os pontos de coleta de sedimentos apresentam as coordenadas: Manguezal Q1 (24°26'2.30"S, 47°5'57.9"O), Manguezal Q2 (24°26'1.9"S, 47°5'57.7"O), Manguezal Q3 (24°26'1.1"S, 47°5'57.6"O), Apicum Q1 (24°25'58.9"S, 47°5'56.5"O), Apicum Q2 (24°25'58.2"S, 47°5'57.6"O) e Apicum Q3 (24°25'58"S, 47°5'56.8"O).

Para um maior conhecimento da área onde foram isolados os fungos, foi realizado teste de teor de matéria orgânica a partir do sedimento (Calvet; Tucker, 1988; Lewis; McConchie, 1994). Inicialmente cerca de 10 g do material úmido de cada ponto de coleta foi seco por 24 h a 40 °C. Após a secagem, foi utilizado um almofariz para desagregação do sedimento seco e realizada a pesagem das amostras (Ps). Em seguida, cada amostra foi colocada em béquer de 1.000 mL contendo peróxido de hidrogênio (50 vol.) e posicionada sobre placa aquecedora (60-70 °C) para remoção de matéria orgânica presente. Cessada a reação, o volume do béquer foi completado com 600 mL com água destilada, retirando então os remanescentes orgânicos flutuantes, com ajuda de uma pequena peneira. Posteriormente, a amostra foi lavada e filtrada com água destilada e seca em estufa a 50 °C por 12 h. Por fim, foi pesado o material seco (Pf). Deste modo, o teor de matéria orgânica foi definido a partir da fórmula:

$$TMO = [(Ps - Pf)/Ps] \times 100$$

A demanda do teor de matéria orgânica então em avaliar se o Ff com maior capacidade de biodegradação de PE é proveniente de um local com muita ou pouca disponibilidade de matéria orgânica. Visto que os Ffs no solo se nutrem pela absorção da matéria orgânica, sendo então os principais responsáveis por essa decomposição (Alexopoulos *et al.*, 1996).

3.3 Isolamentos de fungos filamentosos

10g de sedimento foram adicionados de forma individualizada a um frasco Erlenmeyer de 250 mL que continha 45 mL de solução salina e Tween 80. A mistura foi posta em agitador rotativo a 100 rpm, temperatura constante de 30 °C por 1 h. A suspensão resultante foi filtrada a vácuo utilizando papel filtro qualitativo (45 µm) e diluída em série (10^{-9}). Um volume de 20 µl da suspensão foi inserida em placa de Petri contendo ágar de batata dextrose (PDA) e incubada a 30 °C por um período de 7 dias. As colônias fúngicas morfológicamente distintas foram subcultivadas e incubadas nas mesmas condições. Após o isolamento das colônias puras, os Ffs foram examinados microscópicamente por aplicação de técnica de microcultivos e identificados ao menor nível taxonômico de acordo com os procedimentos descritos por Barnett e Hunter (1998). As placas foram incubadas em duplicata.

3.4 Seleção de linhagens fúngicas biodegradadoras de microplástico de polietileno

Foram avaliados 4 isolados fúngicos (MQ1A, MQ1B, AQ2A e AQ3A) quanto a capacidade de biodegradar MPs de PE utilizando os protocolos adaptados de Paço *et al.* (2017) e Ameen *et al.* (2015). Cinco discos (5 mm) de micélio fúngico previamente crescido em PDA, foram adicionados a um frasco Erlenmeyer de 250 mL que continha 50 mL de meio de crescimento mínimo (MM: 2 g.L⁻¹ de glicose, 2 g.L⁻¹ de extrato de malte e 0,1 g.L⁻¹ de peptona) e 0,05 g de MP de PE.

As réplicas foram mantidas e amostradas após 7, 14, 21 e 28 dias. O tempo total de incubação total foi de 28 dias a uma temperatura de 30 °C sob uma agitação de 150 rpm. Foi feito o conjunto controle formado pela inoculação de micélio fúngico em meio de crescimento, para observar o crescimento da biomassa em meio ausente de MP. Já o controle por inoculação de MPs de PE em meio de crescimento sem o micélio fúngico, para verificar os efeitos derivados de sua presença no meio, foi mantido apenas na primeira e na última semana de avaliação. Ao final de cada período, os ensaios passaram por avaliação de crescimento celular (3.5.1) e avaliação de MP residual (3.5.2).

3.5 Técnicas e parâmetros analíticos de biodegradação

3.5.1 Avaliação de crescimento celular

Finalizados os ensaios, as amostras foram peneiradas e a biomassa fúngica foi lavada com água destilada e separada dos MPs por peneiramento com malha de 500 µm. Após esse processo, a biomassa passou por filtração a vácuo utilizando papel filtro qualitativo (45 µm) com o objetivo de remover a umidade. Em seguida, a biomassa foi inspecionada a fim de identificar e extrair possíveis MPs aderidos. Ao final, a biomassa foi submetida a secagem a 60 °C por 4 h para exame de peso seco.

3.5.2 Avaliação do microplástico residual

O material resultante do peneiramento, que continha MP, passou por secagem a 40 °C por 24 h seguido do registro do peso seco para analisar possível perda de massa. Quando observados MPs com massa fúngica, esses foram tratados com água oxigenada 30% durante 1 h de acordo com o método utilizado por Duan *et al.* (2020) e Wang *et al.* (2021) para remoção de matéria orgânica. Após o tratamento os MPs foram lavados com água destilada, filtrados a vácuo com papel filtro qualitativo (45 µm) para a remoção da umidade e secados novamente a 40 °C por 24 h.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1 Tamanho e morfologia dos microplásticos de polietileno

Após o peneiramento e a pesagem do material retido nas peneiras a alíquota inicial permitiu verificar que as classes de 250 μm e 355 μm foram as mais numerosas, sendo que a classe de 250 μm conteve aproximadamente 6,9 g de MPs de PE. Já as classes de 355 μm , 180 μm e 125 μm obtiveram aproximadamente 5,6 g, 4,6 g e 4,9 g de MPs, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Massa de 25 g de microplásticos de polietileno de acordo com classe granulométrica

Classe granulométrica (μm)	Massa (g)
500	0,2
355	5,6
250	6,9
180	4,6
125	4,9
63	1,7
Fundo	0,3

Utilizando como base estudos que investigaram a faixa granulométrica de MPs, é possível encontrar em maioria MPs de PE abaixo de 1.000 μm . Sun *et al.* (2021) realizaram um estudo em penínsulas chinesas onde 80% do MP estava na faixa de 53-300 μm , sendo PE a maior porcentagem em todos os locais. No leito do rio Nakdog, na Coreia do Sul, foram encontradas na superfície da água MPs menores que 300 μm , representando aproximadamente 75% das quantificadas, e no sedimento MPs menores que 300 μm representaram 81% (Eo *et al.*, 2019).

A avaliação da morfometria do MPs de PE possibilitou observar três morfologias: microesferas, microfibras e microfragmentos (Figura 2).

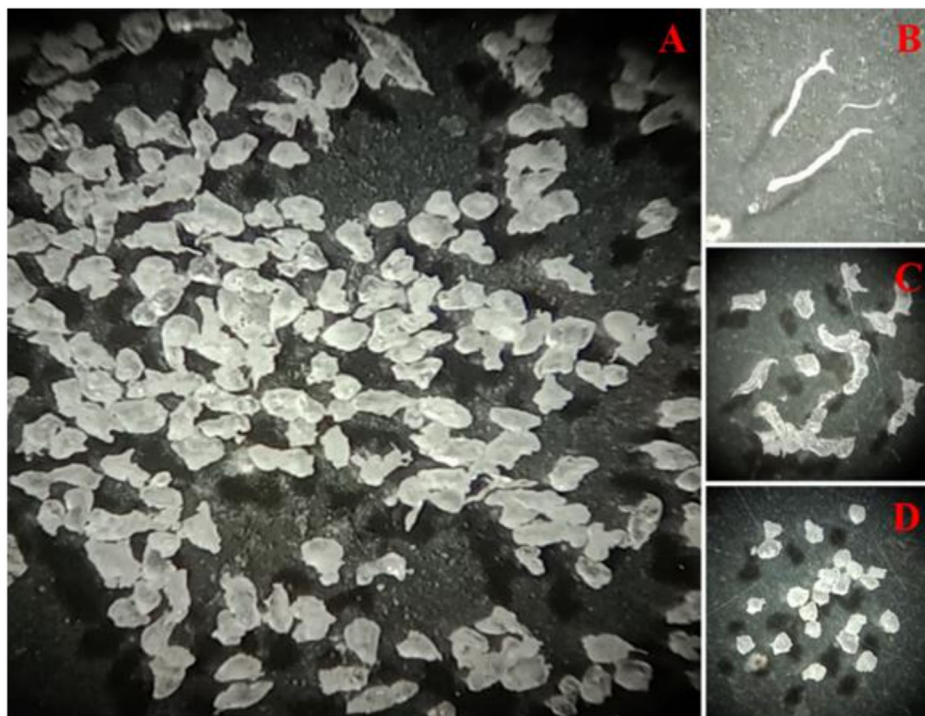


Figura 2. Morfologia do microplásticos de polietileno. **A:** micropartículas gerais, **B:** microfibra, **C:**microfragmento e **D:** microesfera. Imagem do autor, 2023

As microesferas não têm sido encontradas em grande quantidade em organismos, ao contrário das microfibras e microfragmentos que são mais vistos em alimentos e no sistema digestivo. Em cetáceos na costa da Grã-bretanha foram encontrados aproximadamente 84% de fibras e 16% de fragmentos, sendo de 500-1.000 μm os tamanhos mais encontrados (Nelms *et al.*, 2019). Contudo, as microesferas vêm sendo encontrados em pequenas porções em animais que são base da cadeia trófica, como peixes e bivalves, representando um possível risco para saúde humana devido a seu consumo (Smith *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021; Sridhar *et al.*, 2022).

Contendo poucos resultados com microesferas em organismos, pode-se observar maior presença em sedimento e em águas superficiais. Crew *et al.* (2020) analisaram as microesferas, menores que 400 μm , que representaram 95% de MPs encontradas em sedimento bentônico no Rio Saint Lawrence, no Canadá. Na Alemanha, Scherer *et al.* (2020) observaram na superfície do rio Elba microesferas representando 20% e no sedimento microesferas representaram 35,5%. Pozdnyakov *et al.* (2020) constataram na

água aproximadamente 1% de microesferas, em sedimento de fundo encontraram cerca de 4% de microesferas dos MPs, em amostras da Baía de Neva, no Golfo da Finlândia, mostrando que a quantidade de microesferas pode sofrer variação de acordo com a localidade estudada.

No que se refere aos MPs de PE foram encontrados estudos na Ilha Salinan, Itália, Renzi *et al.*, 2020 encontraram no sedimento aproximadamente 20% de PE, como em Fars, Irã, que PE representou 20,5% na faixa de 1-100 µm (Abassi *et al.*, 2021). Sarkar *et al.* (2019) analisaram no Rio Ganges, Índia, sedimentos da margem do rio onde PE representou aproximadamente 30% dos MPs encontrados.

4.2 Análise de sedimento

Os teores de matéria orgânica apresentaram porcentagens conforme descrito na Tabela 2. As maiores porcentagens foram verificadas nos pontos MQ1, MQ3, MQ2 e AQ2.

Tabela 2. Teor de matéria orgânica de cada quadrante de manguezal (M) e apicum (A)

Identificação	PI úmido	Ps	PfMo	Teor de M.O. (%)
AQ1	10g	7,4	6,7	9,5
AQ2	10g	7,5	6,3	16,0
AQ3	10g	7,5	6,7	10,7
MQ1	10g	4,7	3,2	31,9
MQ2	10g	6,6	5,5	16,7
MQ3	10g	6,2	4,8	22,6

Legenda: PI úmido: peso inicial úmido; Ps: peso sedimento seco; PfMo: peso final após ataque com ácido; Teor de M.O: teor de matéria orgânica

4.3 Isolamentos de fungos filamentosos

Foram isoladas 58 colônias fúngicas derivadas dos pontos de sedimento, de modo que 6 isolados puros foram obtidos. Em todos os pontos foram isolados linhagens

fúngicas, porém para esse trabalho e para os testes com MP foram escolhidas colônias dos pontos MQ1, AQ2 e AQ3. Desses foram escolhidas quatro linhagens de colônias puras para os próximos testes, essas foram chamadas de MQ1A, MQ1B, AQ2A e AQ3A (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos isolados e seus respectivos gêneros

Identificação	Gênero
MQ1A	<i>Penicillium</i> sp.
MQ1B	<i>Trichoderma</i> sp.
AQ2A	<i>Rhizopus</i> sp.
AQ3A	<i>Aspergillus</i> sp.

As amostras do sedimento de Manguezal demonstraram a presença de *Penicillium* sp. (MQ1A) (Figura 3), *Trichoderma* sp. (MQ1B) e (MQ2A) (Figura 4 e 5) e *Aspergillus* sp. (MQ3C) (Figura 6). Na amostra de Apicum, foi encontrada a presença de *Rhizopus* sp. (AQ2A) (Figura 7) e *Aspergillus* sp. (AQ3A) (Figura 8).

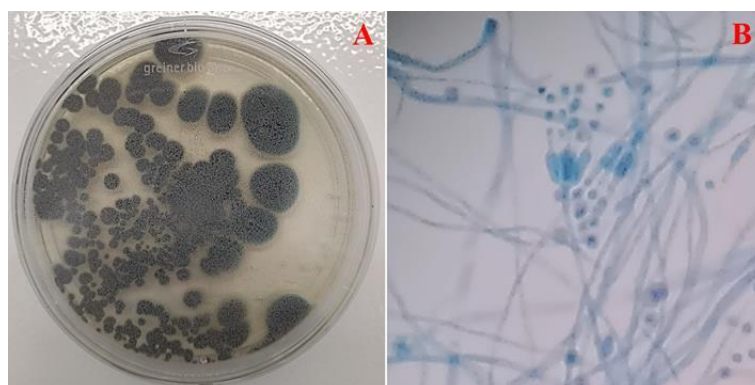


Figura 3. MQ1A: *Penicillium* sp. **A:** macromorfologia e **B:** micromorfologia

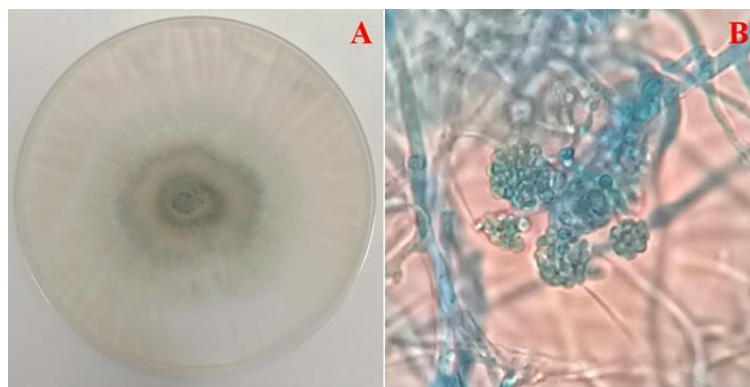


Figura 4. MQ1B: *Trichoderma* sp. **A:**macromorfologia e **B:**micromorfologia

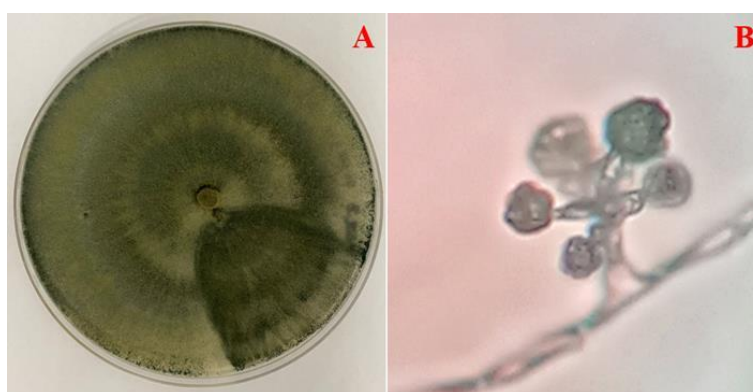


Figura 5. MQ2A: *Trichoderma* sp. **A:**macromorfologia e **B:**micromorfologia

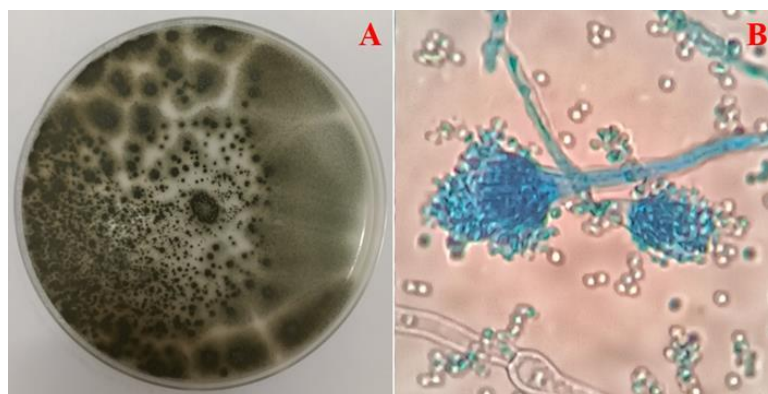


Figura 6. MQ1C: *Aspergillus* sp. **A:**macromorfologia e **B:**micromorfologia



Figura 7. AQ2A: *Rhizopus* sp. **A:**macromorfologia e **B:**micromorfologia

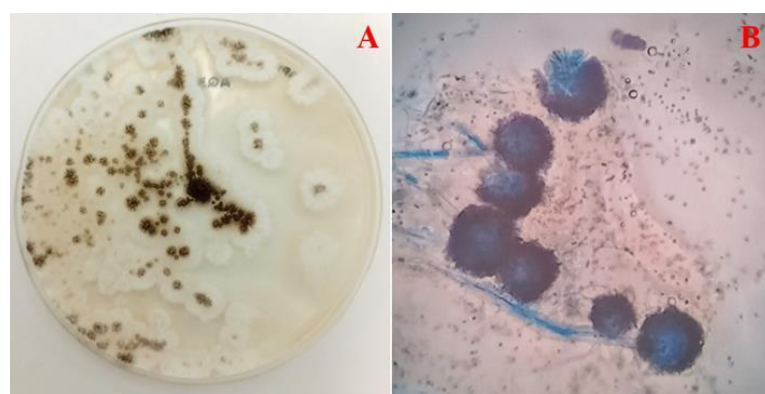


Figura 8. AQ3A: *Aspergillus* sp. **A:**macromorfologia e **B:**micromorfologia

Nos últimos anos houve o aumento dos estudos com MOs que degradam MPs, esses têm buscado novos potenciais principalmente com Ffs provenientes de ecossistemas marinhos. Maheswaran *et al.* (2023) realizaram um estudo onde a biodegradação de PET foi por um combinado de dois isolados bacterianos (*Sarcina aurantiaca* e *Bacillus subtilis*) e dois fúngicos (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*), de modo que obteve aproximadamente 29% de perda de peso em um período de 60 dias.

Recentemente, as interações plástico-fungos em ambientes marinhos foram revisadas por Zeghal *et al.* (2021), que listou mais de 60 registros de Ffs identificados em nível de espécie. Em outro estudo isolaram 45 espécies de Ffs de água marinha e sedimentos de Manguezal, sendo que sete desses demonstraram a capacidade de degradar PE, entre eles *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Penicillium duclauxii* e *P. vinaceum* (Ameen *et al.*, 2015). Devi *et al.* (2015) isolaram *Aspergillus tubingensis* VRKPT1 e *Aspergillus flavus* VRKPT2 de resíduos de PL despejados na área costeira no golfo de Mannar, na

Índia. A perda de peso do PE de com VRKPT1 e VRKPT2 foi de 6,02% e 8,51%, respectivamente.

4.4 Seleção de linhagens biodegradadoras de microplástico de polietileno

A triagem de biodegradação de MPs de PE pelas 4 linhagens fúngicas permitiu observar os resultados observados na Figura 9. É possível observar a biomassa de todos os fungos analisados e sua relação com o PE residual, onde pode-se observar as barras representando a biomassa e as linhas do MP residual. Conforme o tempo foi avançando, o MP foi reduzido, sendo constatado com a queda das linhas e a variação da biomassa. Em geral, a perda de massa dos MPs é um importante índice de monitoramento de biodegradação de MPs como observado por Zhang *et al.* (2020).

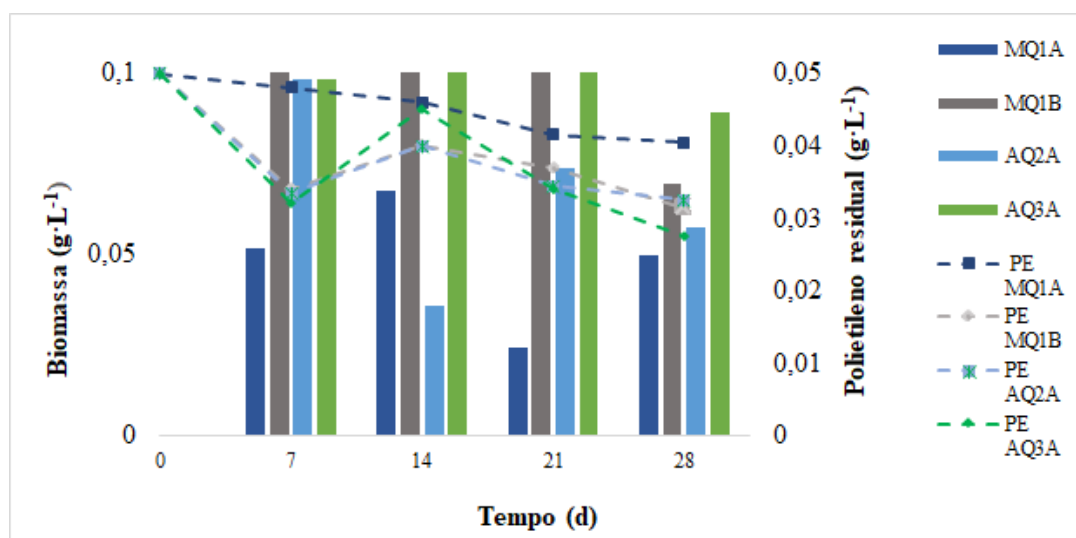


Figura 9. Ensaio de biodegradação de microplástico de polietileno, com biomassa e polietileno residual dos isolados

Em MQ1A (*Penicillium* sp.) pode-se observar a queda da média do MP residual a cada 7 dias tendo uma perda de peso de 19% de MP (Figura 10). Foi registrado o aumento da média da biomassa, exceto no tempo de 21 dias, onde o fungo sofreu uma perda de aproximadamente 2% em termos de biomassa. Na literatura existem exemplos conhecidos da biodegradação de PE por fungos, incluindo *Penicillium* sp. Singh e Gupta

(2014) avaliaram a degradação de MPs de PE, com *Penicillium* sp. e a taxa de degradação foi de 24%.

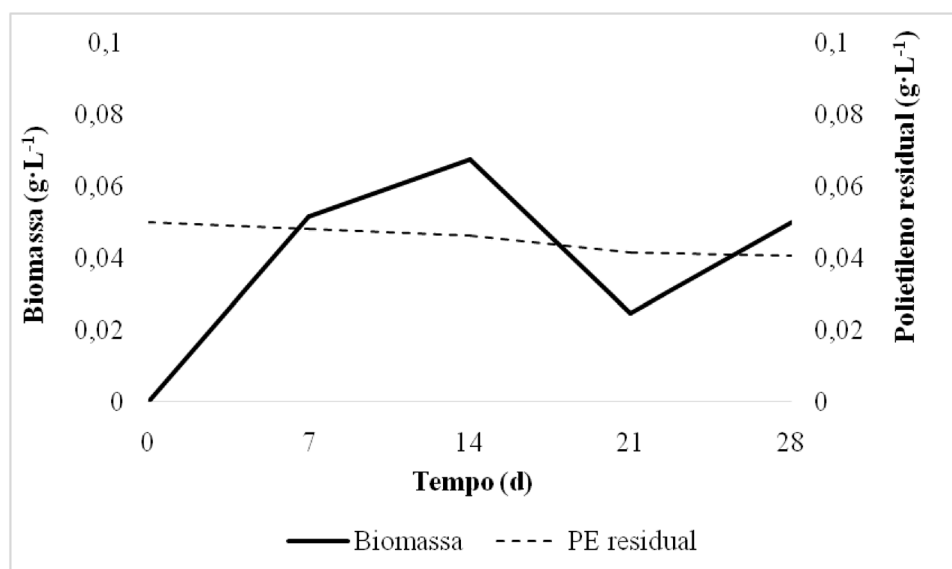


Figura 10. Ensaio de biodegradação de microplástico de polietileno, com biomassado isolado MQ1A e polietileno residual

Khan *et al.* (2021) isolaram 16 fungos de um aterro na Índia, desses na triagem escolheram o isolado *Penicillium citrinum* para o estudo de biodegradação. O PE demonstrou perda de peso de 38,82% sem pré-tratamento, com o estímulo do pré-tratamento com ácido nítrico a biodegradação foi significativamente estimulada e a perda de peso foi de 47,22%. Esse foi o primeiro estudo que apresentou alta competência de *P. citrinum* na degradação do PE sem pré-tratamento prévio.

Penicillium sp. também vem sendo muito estudado para remediação de outros contaminantes. Isolados foram testados quanto à capacidade de degradação do álcool polivinílico (PVA), a maior porcentagem de degradação foi registrada para *Penicillium polonicum* com 25,7% de degradação, reforçando assim a importância do estudo com MOs para vários tipos de poluentes (Metwally *et al.*, 2022).

Em MQ1B (*Trichoderma* sp.) pode-se observar que houve também uma queda na média de MP residual, sua perda de peso foi de 37%, houve perda significativa no peso da biomassa depois do momento do ápice, sendo essa de aproximadamente 80,5% (Figura 11). Munir *et al.* (2018) avaliaram o desempenho de *Trichoderma viride* e constatou degradação de 6,63% em 45 dias com filmes de PE.

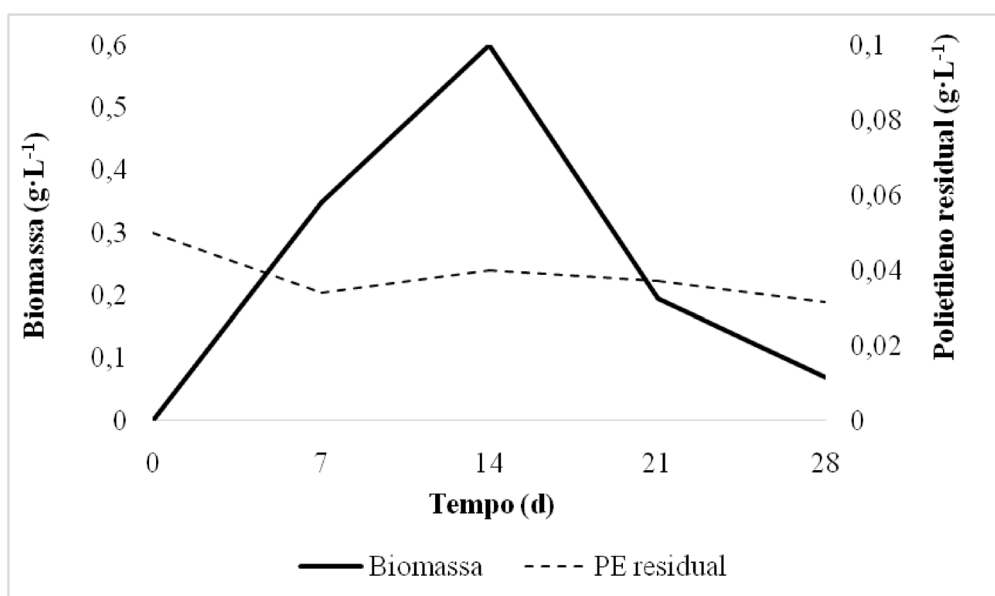


Figura 11. Ensaio de biodegradação de microplástico de polietileno, com biomassa do isolado MQ1B e polietileno residual

Sowmya *et al.* (2014) realizaram um estudo com *Trichoderma harzianum*, que utilizou enzimas fúngicas (lacase e peroxidase) do próprio isolado como pré-tratamento, o que resultou em uma redução de massa de 0,5% nos MPs tratados com lacase e de perda de massa de 0,6% com os tratados com peroxidase, ambos após 10 dias de incubação. Há muitos tipos de pré-tratamentos, como a utilização de Ultravioleta que aplicadas a uma variedade de MPs de PE pode dar resultados positivos (Malachová *et al.*, 2020). Novotný *et al.* (2022) mediu a redução de massa de filmes de PVC virgem quando degradados com *T. hamatum* e obteve degradação de aproximadamente 20% após 60 dias, demonstrando a resposta de *Trichoderma* sp. em outro tipo de PL.

MPs e pesticidas copoluem o solo e o ambiente aquático. Testar a resistência de Ffs e poluentes, e sua capacidade de degradação é uma questão que atualmente está ganhando espaço. Jasińska *et al.* (2022) observaram o estresse oxidativo induzido por MPs em *Trichoderma harzianum*, que já é conhecido por ser um Ffs degradador de metolacoloro. Os autores concluíram que a produção de biomassa e biodegradação de metolacoloro pelo fungo *T. harzianum* não é afetada por MPs, contudo a presença dos dois poluentes levou a uma redução na integridade da membrana celular e os outros resultados mostraram que as MPs geram estresse oxidativo em células de *T. harzianum*. Entender a interação de MPs e fungos pode ser um ponto de partida para novas pesquisas.

Em AQ2A (*Rhizopus* sp.) foi verificado queda da média do MP residual obtendo perda de peso de aproximadamente 35% e sofreu uma perda de aproximadamente 32,6% de biomassa (Figura 12). Seenivasagan *et al.* (2022) obtiveram um isolado fúngico, identificado como *Rhizopus oryzae*, de um local de descarte de PL, comprovando a degradação de PE por aumento de biomassa e redução do peso do MP (60%), no período de 60 dias sem utilização de pré-tratamentos como no presente estudo, corroborando com os resultados deste que obteve 37,3% de degradação em 28 dias.

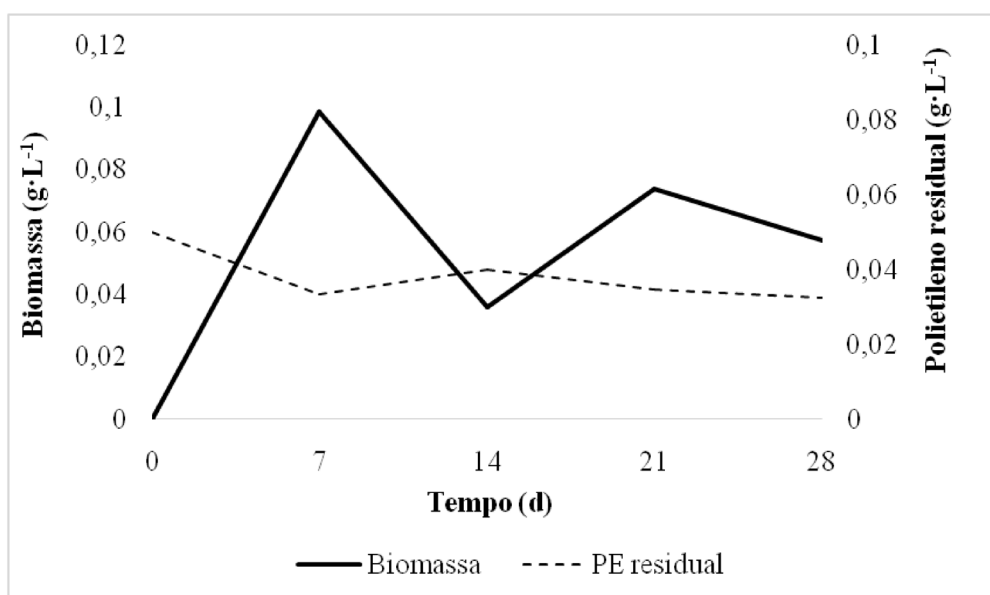


Figura 12. Ensaio de biodegradação de microplástico de polietileno, com biomassa do isolado AQ2A e polietileno residual

Harrat *et al.* (2022) avaliaram a biodegradabilidade de pedaços de uma mesma sacola plástica (0,2, 0,4 e 0,6 g) de PE. Nas peças de 0,4 g e 0,6 g houve uma diminuição no peso da sacola de 20%. Além disso, a biodegradação com *Rhizopus* sp. de pedaços de sacolas foi examinada na água do mar, água da torneira e com solo. Em meio natural, a maior diminuição de peso foi diferente dependendo do substrato: 5% em água do mar para a peça de 0,2 g, 10% em água da torneira para a peça de 0,4 g e 8% em solo para a peça de 0,4 g. Esse estudo mostra a versatilidade dos fungos em variados meios.

No ensaio com AQ3A (*Aspergillus* sp.) a perda de peso de MP foi de 45% (Figura 13). É notável que o ganho de massa após sete dias de ensaio foi pouco, e a taxa de consumo do PE também foi baixa. Podendo indicar que o isolado estava consumindo sua reserva energética, após esse período houve aumento da biomassa, indicando um possível

consumo do meio seguido dos MPs de PE. Fungos *Aspergillus* sp. são conhecidos por participarem na degeneração de PE (Chattopadhyay *et al.*, 2022).

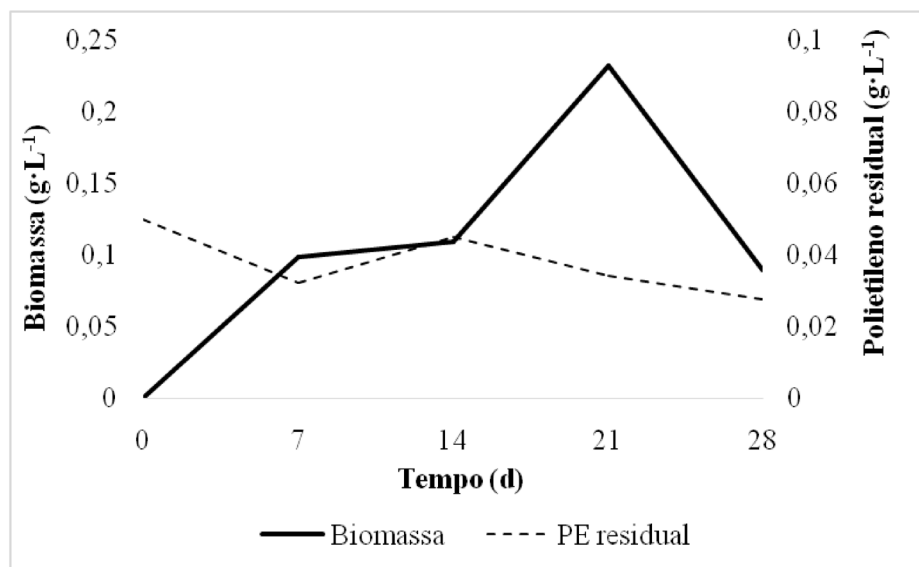


Figura 13. Ensaio de biodegradação de microplástico de polietileno, com biomassa do isolado AQ3A e polietileno residual

Eldin *et al.* (2022) isolaram MOs de manguezal, entre eles *Aspergillus terreus*, para ensaios com pedaços de sacolas de PE, onde esse provou sua superioridade ao atingir 24% de perda no peso da amostra de sacolas. Muhonja *et al.* (2018) constataram que a maior atividade de degradação com folhas de PE foi uma redução de peso média de 36,4% atribuída a *Aspergillus oryzae*, isolado de lixão no Quênia.

Jayaprakash *et al.* (2018) também analisaram a degradação de PE com *A. oryzae* porém utilizando pré-tratamento com ácido palmítico, o PE apresentou 33% de perda de peso no MP de cor preta e 40% de perda de peso no MP de cor verde, no período de 90 dias. Mostrando que a eficiência de espécies de *Aspergillus* aumenta com a utilização de pré-tratamento.

Com relação aos controles, que tinham ausência de MPs de PE, os isolados demonstraram crescimento um pouco abaixo que os tratamentos, mostrando que houve mais produção de biomassa pelo inóculo apenas quando estava com o MP. Entretanto, no geral, tanto no tratamento quanto nos controles, foi observado que entre o 14º e o 21º dia todos apresentaram um crescimento curto de biomassa seguido de um declínio. Sugerindo então que nos primeiros 15 dias houve consumação mínima do meio e a possibilidade do

próprio isolado ter feito uso de sua reserva energética como fonte de nutrientes, ao final desse consumo pode ter-se iniciado o consumo total do meio, justificando a perda de biomassa por ausência de nutrientes próprios.

5. CONCLUSÃO

Este estudo avaliou o potencial de linhagens fúngicas isoladas de ambiente marinho em degradar MPs de PE com morfologia de microesferas. Na literatura não é muito ocorrente estudos com microesferas, por isso apresentamos também uma diversidade de fungos com capacidade de biorremediação. Esse estudo atende a Agenda 2030 proposta pela Organização das Nações Unidas nos objetivos 14 e 15, respondendo à atual necessidade de novas alternativas para minimizar e mitigar a presença destes materiais nos ecossistemas, principalmente no marinho.

A linhagem fúngica *Aspergillus sp.*, demonstrou o melhor resultado com a biodegradação. Até então ficou evidenciado que este organismo cresce em meio de crescimento mínimo na presença de MP, o que sugere que esse fungo utilizou MP como substrato. A análise da matéria orgânica do local de onde o fungo foi isolado mostrou teor de valor médio. Mais estudos são necessários para avaliar os prováveis mecanismos dos fungos em usar o PE, e outros tipos de MPs, como substrato. No futuro além de mais estudos para acelerar a utilização dessa técnica para biodegradação em grande escala, também se faz necessário trabalhos mais completos indicando outras técnicas e parâmetros analíticos de biodegradação, como demanda bioquímica de oxigênio, liberação de CO₂, produção de enzimas e análises como redução ou aumento no teor de lipídios e proteínas, além de variação na concentração de carboidratos.

REFERÊNCIAS

- Abbasi, S., & Turner, A. (2021). Dry and wet deposition of microplastics in a semi-arid region (Shiraz, Iran). **Science of the Total Environment**, **786**, 147358.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). **Introductory mycology** (No. Ed. 4). John Wiley and Sons.
- Alimi, O. S., FarnerBudarz, J., Hernandez, L. M., & Tufenkji, N. (2018). Microplastics and nanoplastics in aquatic environments: aggregation, deposition, and enhanced contaminant transport. **Environmental science & technology**, **52(4)**, 1704-1724.
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., & Mincer, T. J. (2020). Ecology of the plastisphere. **Nature Reviews Microbiology**, **18(3)**, 139-151.
- Ameen, F; Moslem, M.; Hadi, S. & Al-Sabri, A.E. (2015). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mangrove fungi from the Red Sea coast. **Progress in Rubber, Plastics and Recycling Technology**, **31(2)**.
- Amereh, F., Babaei, M., Eslami, A., Fazelipour, S., & Rafiee, M. (2020). The emerging risk of exposure to nano (micro) plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: from a hypothetical scenario to a global public health challenge. **Environmental Pollution**, **261**, 114158.
- Amobonye, A.; Bhagwat, P.; Singh, S. & Pillai, S. (2021). Plastic biodegradation: frontline microbes and their enzymes. **Science of the Total Environment**, **759**: 143536.
- Andrady, A.L. (2017). The plastic in microplastics: a review. **Marine Pollution Bulletin**, **119(1)**: 12-22.
- Arpia, A. A., Chen, W. H., Ubando, A. T., Naqvi, S. R., & Culaba, A. B. (2021). Microplastic degradation as a sustainable concurrent approach for producing biofuel and obliterating hazardous environmental effects: a state-of-the-art review. **Journal of Hazardous Materials**, **418**, 126381.
- Asiandu, A. P., Wahyudi, A., & Sari, S. W. (2022). Aquatic plastics waste biodegradation using plastic degrading microbes. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, **11(5)**, e3724.
- Bahl, S., Dolma, J., Singh, J. J., & Sehgal, S. (2021). Biodegradation of plastics: a state of the art review. **Materials Today: Proceedings**, **39**, 31-34.
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera of imperfect Fungi: fourth edition. Amer Phytopathological Society, 4a Edição, 240p.
- Barone, G.; Varrella, S.; Tangherlini, M.; Rastelli, E.; Dell'Anno, A.; Danovaro, R. & Corinaldesi, C. (2019). Marine fungi: biotechnological perspectives from deep-hypersaline anoxic basins. **Diversity**, **11(7)**: 113.
- Bergmann, M., Mützel, S., Pimpke, S., Tekman, M. B., Trachsel, J., & Gerdt, G. (2019). White and wonderful? Microplastics prevail in snow from the Alps to the Arctic. **Science advances**, **5(8)**, eaax1157.
- Bour, A., Avio, C. G., Gorbi, S., Regoli, F., & Hylland, K. (2018). Presence of microplastics in benthic and epibenthic organisms: Influence of habitat, feeding mode and trophic level. **Environmental Pollution**, **243**, 1217-1225.

- Calvet, F., & Tucker, M. E. (1988). Outer ramp cycles in the Upper Muschelkalk of the Catalan Basin, northeast Spain. **Sedimentary Geology**, **57**(3-4), 185-198.
- Chattopadhyay, I. (2022). Role of microbiome and biofilm in environmental plastic degradation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, **39**, 102263.
- Colton, K., Harmer, C., Isom, B., & Shughart II, W. F. (2018). **Plastic Pollution**.
- Corti, A., Muniyasamy, S., Vitali, M., Imam, S. H., & Chiellini, E. (2010). Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. **Polymer Degradation and Stability**, **95**(6), 1106-1114.
- Crew, A.; Gregory-Eaves, I. & Ricciardi, A. (2020). Distribution, abundance, and diversity of microplastics in the upper St. Lawrence River. **Environmental Pollution**, **260**: 113994.
- Daccò, C., Girometta, C., Asemoloye, M. D., Carpani, G., Picco, A. M., & Tosi, S. (2020). Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, **147**, 104866.
- Danso, D., Chow, J., & Streit, W. R. (2019). Plastics: environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. **Applied and environmental microbiology**, **85**(19), e01095-19.
- Deng, Y., Yan, Z., Shen, R., Huang, Y., Ren, H., & Zhang, Y. (2021). Enhanced reproductive toxicities induced by phthalates contaminated microplastics in male mice (*Mus musculus*). **Journal of Hazardous Materials**, **406**, 124644.
- Devi, R. S., Kannan, V. R., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S., & Antony, A. R. (2015). Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. **Marine pollution bulletin**, **96**(1-2), 32-40.
- Ding, J.; Sun, C.; He, C.; Li, J.; Ju, P. & Li, F. (2021). Microplastics in four bivalve species and basis for using bivalves as bioindicators of microplastic pollution. **Science of the Total Environment**, **782**(15): 146830.
- Duan, J.; Han, J.; Zhou, H.; Lau, Y.L.; An, W.; Wei, P.; Cheung, S.G.; Yang, Y. & Tam, N.F. (2020). Development of a digestion method for determining microplastic pollution in vegetal-rich clayey mangrove sediments. **Science of the Total Environment**, **707**: 136030.
- Ekanayaka, A. H., Tibpromma, S., Dai, D., Xu, R., Suwannarach, N., Stephenson, S. L., & Karunarathna, S. C. (2022). A Review of the Fungi That Degrade Plastic. **Journal of Fungi**, **8**(8), 772.
- Eldin, A. M., Al-Sharnouby, S. F. S., ElGabry, K. I. M., & Ramadan, A. I. (2022). *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp. and *Bacillus* sp. isolated from mangrove soil having laccase and peroxidase role in depolymerization of polyethylene bags. **Process Biochemistry**, **118**, 215-226.
- Eo, S., Hong, S. H., Song, Y. K., Han, G. M., & Shim, W. J. (2019). Spatiotemporal distribution and annual load of microplastics in the Nakdong River, South Korea. **Water research**, **160**, 228-237.

- Frias, J.P.G.L. & Nash, R. 2019. Microplastics: finding a consensus on the definition. **Marine Pollution Bulletin**, **138**: 145-147.
- Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., & Abraham, J. (2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. **3 Biotech**, **6**(1), 1-6.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science advances**, **3**(7), e1700782.
- Guo, X., & Wang, J. (2019). The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, **142**, 1-14.
- Harrat, R., Bourzam, G., Ouled-Haddar, H., & Soumati, B. (2022). In Vitro and Ex Situ Biodegradation of Low-Density Polyethylene by a *Rhizopus* sp. Strain Isolated from a Local Dumpsite in North-East Algeria: 10.32526/ennrj/20/202200026. **Environment and Natural Resources Journal**, **20**(5), 465-474.
- Harrison, J. P., Boardman, C., O'Callaghan, K., Delort, A. M., & Song, J. (2018). Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. **Royal Society Open Science**, **5**(5), 171792.
- Hidalgo-Ruz, V.; Gutow, L.; Thompson, R.C.; & Thiel, M. (2012). Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. **Environmental Science & Technology**, **46**, 3060-3075.
- Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. **Critical Reviews in Biotechnology**, **38**(2), 308-320.
- Iram, D., Riaz, R., & Iqbal, R. K. (2019). Usage of potential micro-organisms for degradation of plastics. **Open Journal of Environmental Biology**, **4**(1), 007-015.
- Jayaprakash, V., & Palempalli, U. M. D. (2018). Effect of palmitic acid in the acceleration of polyethylene biodegradation by *Aspergillus oryzae*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, **12**(4), 2259-2269.
- Jeyakumar, D., Chirsteen, J., & Doble, M. (2013). Synergistic effects of pretreatment and blending on fungi mediated biodegradation of polypropylenes. **Bioresource technology**, **148**, 78-85.
- Jyoti, S., & Gupta, K. C. (2014). Screening and identification of low density polyethylene (LDPE) degrading soil fungi isolated from polythene polluted sites around Gwalior city (MP). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, **3**(6), 443-448.
- Jasińska, A., Różalska, S., Rusetskaya, V., Słaba, M., & Bernat, P. (2022). Microplastic-Induced Oxidative Stress in Metolachlor-Degrading Filamentous Fungus *Trichoderma harzianum*. **International Journal of Molecular Sciences**, **23**(21), 12978.
- Khan, S., Ali, S. A., & Ali, A. S. (2022). Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by mesophilic fungus '*Penicillium citrinum*' isolated from soils of plastic waste dump yard, Bhopal, India. **Environmental Technology**, **1-15**.

- Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank, J. A., & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. **Environmental Microbiome**, **16**(1), 1-19.
- Leblanc, R., “How Long Does It Take Garbage to Decompose?” (2018). The Balance | Sustainability Resources, accessed April 25.
- Lewis, D. W., & McConchie, D. (1994). Composition of detrital sediments. **In Practical sedimentology** (pp. 128-152). Springer, Boston, MA.
- Liao, J., & Chen, Q. (2021). Biodegradable plastics in the air and soil environment: Low degradation rate and high microplastics formation. **Journal of Hazardous Materials**, **418**, 126329.
- Lin, Z., Jin, T., Zou, T., Xu, L., Xi, B., Xu, D., & Fei, J. (2022). Current progress on plastic/microplastic degradation: Fact influences and mechanism. **Environmental Pollution**, 119159.
- Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2022). Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. **Microorganisms**, **10**(4), 753.
- Luo, H., Liu, C., He, D., Xu, J., Sun, J., Li, J., & Pan, X. (2022). Environmental behaviors of microplastics in aquatic systems: A systematic review on degradation, adsorption, toxicity and biofilm under aging conditions. **Journal of Hazardous Materials**, **423**, 126915.
- Mahalakshmi, V., & Andrew, S. N. (2012). Assessment of Physicochemically treated plastic by fungi. **Annals of Biological Research**, **3**(9), 4374-4381.
- Maheswaran, B., Al-Ansari, M., Al-Humaid, L., Raj, J. S., Kim, W., Karmegam, N., & Rafi, K. M. (2023). In vivo degradation of polyethylene terephthalate using microbial isolates from plastic polluted environment. **Chemosphere**, **310**, 136757.
- Malachová, K., Novotný, Č., Adamus, G., Lotti, N., Rybková, Z., Soccio, M., & Fava, F. (2020). Ability of *Trichoderma hamatum* isolated from plastics-polluted environments to attack petroleum-based, synthetic polymer films. **Processes**, **8**(4), 467.
- Metwally, M. A., Bedaiwy, M. Y., El-Sebaei, N. A., & El-Badry, A. S. (2022). Isolation of Polyvinyl Alcohol Degrading Fungi and Improvement of Degradation Activity. **Egyptian Journal of Microbiology**.
- Mittal, M., Mittal, D., & Aggarwal, N. K. (2022). Plastic accumulation during COVID-19: call for another pandemic; bioplastic a step towards this challenge?. **Environmental Science and Pollution Research**, 1-15.
- Muhonja, C. N., Makonde, H., Magoma, G., & Imbuga, M. (2018). Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya. **PloSone**, **13**(7), e0198446.
- Munir, E., Harefa, R. S. M., Priyani, N., & Suryanto, D. (2018). Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. **In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** (Vol. 126, No. 1, p. 012145). IOP Publishing.

Nelms, S. E., Barnett, J., Brownlow, A., Davison, N. J., Deaville, R., Galloway, T. S., & Godley, B. J. (2019). Microplastics in marine mammals stranded around the British coast: ubiquitous but transitory?. **Scientific Reports**, **9**(1), 1-8.

Novotný, Č., Fojtík, J., Mucha, M., & Malachová, K. (2022). Biodeterioration of Compost-Pretreated Polyvinyl Chloride Films by Microorganisms Isolated From Weathered Plastics. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 10.

Osman, M., Satti, S. M., Luqman, A., Hasan, F., Shah, Z., & Shah, A. A. (2018). Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil. **Journal of Polymers and the Environment**, **26**(1), 301-310.

Paço, A.; Duarte, K.; da Costa, J.P.; Santos, P.S.M.; Pereira, R.; Pereira, M.E.; Freitas, A.C.; Duarte, A.C. & Rocha-Santos, T.A.P. (2017). Biodegradation of polyethylene microplastics by the marine fungus *Zalerion maritimum*. **Science of the Total Environment**, **586**(15): 10-15.

Pazos, RS, Spaccesi, F., & Gomez, N. (2020). Primeiro registro de microplásticos no mexilhão *Limnoperna fortunei*. **Estudos Regionais em Ciências Marinhas**, **38**, 101360.

Pozdnyakov, S. R., Ivanova, E. V., Guzeva, A. V., Shalunova, E. P., Martinson, K. D., & Tikhonova, D. A. (2020). Studying the concentration of microplastic particles in water, bottom sediments and subsoils in the coastal area of the Neva Bay, the Gulf of Finland. **Water resources**, **47**(4), 599-607.

Rai, P., Mehrotra, S., Priya, S., Gnansounou, E., & Sharma, S. K. (2021). Recent advances in the sustainable design and applications of biodegradable polymers. **Bioresource technology**, **325**, 124739.

Renzi, M., Blašković, A., Broccoli, A., Bernardi, G., Grazioli, E., & Russo, G. (2020). Chemical composition of microplastic in sediments and protected detritivores from different marine habitats (Salina Island). **Marine Pollution Bulletin**, **152**, 110918.

Ribeiro, F., O'Brien, J. W., Galloway, T., & Thomas, K. V. (2019). Accumulation and fate of nano-and micro-plastics and associated contaminants in organisms. **TrAC Trends in analytical chemistry**, **111**, 139-147.

Ru, J.; Huo, Y. & Yang, Y. (2020). Microbial degradation and valorization of plastic wastes. **Frontiers in Microbiology**, **11**: 442.

Rummel, C. D., Escher, B. I., Sandblom, O., Plassmann, M. M., Arp, H. P. H., MacLeod, M., & Jahnke, A. (2019). Effects of leachates from UV-weathered microplastic in cell-based bioassays. **Environmental science & technology**, **53**(15), 9214-9223.

Sáenz, M., Borodulina, T., Diaz, L., & Banchon, C. (2019). Minimal conditions to degrade low density polyethylene by *Aspergillus terreus* and *Niger*. **Journal of Ecological Engineering**, **20**(6).

Sánchez, C. (2020). Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: an overview of macro- and microplastics biodegradation. **Biotechnology Advances**, **40**: 107501.

Sarkar, D. J., Sarkar, S. D., Das, B. K., Manna, R. K., Behera, B. K., & Samanta, S. (2019). Spatial distribution of meso and microplastics in the sediments of river Ganga at eastern India. **Science of the Total Environment**, **694**, 133712.

Borrelle, S. B., Ringma, J., Law, K. L., Monnahan, C. C., Lebreton, L., McGivern, A., & Rochman, C. M. (2020). Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. **Science**, **369**(6510), 1515-1518.

Scherer, C., Weber, A., Stock, F., Vurusic, S., Egerci, H., Kochleus, C., & Reifferscheid, G. (2020). Comparative assessment of microplastics in water and sediment of a large European river. **Science of the Total Environment**, **738**, 139866.

Seenivasagan, R.; Karthika, A. & Poonkuzhali, K. (2022). In Vitro and In Silico Study of the Efficacy of Fungi in Low-Density Polyethylene Degradation in a Disposal Paper Cup. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. **233**, n. 3, p. 1-12.

Singh, N., Tang, Y., Zhang, Z., & Zheng, C. (2020). COVID-19 waste management: effective and successful measures in Wuhan, China. **Resources, conservation, and recycling**, **163**, 105071.

Smith, M., Love, D.C., Rochman, C.M. & Neff, R.A. (2018) Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. **Current Environmental Health Reports**, **5**, 375-386

Soares, I. A., Flores, A. C., Mendonça, M. M., Barcelos, R. P., & Baroni, S. (2020). Fungi in the bioremediation of degraded areas. **Arquivos do Instituto Biológico**, **78**, 341-350.

Sorasan, C., Edo, C., González-Pleiter, M., Fernández-Piñas, F., Leganés, F., Rodríguez, A., & Rosal, R. (2022). Ageing and fragmentation of marine microplastics. **Science of The Total Environment**, 154438.

Wright, S. L., Thompson, R. C., Galloway, T. S., (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution** **178**, 483-492.

Sowmya, H. V., Krishnappa, M., & Thippeswamy, B. (2014). Degradation of polyethylene by *Trichoderma harzianum*—SEM, FTIR, and NMR analyses. **Environmental monitoring and assessment**, **186**(10), 6577-6586.

Sridhar, A., Kannan, D., Kapoor, A., & Prabhakar, S. (2022). Extraction and detection methods of microplastics in food and marine systems: a critical review. **Chemosphere**, **286**, 131653.

Srikanth, M., Sandeep, T. S. R. S., Sucharitha, K., & Godi, S. (2022). Biodegradation of plastic polymers by fungi: a brief review. **Bioresources and Bioprocessing**, **9**(1), 1-10.

Sun, X.; Wang, T.; Chen, B.; Booth, A.M.; Liu, S.; Wang, R.; Zhu, L.; Zhao, X.; Qu, K. & Xia, B. (2021). **Journal of Hazardous Materials**, **410**: 124982.

Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. **Microorganisms**, **10**(6), 1180.

Tiwari, N., Santhiya, D., & Sharma, J. G. (2020). Microbial remediation of micro-nano plastics: current knowledge and future trends. **Environmental Pollution**, **265**, 115044.

Usman, M. A., Momohjimoh, I., & Usman, A. O. (2020). Mechanical, physical and biodegradability performances of treated and untreated groundnut shell powder recycled polypropylene composites. **Materials Research Express**, **7**(3), 035302.

Venkatesh, S.; Mahboob, S.; Govindarajan, M.; Al-Ghanim, K.A.; Ahmed, Z.; Al-Mulhm, N.; Gayathri, R. & Vijayalakshmi, S. (2021). Microbial degradation of plastics:

sustainable approach to tackling environmental threats facing big cities of the future. **Journal of King Saud University – Science**, **33(3)**: 101362.

Wang, D.; Su, L.; Ruan, H.D.; Chen, J.; Lu, J.; Lee, C.H. & Jiang, S.Y. (2021). Quantitative and qualitative determination of microplastics in oyster, seawater and sediment from the coastal areas in Zhuhai, China. **Marine Pollution Bulletin**, **164**: 112000.

Wang, F.; Wu, H.; Wu, W.; Wang, L.; Liu, J.; An, L. & Xu, Q. (2021). Microplastic characteristics in organisms of different trophic levels from Liaohe Estuary, China. **Science of the Total Environment**, **789**: 148027.

Wilkes, R. A. & Aristilde, L. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. **Journal of applied microbiology**, **123(3)**, 582-593.

Wróbel, M., Szymańska, S., Kowalkowski, T. & Hryniewicz, K. (2022). Selection of microorganisms capable of polyethylene (PE) and polypropylene (PP) degradation. **Microbiological Research**, 127251.

Yuan, J., Ma, J., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, Y. & Yu, F. (2020). Microbial degradation and other environmental aspects of microplastics/plastics. **Science of the Total Environment**, **715**, 136968.

Zalasiewicz, J., Waters, C. N., do Sul, J. A. I., Corcoran, P. L., Barnosky, A. D., Cearreta, A. & McNeill, J. R. (2016). The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. **Anthropocene**, **13**, 4-17.

Zazouli, M., Nejati, H., Hashempour, Y., Dehbandi, R., & Fakhri, Y. (2022). Occurrence of microplastics (MPs) in the gastrointestinal tract of fishes: A global systematic review and meta-analysis and meta-regression. **Science of The Total Environment**, 152743.

Zuo, L., Sun, Y., Li, H., Hu, Y., Lin, L., Peng, J., & Xu, X. (2020). Microplastics in mangrove sediments of the Pearl River Estuary, South China: Correlation with halogenated flame retardants' levels. **Science of The Total Environment**, **725**, 138344.

Zeghal, E., Vaksmaa, A., Vielfaure, H., Boekhout, T., & Niemann, H. (2021). The Potential Role of Marine Fungi in Plastic Degradation—A Review. **Frontiers in Marine Science**, **8**, 738877.

Zhang, J., Gao, D., Li, Q., Zhao, Y., Li, L., Lin, H., & Zhao, Y. (2020). Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. **Science of the Total Environment**, **704**, 135931.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: MARJORIE JASPER SILVA

Título: "BIODEGRADAÇÃO DE MICROPLÁSTICOS POR FUNGOS FILAMENTOSOS DE MANGUEZAL."

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	aprovado
MSC. Ana Laura Pires de Oliveira	aprovado

PARECER:

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Marjorie Jasper Silva** obteve o seguinte conceito:



APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 27 de janeiro de 2023.



Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni



MSC. Ana Laura Pires de Oliveira