

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica **das Ciências** **Biológicas e** **da Natureza 3**

Atena
Editora
Ano 2019

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof.^a Dr.^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof.^a Dr.^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 3 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 3) Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-359-0 DOI 10.22533/at.ed.590192705 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série. CDD 610.72
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INIBIÇÃO DA PEÇONHA DE <i>Bothrops alternatus</i> (URUTU) 'IN VIVO' PELO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO VEGETAL LUPEOL	
Benedito Matheus dos Santos Klaus Casaro Saturnino Vanderlúcia Fonseca de Paula Mirian Machado Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.5901927051	
CAPÍTULO 2	7
INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA, ANTIDIARREICA E ANTIESPASMÓDICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>SIDA RHOMBIFOLIA</i> L. (MALVACEAE)	
Rafael Lima Marinho Paiva Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Rayane Fernandes Pessoa Indyra Alencar Duarte Figueiredo Sarah Rebeca Dantas Ferreira Otemberg Souza Chaves Micaelly da Silva Oliveira Maria de Fátima Vanderlei de Souza Fabiana de Andrade Cavalcante	
DOI 10.22533/at.ed.5901927052	
CAPÍTULO 3	22
INVESTIGAÇÃO DE LECTINA E INIBIDOR DE TRIPSINA EM TUBÉRCULOS DE INHAME (<i>Dioscorea alata</i>) CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL	
Julia Mariano Caju de Oliveira Edilza Silva do Nascimento Tatiane Santi Gadelha Carlos Alberto de Almeida Gadelha	
DOI 10.22533/at.ed.5901927053	
CAPÍTULO 4	38
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ALERGÊNICOS ENCONTRADOS EM PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO	
Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.5901927054	
CAPÍTULO 5	50
MEIO AMBIENTE GENÉTICO E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS	
Odair Bufolo Daiane Silva Berdusco Freire Andréia de Fátima Selvati Bredariol	
DOI 10.22533/at.ed.5901927055	

CAPÍTULO 6 62

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PROPANOICO E ACÉTICO POR PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI ADSORVIDA EM MONTMORILONITA K-10

Taciani do Santos Bella de Jesus
Lucidio Cristovão Fardelone
Gustavo Paim Valença
José Roberto Nunhez
José Augusto Rosário Rodrigues
Paulo José Samenho Moran

DOI 10.22533/at.ed.5901927056

CAPÍTULO 7 72

PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

Glaucia Hollaender Braun
Henrique Pereira Ramos
Maria Laura Lucas Natal
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

DOI 10.22533/at.ed.5901927057

CAPÍTULO 8 80

PRODUCTION AND STABILITY OF LIPASE AND PECTINASE PRESENT IN AGROINDUSTRIAL RESIDUES

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Maria Cecília Bezerra Caldas
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.5901927058

CAPÍTULO 9 84

PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO APÓS ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂

Luis Eduardo Genaro
Luana Mafra Marti
Ana Carolina Bosco Mendes
Rafael Amorim Martins
Angela Cristina Cilense Zuanon

DOI 10.22533/at.ed.5901927059

CAPÍTULO 10 91

PURIFICATION OF A XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* AND ITS POTENTIAL USE IN CLARIFYING FRUIT JUICE

Jaina Caroline Lunkes
Vanessa Cristina Arfelli
Jorge William Fischdick Bittencourt
Rafael Andrade Menolli
Alexandre Maller
Jose Luís da Conceição Silva
Rita de Cássia Garcia Simão
Marina Kimiko Kadowaki

DOI 10.22533/at.ed.59019270510

CAPÍTULO 11 101

SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Luciana Furlaneto Maia
Naieli Mücke
Márcia Regina Terra
Danielle Karine Ohashi
Talita Butzske Bússolo
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.59019270511

CAPÍTULO 12 115

SIMULAÇÃO NUMÉRICA DA PROPAGAÇÃO DE ONDAS CISALHANTES EM ROCHAS SEDIMENTARES A PARTIR DE IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS DE RAIOS X

Túlio Medeiros
José Agnelo Soares
Ronildo Otávio de Oliveira Neto
Juliana Targino Batista

DOI 10.22533/at.ed.59019270512

CAPÍTULO 13 127

STABILITY OF PECTINASE OF ASPERGILLUS NIGER IOC 4003 IN DIFFERENT SALTS FOR PURIFICATION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEM

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.59019270513

CAPÍTULO 14 131

TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENIDAS

Lívia Cordi
Nelson Durán

DOI 10.22533/at.ed.59019270514

CAPÍTULO 15 142

TEMPERATURE AND pH EFFECTS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF THR XYLANASES PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS *Rasamsonia emersonii* S10

Jéssica de Araujo Zandoni
Eleni Gomes
Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

DOI 10.22533/at.ed.59019270515

CAPÍTULO 16 147

TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

Beatriz Paes Silva
Brenda Kischkel
Nicolle Ramos dos Santos
André Álvares Monge Neto

DOI 10.22533/at.ed.59019270516

CAPÍTULO 17 159

AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS

Thayana Cruz de Souza
Anni Kelle Serrão de Lima
Michele Silva de Jesus
Raimundo Felipe da Cruz Filho
Wim Maurits Sylvain Degrave
Leila de Mendonça Lima
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.59019270517

CAPÍTULO 18 164

ÁCIDO CÍTRICO: UM ENFOQUE MOLECULAR

Letícia Fernanda Bossa
Daniele Sartori

DOI 10.22533/at.ed.59019270518

CAPÍTULO 19 174

ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAL E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Gabriela Xavier Schneider
Jean Carlos Ramos de Almeida
Kassiely Zamarchi
Débora Santos
Danyelle Stringari
Renata Rodrigues Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270519

CAPÍTULO 20 188

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Juliana Barbosa Succar
Andressa Sbrano da Silva
Lidiane Coelho Berbert
Vinícius Ribeiro Flores
João Victor Rego Ferreira
Alexander Machado Cardoso
Ida Carolina Neves Direito

DOI 10.22533/at.ed.59019270520

CAPÍTULO 21 199

REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE QUARTZITO COM INSTALAÇÃO DE USINA SUSTENTÁVEL

Gabriel Silva Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270521

CAPÍTULO 22	218
COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (LAURACEAE)	
Viviane Mallmann	
Lucas Wagner Ribeiro Aragão	
Edineia Messias Martins Bartieres	
Valdeci José Pestana	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
Rogério César de Lara da Silva	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Ana Francisca Gomes da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.59019270522	
CAPÍTULO 23	223
CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae) EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS COMPOSTOS COM RESÍDUOS DE CASTANHA-DO-BRASIL	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270523	
CAPÍTULO 24	236
SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae)	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270524	
SOBRE O ORGANIZADOR	253

TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENDA

Livia Cordi

Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato n. 255, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

Nelson Durán

Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato n. 255, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil

RESUMO: O tratamento biológico pelo processo de lodos ativados é amplamente aplicado no tratamento de resíduos, pois sua microbiota é capaz de biodegradar compostos orgânicos e romper cadeias poliméricas. A poli- ϵ -caprolactona (PCL) é parcialmente biodegradado e para aumentar a degradação, é recomendado processar uma blenda contendo polímero natural, como o amido. O processo de lodo ativado tem sua microbiota alterada dependendo da fonte de carbono utilizada, para isto, a técnica molecular FISH é aplicada para identificar e enumerar grupos específicos de microrganismos, detectando elementos genéticos em amostra de fluorescência por sondas específicas e microscopia de fluorescência. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da microbiota do lodo ativado em biodegradar filmes de PCL e blendas de PCL/amido e verificar por FISH os grupos de microrganismos. A proporção da

blenda foi 35% em massa de amido, 15% em massa de plastificante Edenol e 50% de PCL. A biodegradação ocorreu em reator, contendo os filmes poliméricos à temperatura ambiente por 120 dias. A biodegradação foi avaliada por MEV (microscopia eletrônica de varredura), MFA (microscopia de força atômica) e TGA (termogravimetria). A perda de massa para o filme de PCL foi de 41%, enquanto que a blenda teve uma redução de 84%. A microbiota variou durante a biodegradação dos polímeros, apresentando sinal positivo de fluorescência para Gammaproteobacteria, Firmicutes e Mycobacterium na biodegradação do PCL, e Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria para a blenda. Diante dos resultados, conclui-se que o tratamento biológico por lodo ativado é um processo promissor nos estudos de biodegradação de polímeros.

PALAVRAS-CHAVES: Lodo ativado, Biodegradação de polímeros, FISH

FISH ANALYSIS APPLIED TO IDENTIFICATION OF ACTIVATED SLUDGE MICROBIOTA USED FOR BLEND BIODEGRADATION

ABSTRACT: Biological treatment by activated sludge process has been widely used to industrial effluents, because their microbiota is

able to degrade different organic compounds. Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) are partial degraded by microorganism, to accelerate the biological attack to PCL is the addition of natural polymers like starch. Fluorescent in situ hybridization (FISH) is a technique that is used to identify and enumerate specific microbial groups and is used to detect specific genetic elements in a sample. The aim of this study is identify, by FISH, the activated sludge microbiota responsible to biodegradation of PCL and their blend with starch. The blend proportion was 35% (w/w) starch, 15% (w/w) plasticizer and the 50% (w/w) PCL. Aerobic biodegradation was performed in a batch reactor, containing PCL and PCL/starch blend films, at room temperature under constant aeration for until 120 days. The biodegradation process was observed by atomic force microscopy (AFM) scanning electron microscopy (SEM) and thermogravimetric analysis (TGA). The FISH analysis was carried out using different probes specific for Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Archaea, Firmicutes, Chloroflexi, *Mycobacterium* and Eukaria. It was observed a low mass reduction in 84 % to the blend PCL/starch and 41% to PCL film. FISH results show that the microbiota suffered variation under PCL biodegradation process and it was observed positive fluorescent signal for Gammaproteobacteria, Firmicutes, and *Mycobacterium*. To PCL/starch blend biodegradation the positive results were for Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria. The activated sludge was a very promising process to study the biodegradation as observed in this work.

KEYWORDS: Activated sludge, polymer biodegradation, FISH

1 | INTRODUÇÃO

O desenvolvimento para o conforto e o bem-estar humano produzido a partir da Revolução Industrial levou à intensificação do material descartado, ocasionando aumento da quantidade de resíduos gerados, provocando contaminação do meio ambiente e trazendo riscos à saúde humana. O aumento da produção de bens de consumo incrementa também a quantidade de rejeitos originados na extração das matérias-primas, fabricação, utilização e descarte de produtos (Valt, 2007).

Os plásticos são considerados os grandes vilões ambientais, pois podem demorar séculos para se degradar e ocupam grande parte do volume dos aterros sanitários, interferindo de forma negativa nos processos de compostagem e de estabilização biológica. Além disso, os resíduos poliméricos quando descartados em lugares inadequados, como lixões, rios, encostas, etc., causam impacto ainda maior ao meio ambiente.

Deste modo, surgem as propostas de redução, reaproveitamento e até mesmo biodegradação desses resíduos plásticos em diferentes sistemas biológicos, dentre eles, o lodo ativado. O sistema de lodos ativados é amplamente utilizado, para o tratamento de despejos domésticos e industriais, em situações em que uma elevada quantidade do efluente e reduzidos requisitos de área são necessários. Basicamente,

compreende um tanque de aeração, tanque de decantação e recirculação de lodo. A biomassa consegue ser facilmente separada no decantador devido à formação de flocos, no qual estão presentes bactérias heterotróficas aeróbias, autotróficas nitrificantes, heterotróficas desnitrificantes, filamentosos e protozoários, envolvidos em uma matriz de polissacarídeos (Von Sperling, 2002).

Para assegurar a estabilidade e eficiência de um sistema de tratamento biológico, o conhecimento da dinâmica da comunidade microbiana presente no lodo e sua correlação com os parâmetros operacionais do sistema são fundamentais (Schneider et al., 1998; Kaiser et al., 1998). Comunidades microbianas podem ser consideradas como unidades funcionais que são caracterizadas pela soma das propriedades metabólicas e pelos grupos taxonômicos microbianos envolvidos.

Nos últimos anos se desenvolveram técnicas baseadas no DNA que permitiram estudar os microrganismos do meio ambiente independentemente da realização de cultivo em laboratório. São ferramentas muito poderosas que tem permitido um grande avanço no conhecimento da diversidade microbiana.

A ecologia microbiana molecular é baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos ou de processos por eles desencadeados. Estas podem ser proteínas, enzimas ou ácidos nucleicos, como RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico). A extração de DNA de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos.

Na última década, a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) complementares ao RNA ribossômico (rRNA) tem se afirmado como ferramenta útil para a análise taxonômica de bactérias em comunidades complexas, (Amann et al., 1995), sendo que a comparação da composição de duas comunidades bacterianas pode ser realizada adequadamente utilizando sondas de diferentes níveis taxonômicos (Manz et al., 1994). Esta técnica permite a detecção e enumeração de células bacterianas mediante o emprego de sondas que são marcadas com um radioisótopo para uma parte específica do 16S rRNA de uma bactéria. Uma sonda consiste de 15 a 30 nucleotídeos (bases), complementares ao DNA alvo. A sonda marcada com substâncias fluorescentes ou fluoróforos permite a visualização por microscopia de epifluorescência das células de um dado tipo de bactéria. Os fluoróforos mais empregados em FISH são a fluoresceína e seus derivados, tetrametilrosamina, Alexa488, Cy3, Cy5, entre outras. Visto que é uma técnica sem extração de ácidos nucleicos da célula, é conhecida também como hibridização de células inteiras, em inglês “whole cell hybridization”.

Utilizando análise FISH, tipos específicos ou grupos de bactérias podem ser observados sob uma microscopia fluorescente e neste sentido a presença bem como a quantidade de dada bactéria na amostra de lodo pode ser investigada (Jetten et al., 2001). A análise FISH consiste em uma importante ferramenta para acompanhar

o desenvolvimento de populações microbianas nos biorreatores estudados (Persson et al., 2002; Toh et al., 2002). A técnica permite não somente determinar o número, a morfologia e o tipo de microrganismos cultivados ou não, permitindo também analisar sua distribuição espacial (Amann et al., 1995; 2000).

O sistema de lodos ativados, assim como outros ecossistemas também tem restrição pelo método de caracterização tradicional que depende do cultivo das bactérias, sendo que o número de organismos viáveis é subestimado. A estratégia para caracterizar a estrutura nesses ecossistemas consiste na aplicação de sondas gerais, não específicas direcionadas a grandes grupos e logo na sequência ir aplicando sondas específicas para grupos mais reduzidos. As bactérias da divisão Proteobacteria são frequentemente as mais isoladas desse ecossistema. Dentro do grupo ainda foram detectadas alfa Proteobacterias, beta Proteobacterias, gamma Proteobacterias, delta e épsilon Proteobacterias. A técnica de FISH tem sido muito aplicada para a caracterização de lodos de sistemas nitrificantes nos quais *Nitrosococcus mobilis* é predominante como oxidadora de amônio e os resultados confirmados pelas técnicas de contagem e isolamento (Juretschko et al, 1998).

As técnicas de biologia molecular são muito úteis na hora de estudar comunidades complexas como as que se encontram em reatores e sistemas de tratamento de águas e esgotos, pois permitem o conhecimento da estrutura da comunidade e de sua dinâmica populacional.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade da microbiota do lodo ativado em biodegradar filmes de PCL e blendas de PCL/amido e verificar por FISH os grupos de microrganismos.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais Poliméricos

Para obter a blenda biodegradável foram utilizados Poli(caprolactona) (PCL) P-787 (Union Carbide do Brasil), Amido de Milho Modificado SNOW-FLAKE® 064051 (Corn Products, Brasil) e o plastificante Edenol® 3203 (Cognis do Brasil). PCL, Amido e Edenol forma utilizados na proporção 50:35: 15, respectivamente.

2.2 Perda de Massa

A perda de massa durante o processo de biodegradação foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de peso perdido (Franco, 2004), seguindo a equação 1 (Onde, M_o = massa inicial; M_f = massa final):

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{M_o - M_f \cdot 100}{M_o}$$

2.3 Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia do filme de PCL e da Blenda foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol - JSM-6360LV, operando a 20 keV com detector de elétrons secundários e retroespalhados. As amostras foram secas sob vácuo dinâmico, metalizadas com uma fina camada (14nm) de ouro/paládio por Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada sobre a amostra) utilizando-se um metalizador BAL-TEC.

2.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As microscopias de força atômica foram realizadas em microscópio SPM-9600 Shimadzu (Kyoto, Japan) e as imagens foram obtidas utilizando o modo dinâmico. Foi utilizado cantilever comercial de silicone e a frequência de ressonância da ponta foi de 210–230 khz.

2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

No estudo de TGA foi utilizado um Thermogravimetric Analyser TGA 2050 da TA Instruments utilizando-se uma taxa de aquecimento de 20°C/min, uma faixa de temperatura entre 30 e 900°C e um fluxo de nitrogênio de 20mL/min. A massa das amostras de PCL e PCL/amido analisadas foi de 7 ± 1 mg e a massa do amido foi de 4 mg.

2.6 Biodegradação em sistema de lodo ativado

A biodegradação do polímero foi realizada em reator de fluxo contínuo de lodo ativado. Para a partida do reator biológico foi feita caracterização do inóculo e posterior adaptação do mesmo aos polímeros. O sistema é constituído de uma unidade aeróbia e cilíndrica com capacidade volumétrica de 2,5 L, na qual ocorre a entrada do efluente a ser tratado. Esta unidade apresenta-se conectada à parte inferior de um decantador anaeróbio, cônico cuja capacidade volumétrica é de 1,5 L, no qual há a separação da biomassa do efluente tratado (Cordi et al., 2007). Ambas as unidades são construídas em acrílico. A biodegradação em reator de lodo ativado foi realizada até 120 dias. O controle da perda de massa sem inóculo da microbiota foi realizado em um recipiente com água destilada e aeração.

2.7 FISH

No FISH quantitativo se determinou a abundância relativa de certos grupos de bactérias como porcentagem do número total de células (utilizando corantes como o DAPI que se ligam ao DNA genômico e tingem todas as células) ou como porcentagem do número de bactérias do domínio Bacteria, utilizando a sonda geral EUB338. O estudo da relação de número de células EUB/DAPI nos deu uma ideia aproximada da

proporção de células bacterianas metabolicamente ativas. As células que se tingem somente com DAPI e não com a sonda podem estar mortas ou metabolicamente inativas. O ecossistema estudado pode apresentar Archaeas e para isto foi utilizada a sonda ARCH915. As amostras de lodo retiradas para análise FISH foram previamente guardadas a -20°C . As sondas utilizadas foram: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Actinobacteria, Archaea, Firmicutes, Chloroflexi, Mycobacterium e Eukaria. As amostras foram observadas em microscópio Zeiss AXIO IMAGER A2 equipado com Zeiss AXIOCAM MRC e AXIOVISION 4.8 software.

3 | RESULTADOS

Os filmes de PCL e a blenda PCL/Amido/Edenol tiveram sua perda de massa analisada em 60 e 120 dias. A blenda apresentou maior taxa de biodegradação quando comparada ao filme de PCL independente do período analisado. Na Tabela 1, é mostrado o resultado obtido para perda de massa em porcentagem com os respectivos desvios.

Amostras	Perda de Massa (%)	
	60 dias	120 dias
Blenda de PCL/amido/Edenol	37% ($\pm 3\%$)	85% (± 8)
Filme de PCL/Edenol	15% (± 2)	38 (± 5)

Tabela 1. Perda de massa para a blenda (A) e para o filme de PCL (B) em lodo ativado.

Em 120 dias de biodegradação, a taxa máxima obtida para o filme de PCL foi de aproximadamente 38%, enquanto que para a blenda observou-se uma taxa de 85% de biodegradação. Observou-se ainda que após 60 dias de biodegradação em lodo ativado, a perda de massa passou a ser significativa para a blenda. Ao decorrer do processo de biodegradação, a superfície dos filmes de PCL apresenta mais pontos de ataque e aprofundamento das cavidades até união destas cavidades quando analisada por MEV. Em 120 dias, o filme apresenta estiramentos que possivelmente levam a fragilidade do filme. Apesar da perda de massa do filme de PCL em 120 dias não ultrapassar os 38%, pela microscopia é observada uma mudança significativa em sua superfície, indicando o potencial de degradação desta formulação pela microbiota do lodo ativado. Cada cavidade que se forma é aprofundada e se aproximam de tal forma que a matriz de PCL se torna reduzida, indicando a degradação desta porção da blenda, corroborando assim com o resultado da alta taxa de biodegradação apresentada neste período (84%).

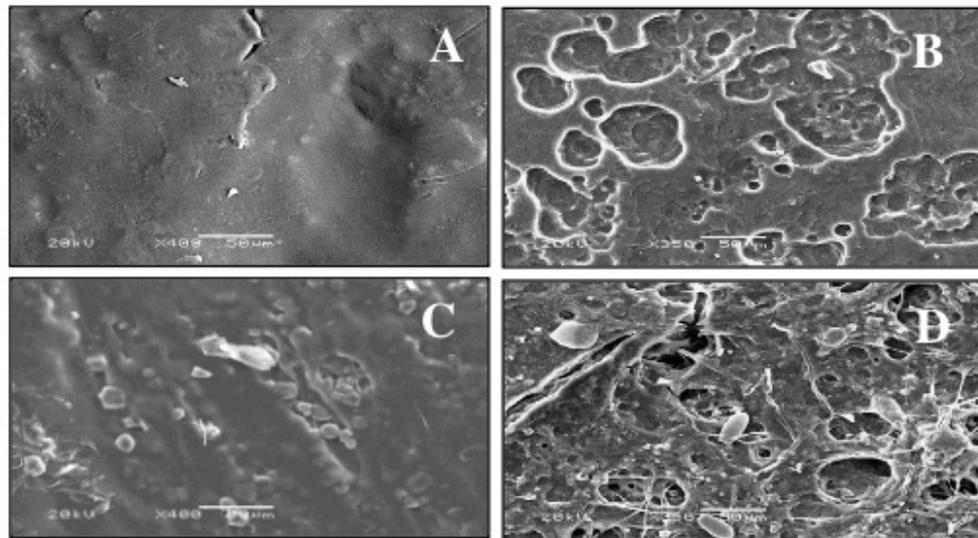


Figura 1. Microscopias de MEV antes e depois dos 120 dias de biodegradação. (A) Filme de PCL antes da biodegradação, (B) filme de PCL após biodegradação. (C) Blenda antes da biodegradação, (D) Blenda após biodegradação.

A microscopia de força atômica constitui uma ferramenta extremamente poderosa para o estudo da morfologia da superfície polimérica da distribuição de fases em sistemas multicomponentes. Sua principal vantagem sobre a microscopia eletrônica de varredura está no fato de não ser necessária qualquer preparação prévia da amostra a ser analisada.

A presença dos grãos de amido nas formas esféricas e dispersas irregularmente pela superfície do filme, resultando numa blenda heterogênea. Este resultado indica a importância da AFM em avaliar a miscibilidade da blenda polimérica.

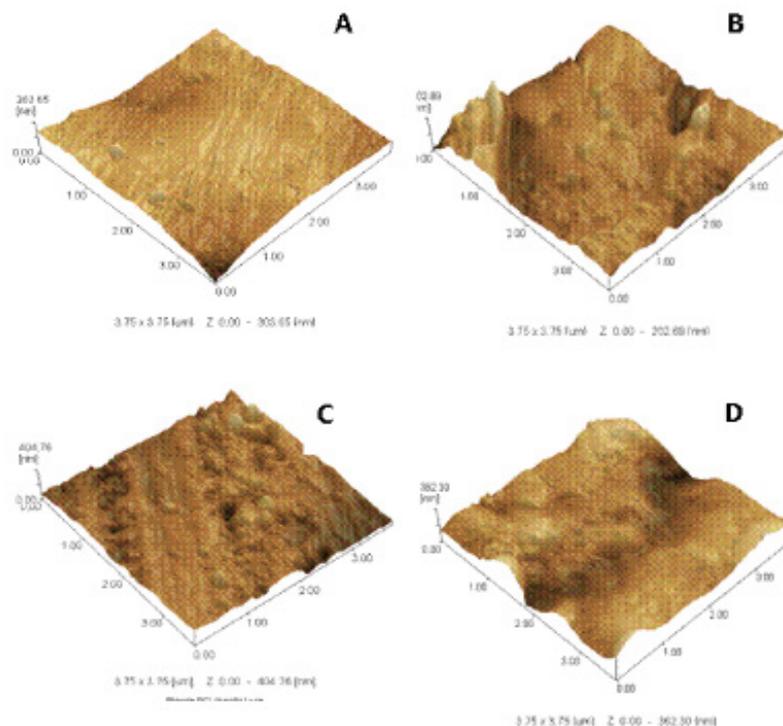


Figura 2. Microscopias tridimensionais de força atômica antes e depois dos 120 dias

de biodegradação. (A) Filme de PCL antes da biodegradação, (B) filme de PCL após biodegradação. (C) Blenda antes da biodegradação, (D) Blenda após biodegradação.

A microscopia de Fluorescência revelou a presença de vários grupos de bactérias através da análise da morfologia.

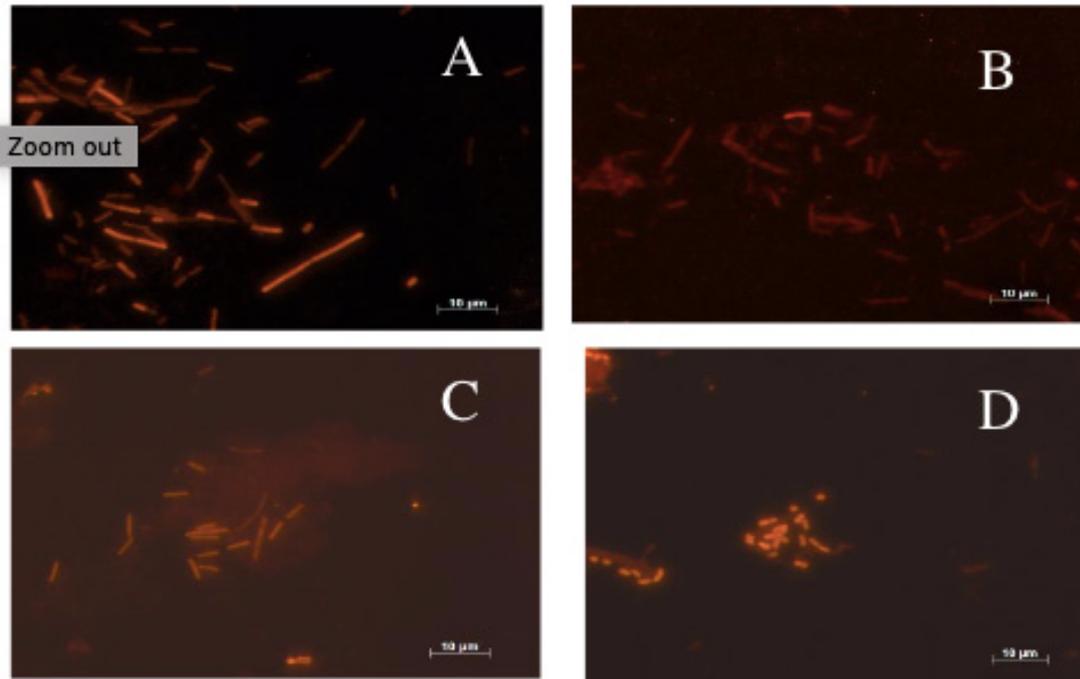


Figura 3. Detecção de diversas morfologias bacterianas presente no reator de lodo ativado utilizando FISH para o filme de PCL biodegradado: LGC (A), LMP (B); e para a blenda biodegradada: ALPHA (C), GAMMA (D).

A microscopia de epifluorescência revelou a presença de Alpha (ALP), Beta (BET), Gammaproteobacteria (GAMA) para a microbiota do lodo ativado após a biodegradação da blenda. A presença de GAMA, LGC e LMP foram detectadas para as amostras de lodo após a biodegradação do filme de PCL.

Amostras Biodegradadas / Sonda	ALFA	BETA	GAMA	LGC (A, B E C)	LMP
PCL biod. 60 dias	-	-	+	+	+
PCL biod. 120 dias	-	-	+	+	-
Blenda biod. 60 dias	+	+	-	-	-
Blenda biod. 120 dias	+	+	+	-	-

Tabela 2. Presença e ausência de grupos de microrganismos de acordo com a sonda utilizada nas amostras de lodo ativado.

Na figura 4 pode-se observar a análise da TGA que apresenta porções de redução

da blenda após 120 dias de biodegradação em reator de lodo ativado.

O PCL é observado até o final do processo de biodegradado por ser mais cristalino e de degradação mais lenta pelo sistema biológico. O plastificante edenol e o amido por serem de fontes naturais são facilmente biodegradados.

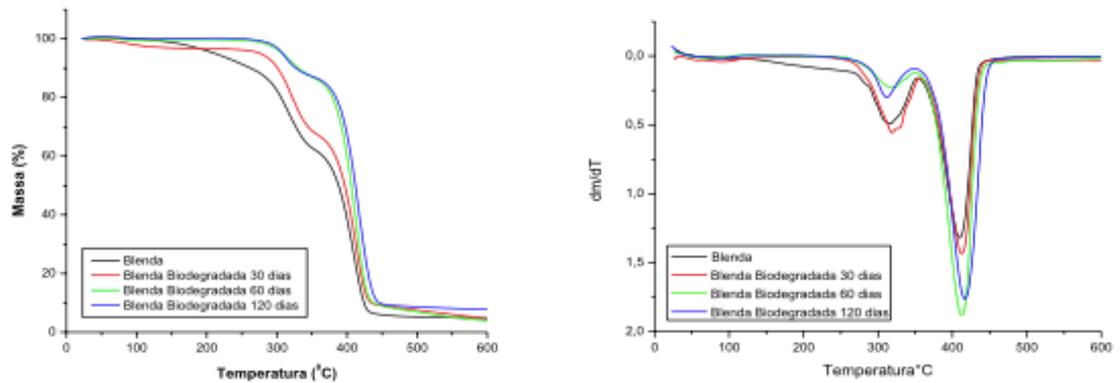


Figure 4: Curva de TGA e sua derivada apresentando a blenda biodegradada em diferentes tempos.

Na curva da derivada é nitidamente observada a redução das primeiras curvas de degradação com velocidade máxima de degradação térmica ao redor de 300°C evidenciando a biodegradação das frações de edenol e amido. Há uma tendência para aumento da estabilidade térmica para as amostras da blenda biodegradação em 60 e 120 dias por que ocorre uma exposição do PCL aumentando sua fração quando diminui significativamente as frações de amido e edenol.

4 | CONCLUSÃO

A perda de massa para o filme de PCL foi de 41%, enquanto que a blenda teve uma redução de 84%, devido a presença do amido que torna o material com maior taxa de biodegradação.

As imagens obtidas tanto pela MEV como pela AFM auxiliaram na confirmação de degradação dos materiais, filme de PCL e da blenda, no tempo de degradação de 120 dias, onde a biomassa microbiana do lodo ativado adere ao filme e inicia o processo de biodegradação consumindo inicialmente o amido e posteriormente o plastificante edenol e desestabilizando as cadeias de PCL.

A microbiota variou durante a biodegradação dos polímeros, apresentando sinal positivo de fluorescência para Gammaproteobacteria, Firmicutes e Mycobacterium na biodegradação do PCL, e Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria para a blenda. Diante dos resultados, conclui-se que o tratamento biológico por lodo ativado é um processo promissor nos estudos de biodegradação de polímeros em meio líquido.

O estudo das análises de TGA com o uso das derivadas das curvas facilita muito a visualização do comportamento térmico dos polímeros e plastificante utilizados

assim com a interação que ocorre entre os mesmos. Esta ferramenta auxilia também a observar a redução ou aumento da estabilidade térmica das curvas em relação aos filmes processados e biodegradados. De acordo com as derivadas das curvas para todos os filmes estudados foi observado que para os materiais biodegradados ocorre sempre um ganho de estabilidade térmica para os filmes biodegradados em 120 dias, o que indica a massa residual predominante de PCL, sendo este mais cristalino e com maior estabilidade térmica em relação aos outros componentes da blenda e dos compósitos.

REFERÊNCIAS

Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K-L. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation**. Microbiol. Rev. 59: 143-169, 1995.

Amann, R.I.; Ludwig, W. Ribossomal **RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology**. FEMS Microbiol Rev, 24, 555-565, 2000.

Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual cells without cultivation**. Microbiol Rev, 59, 143-169, 1995.

Cordi, L., Almeida, E.S., Assalin, M.R., Durán, N. **Intumescimento filamentoso no processo de lodos ativados aplicado ao tratamento de soro de queijo: caracterização e uso de floculantes para melhorar a sedimentabilidade**. Engen Ambiental: Pesq Tecnol, 4, n.2, 29-37, 2007.

Franco, C.R, Cyras, V.P., Busalmen, J.P., Ruseckaite, R.A., Vasquez, A., **Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre**. Polymer Degradation and Stability, V.86, p.95-103, 2004.

Jetten, M. S. M.; Van Dongen, L. G. J. M.; Van Loosdrecht, M. C. M.. **“The Combined Sharon/Anammox Process”**. Stowa: Foundation for Applied Water Research. IWA Publishing. London. 2001.

Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K-H., Pommerening Röser, A., Koops, H-P., Wagner, M. **Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: Nitrosococcus mobilis and Nitrospira-like bacteria as dominant populations**. Appl Environ Microbiol, 64, 3042-3051, 1998.

Kaiser, S.K., Guckert, J.B, Gledhill, D.W., **Comparison of activated sludge microbial communities using Biolog microplates**. Water Sci. Tech., v. 37, n.4-5, p.57-63, 1998.

Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K-L. **In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants**. Wat. Res., v. 28, n.8, p.1715-1723, 1994.

Persson, F.; Wik, T.; Sörensson, F.; Hermansson, M.. **“Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter”**. Water Research, 36, pp. 1439-1448. 2002.

Schneider, C.A., Mo, K., Liss, S.N. **Applying phenotypic fingerprinting in the management of wastewater treatment systems**. Water Sci. Tech., v. 37, n.4 - 5, p.461-464, 1998.

Toh, S.K.; Webb, R.I.; Ashbolt, N.J.. **“Enrichment of Autotrophic Anaerobic Ammonium-oxidizing Consortia from Various Wastewaters”**. Microbial Ecology, 43, pp.154-167. 2002.

VALT, R.B.G. **Ciclo de vida de embalagens para bebidas no Brasil**. Ed. Thesaurus, Brasília/DF,

2007.

Von Sperling, M.. “**Princípio do Tratamento Biológico de Águas Residuárias – Lodos Ativados**”.
Vol. 4. 2ª edição. Editora FCO. UFMG. Belo Horizonte. Minas Gerais. 2002.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-359-0

