

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec**  
**Curso de Biotecnologia**

**Trabalho de Conclusão de Curso**



**Capacidade biodegradativa de *Bacillus megaterium* e *Ralstonia solanacearum*  
na biodegradação de filmes de P(3HB) em solo simulado**

**Matheus Marques Torres**

**Pelotas, 2018**

**Matheus Marques Torres**

**Capacidade biodegradativa de *Bacillus megaterium* e *Ralstonia solanacearum*  
na biodegradação de filmes de P(3HB) em solo simulado**

Trabalho acadêmico apresentado ao  
Curso de Biotecnologia da Universidade  
Federal de Pelotas, como requisito parcial  
à obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador acadêmico: Profa. Dra. Patrícia Diaz de Oliveira

Orientador de estágio: Dra. Isabel Lopes Vighi

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

T693c Torres, Matheus Marques

Capacidade biodegradativa de *Bacillus megaterium* e  
*Ralstonia solanacearum* na biodegradação de filmes de  
P(3HB) em solo simulado / Matheus Marques Torres ;  
Patrícia Diaz de Oliveira, orientadora. — Pelotas, 2018.

38 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em  
Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico,  
Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Biodegradação. 2. Bioplásticos. 3. *Bacillus*  
*megaterium*. 4. Poli(3-hidroxibutirato). 5. *Ralstonia*  
*solanacearum*. I. Oliveira, Patrícia Diaz de, orient. II. Título.

CDD : 620.8

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

**Matheus Marques Torres**

**Capacidade biodegradativa de *Bacillus megaterium* e *Ralstonia solanacearum*  
na biodegradação de filmes de P(3HB) em solo simulado**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para  
obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento  
Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.**

**Data da Defesa: 26/11/2018**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Diaz de Oliveira (Orientadora)**  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Galli.**  
Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Dr<sup>a</sup>. Isabel Lopes Vighi**  
Doutora em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Pelotas.

**Dr. Amilton Clair Pinto Seixas Neto**  
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar a oportunidade de vivenciar tantas coisas boas e tantos desafios que só me fizeram crescer ao longo do tempo. Obrigado pela oportunidade de entrar na UFPel, pelos meus amigos e queridos professores e pelo tempo em que estive aqui.

Agradeço também a minha família, meu porto seguro para todas as horas de tempestade. Vocês são a minha base de vida e tenho certeza que sem a força de vocês, eu não conseguiria nem metade do que tenho hoje. Agradeço aos que estão aqui e também aos que já não estão nesse plano físico, que apesar de terem ido, nunca deixaram o meu coração.

Agradeço a todos os amigos, minha família com outros sobrenomes, por ouvir minhas lamúrias, aguentar os meus dramas e vibrar com as minhas conquistas. Seja em São Paulo, na Paraíba, em Lages, em Macapá, vocês sempre estiveram bem perto de mim.

Obrigado a todos do laboratório de Biopolímeros, que me acolheram durante toda a minha graduação. Os dias que passei aqui sem dúvida ficarão guardados na memória. Obrigado aos colegas de turma, principalmente os da Liga GoTac (ex Liga TacMan), vocês me fizeram sentir bem-vindo em uma terra estranha de chimarrão e pronomes diferentes.

E um muito obrigado aqueles que me orientaram e responderam tantas perguntas no decorrer da minha graduação. Os professores que encontrei aqui, além de mestres se tornaram verdadeiros amigos. Obrigado em especial à Professora Bilica, por tudo.

Muito obrigado a todos vocês, são os melhores que eu poderia ter!

## Resumo

TORRES, Matheus Marques. **Capacidade biodegradativa de *Bacillus megaterium* e *Ralstonia solanacearum* na biodegradação de filmes de P(3HB) em solo simulado.** 2018. 31 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Atualmente, a uso de materiais advindos de matrizes petroquímicas é extremamente comum na sociedade. Mas apesar de terem um bom aproveitamento devido às características de durabilidade, tais materiais possuem uma degradação no ambiente laboriosa e podem levar anos para serem totalmente degradados. Em decorrência disso, outros materiais vêm sido estudados para a substituição desse tipo de material, um desses materiais é o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)], um bioplástico microbiano biodegradável e biocompatível produzido por inúmeros microrganismos. Sua degradação só é feita quando presente em um ambiente microbiologicamente ativo, podendo ser degradado por todos os microrganismos que possuam o maquinário bioquímico necessário para assimila-lo. Em decorrência disto, o presente estudo preconiza avaliar a capacidade de degradação dos microrganismos *Ralstonia solanacearum* cepa RS e *Bacillus meaterium* cepa CN3 na biodegradação de poli (3-hidroxibutirato) sintetizado por *R. solanacearum* e o disponível comercialmente, em solo simulado. A pesquisa foi apresentada no formato de artigo científico, submetido em inglês para a revista 3BIOTECH. O experimento foi realizado em condições de uma casa de vegetação e os filmes de P(3HB) foram enterrados no solo e removidos em intervalos de 20, 40, 60, 80 e 100 dias e analisados por percentagem de biodegradação e as diferenças nas características estruturais macro e micro. Após 100 dias de experiência, o P(3HB) mais degradado foi o produzido por *Ralstonia solanacearum*, completamente degradado em solo não estéril. Além disso, *Bacillus megaterium* provou ser um microrganismo potencial para degradação, degradando em 88% a amostra de P(3HB) em solo estéril. A análise macroscópica demonstrou modificações de superfície ao longo do tempo, incluindo fissuras, buracos, perda gradual de massa e as alterações de cor. A análise microscópica demonstra o aumento do tamanho dos poros e fissuras confirmando os passos de biodegradação. O experimento provou ser capaz de simular condições viáveis para o crescimento de microrganismos e para avaliar a capacidade de biodegradação de bactérias.

**Palavras-chave:** biodegradação, poli(3-hidroxibutirato), bioplásticos, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus megaterium*

## **Abstract**

TORRES, Matheus Marques. **Biodegradative capacity of *Bacillus megaterium* and *Ralstonia solanacearum* on biodegradation of P(3HB) films in simulated soil.** 2018. 31 pages. Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Currently, the use of materials derived from petrochemical matrices is extremely common in society. But despite their good performance due to the durability characteristics, such materials can take years to be fully degraded. As a consequence, other materials have been studied for the substitution of this type of material, one of these materials is poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], a biodegradable and biocompatible microbial bioplastic produced by numerous microorganisms. Its degradation only happens when present in a microbiologically active environment, and can be degraded by all the microorganisms that possess the biochemical machinery necessary to assimilate it. As a result of this, the present study proposes to evaluate the degradation capacity of the microorganisms *Ralstonia solanacearum* strain RS and *Bacillus megaterium* strain CN3 in the biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) synthesized by Ralstonia RS and commercially available in simulated soil. The research was presented in the format of a scientific article submitted in English for 3BIOTECH. The experiment was carried out under greenhouse conditions and the P (3HB) films were buried in the soil and removed at intervals of 20, 40, 60, 80 and 100 days and analyzed by percentage of biodegradation and differences in macro and micro structural characteristics. After 100 days of experimentation, the most degraded P(3HB) was that produced by *R. solanacearum*, completely degraded in non-sterile soil. In addition, *B. megaterium* proved to be a potential microorganism for degradation, degrading the P(3HB) sample by 88% in sterile soil. Macroscopic analysis demonstrated surface modifications over time, including cracks, holes, gradual mass loss, and color changes. Microscopic analysis demonstrates increased pore size and cracking confirming the biodegradation steps. The experiment then proved to be able to simulate viable conditions for the growth of microorganisms and to evaluate the biodegradability of bacteria.

**Palavras-chave:** biodegradation, poly (3-hydroxybutyrate), bioplastics, *ralstonia solanacearum*, *Bacillus megaterium*

## Sumário

<b>1- Introdução .....</b>	<b>9</b>
<b>2- Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>11</b>
2.1 – Biopolímeros .....	11
2.1.1 – Polihidroxialcanoatos .....	12
2.1.1.1 – Poli(3-hidroxibutirato) .....	13
2.2 – Degradação de Materiais .....	13
2.3.1 – Biodegradação de P(3HB) .....	14
2.3.2 – Análises de degradação .....	15
<b>3- Objetivos .....</b>	<b>17</b>
3.1 – Objetivos específicos .....	17
<b>4- Artigo “Biodegradative capacity of <i>Bacillus megaterium</i> and <i>Ralstonia solanacearum</i> on biodegradation of P(3HB) films in simulated soil”.....</b>	<b>18</b>
4.1 – Abstract .....	18
4.2 – Introduction .....	19
4.3 – Materials and methods .....	20
4.3.1 – P(3HB) samples production .....	21
4.3.2 – Biodegradation assay.....	21
4.3.3 – Analysis of the Test Samples.....	22
4.3.3.1 – Percentage of biodegradation .....	22
4.3.3.2 – Macro and micro structural characterisation .....	22
4.3.3.3 – Statistical analysis.....	23
4.4 – Results and discussion .....	23
4.4.1 – Percentage of Biodegradation.....	23
4.4.2 – Soil Temperature and Moisture.....	26
4.4.3 – Macro and Micro Structural Characterisation .....	27
4.5 – Conclusion .....	31

<b>5- Conclusão Geral .....</b>	<b>32</b>
<b>6- Perspectivas Futuras .....</b>	<b>32</b>
<b>7- Referências .....</b>	<b>34</b>

## **1- Introdução**

Atualmente, o plástico advindo de material petroquímico é utilizado em diversas áreas do cotidiano comum. Esse material pode ser empregado nas edificações civis, nas construções automobilísticas, materiais cirúrgicos, embalagens descartáveis e em muitos outros usos, devido às suas propriedades físicas e químicas (Faria et al. 2010). Esse material é produzido a partir da destilação fracionada de misturas de hidrocarbonetos e sua produção e comercialização caracteriza uma atividade tão globalizada que movimentou cerca de 350 bilhões de euros no mercado europeu no ano de 2017 (Plastics Europe, 2018).

Mas, apesar de seu emprego ser largamente incentivado, as questões ambientais condizentes ao seu descarte devem ser atentadas. Devido a sua alta durabilidade, esses materiais ao serem descartados, não se deterioram com facilidade, podendo se microfragmentar mas não degradar-se (Warscheid and Braams, 2000). Com o alto emprego desse material, seu resíduo contínuo no descarte também é elevado e por isso seu acúmulo pode acabar prejudicando o ecossistema de qualquer ambiente em que se encontre. No ecossistema marinho, a presença de plásticos fragmentados podem significar diversos problemas associados à fauna existente, como a retenção de materiais plásticos no intestino em escalas de tempo além daquelas esperadas para outros materiais ingeridos (Browne et al., 2011); Translocação de partículas plásticas para outros tecidos do corpo, atravessando a parede do intestino (Browne et al., 2008; Browne et al., 2011; Farrel et al., 2013), além disso, tem sido reportado que a ingestão de partículas microplásticas por invertebrados marinhos tem sido ligada a uma vasta gama de efeitos subletais, incluindo a redução da reprodução, redução do crescimento de indivíduos e redução da aptidão ao ecossistema (Browne et al., 2011; Farrel et al., 2013, Von Moos et al., 2012).

Como uma das possíveis soluções para esse problema, os materiais produzidos a partir de matrizes renováveis como biomassa, ácidos graxos, amidos, dentre outros, vem sendo muito pesquisados, e dentro desses, temos os Polihidroxialcanoatos (PHA's).

Os PHA's são um conjunto de poliésteres sintetizados a partir de fontes de carbono que se apresentam como inclusões no citoplasma de inúmeras bactérias, podendo corresponder até 95% de sua massa celular seca (Cappitelli et al., 2006). Um dos mais pesquisados atualmente é o poli(3-hidroxibutirato). Devido às suas propriedades

físicas similares ao polipropileno (PP), tais como tensão de cisalhamento, temperatura de fusão, cristalinidade, além de sua termoplásticidade, ele é um dos principais candidatos para a substituição da matriz de plástica atual. Além disso, possui um tempo de degradação em um ambiente microbiologicamente ativo bastante inferior, se comparado com os plásticos petroquímicos) (Emadian et al., 2007; Faria e Martins-Franchetti, 2010). A produção do P(3HB) é realizada por fermentação e em condições específicas visando a acumulação do polímero intracelular, o meio fermentativo deve ter um alto aporte de alguma fonte de carbono assimilável pelo microrganismo enquanto que ao mesmo tempo, deve limitar alguns dos nutrientes essenciais para sua multiplicação celular, como sulfatos, nitrogênio e fósforo (Gu, 2003).

Para que um material possa substituir parcialmente ou mesmo totalmente uma matriz petroquímica e resolver as questões ambientais relacionadas a essa substituição, ele deve necessariamente possuir características físicas semelhantes, mas com um tempo de degradação ambiental inferior.

Para se determinar o tempo de degradação de um material no meio ambiente, inúmeras variáveis devem ser consideradas, como a estrutura do material e os fatores bióticos e abióticos que exercem a degradação. Muitos estudos são conduzidos a fim de se determinar o grau de degradabilidade de um material, avaliando-se os fatores abióticos, utilizando ensaios *in vitro* que mimetizam condições ambientais físicas similares àquelas que os resíduos serão submetidos no momento de seu descarte. Pode-se fazer análise de degradação variando a temperatura, degradação por radiações, degradação em câmaras de envelhecimento acelerado, dentre outras (Wang et al., 2013).

Além disso, outra característica importante a ser analisada nos fatores bióticos é o potencial degradativo de certos tipos de microrganismos que podem auxiliar e acelerar no processo de degradação ambiental, e para isso inúmeros testes são feitos *in vitro* que preconizam a determinação da quantidade de enzimas excretadas e a efetividade das mesmas (Wang et al., 2013; Mendes e Junior, 2013).

Para essa avaliação ambiental, testes que simulam condições que mais se assemelham aquelas encontradas no meio ambiente, podem ser os mais precisos e mais confiáveis para se determinar as características degradativas de um objeto de

pesquisa, tanto na avaliação da degradação de um material quanto no potencial degradativo de um microrganismo.

## **2- Revisão Bibliográfica**

### *2.1 – Biopolímeros*

Plásticos de origem petroquímica são extensivamente utilizados nos dias atuais devido às suas qualidades extremamente atrativas a indústria, como sua termoplásticidade, durabilidade e hidrofobicidade. Alguns dos principais exemplos são o polipropileno (PP), o polietileno (PE), o poli(tereftalato de etileno) (PET) e o poli(cloreto de vinila) (PVC), utilizados para diversos fins industriais, médicos, automobilísticos, dentre outros (Browne et al., 2011).

Apesar de suas qualidades serem inúmeras, seus defeitos também podem ser apontados, principalmente no seu descarte. Devido sua durabilidade elevada, sua degradação em um ambiente microbiologicamente ativo é extremamente reduzida, se comparado com outros tipos de materiais biodegradáveis. Coutinho et al. (2007) aponta que para a degradação total de um copo de plástico feito de uma matriz petroquímica, são necessários de 150 a 200 anos, evidenciando assim um elevado tempo de degradação ambiental.

Para tentar contornar o problema e substituir a matriz petroquímica, vários tipos de pesquisas têm sido conduzidas a fim de identificar materiais que possuam as mesmas características físicas, mas com um tempo de degradação inferior. Um dos temas mais atuais são os biopolímeros, materiais poliméricos produzidos por seres vivos. Além de possuírem uma degradação eficaz no meio ambiente, podem ter sua origem em fontes de energia renováveis, como a biomassa, em contraste com a matriz petroquímica, cuja fonte principal são os combustíveis fosseis, um recurso finito (Cappitelli et al., 2006).

Mais de 160 tipos de biopolímeros foram catalogados e analisados, cada um para uma determinada finalidade, dependendo das suas características. Dentre estes, temos os biopolímeros bacterianos, produzidos apartir de microrganismos que por meio da fermentação, convertem fontes de carbono variadas em materiais poliméricos passíveis de serem usados comercialmente.

### 2.1.1 – Polihidroxialcanoatos

Tendo sua primeira descrição em 1923, como a descoberta da presença de ácido 3-hidroxibutírico em culturas de *Bacillus megaterium* lisadas, os polihidroxialcanoatos (PHAs) são uma classe de poliésteres produzidos em microrganismos por meio da fermentação e é um exemplo de biopolímero. Eles são formados em grânulos intracelulares em diversas bactérias, como uma forma de acúmulo de energia. Sua condição para acumulo é o alto aporte de alguma fonte de carbono assimilável pelo microrganismo e uma baixa concentração de algum nutriente limitante como Fósforo, Enxofre ou Nitrogênio. A maioria dos PHAs possuem características similares aos plásticos petroquímicos além de serem biocompatíveis, o que pode aumentar ainda mais a atratividade industrial desse tipo de material (Browne et al., 2011).

Existem mais de 150 monômeros que podem formar a cadeira principal deste polímero, tendo tamanhos que variam de 3 a 5 carbonos (denominadas short-chain length PHA) ou com 6 a 14 carbonos (denominadas medium chain length) (JENDROSSEK et al., 2009). Dentre os PHAs, um dos mais pesquisados é o poli(3-hidroxibutirato), devido as suas propriedades muito similares ao polipropileno, tais como a tensão de cisalheamento, a termoplasticidade, a cristalinidade e temperatura de fusão. Além disso, o poli(3-hidroxibutirato) combinado com outros monômeros, também produzem objetos de estudo recorrentes como o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) [P(3HB-co-3HV)] e o poli(4-hidroxibutirato) [P(4HB)]. Essa variação no numero de carbonos presentes na cadeia do polímero tem como objetivo o de alcançar propriedades desejáveis para a aplicação eficaz do biopolímero (REDDY et al., 2003).

Um revés na estabilização do uso de PHAs industrialmente e no cotidiano é seu custo produtivo, que é mais elevado do que o uso de plásticos convencionais, além das condições operacionais de fermentação e tipo do microrganismo utilizado, que mudam显著mente o rendimento total de P(3HB) fermentado e podem alterar o valor de produção em si. Além disso, sua recuperação é dependente de solventes orgânicos, elementos que podem apresentar um risco em potencial para o meio ambiente.

#### *2.1.1.1 – Poli(3-hidroxibutirato)*

O Poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é um dos PHAs mais estudados. Composto inicialmente de cadeias poliméricas de 4 carbonos, possui características semelhantes às do polipropileno (PP), como insolubilidade em água, alta cristalinidade e alto grau de polimerização, além da proximidade das temperaturas de fusão de ambos (ANDERSON & DAWES, 1990; REDDY et al. 2003). Seu acúmulo intracelular é conhecido por ser feito por cerca de 75 gêneros bacterianos, tendo essa lista em constante crescimento.

A via metabólica de produção de P(3HB) mais conhecida é caracterizada por utilizar o operon PhbCAB. Esse operon sintetiza 3 enzimas distintas e que são fundamentais para a polimerização intracelular, são elas:  $\beta$ -cetotiolase (gene PhbA), acetoacetil-CoA redutase (gene PhbB) e a enzima PHA sintetase (gene PhbC). Apesar de serem utilizadas para a produção do P(3HB), essas enzimas podem ser utilizadas também para catabolizar outros tipos de PHAs, dependendo do substrato fornecido ao microrganismo e a rota metabólica precursora a esta.

Além das características termoplásticas que são extremamente atrativas industrialmente, o P(3HB) possui características de biocompatibilidade comprovadas e que abrem possibilidades de uso ainda maiores do que os plásticos derivados de matrizes petroquímicas. O seu uso na área médica pode ser bem aproveitado em terapias de reconstituição óssea e cartilaginosa, uma vez que pode ser utilizado na confecção de moldes para recuperação de tecidos corporais. Na área farmacêutica pode auxiliar nas técnicas de liberação controlada de fármacos através de microcápsulas, microesferas e filmes de aplicação tópica (BORNATSEV et al., 2007).

### *2.3 – Degradação de Materiais*

Na degradação polimérica de materiais, diversos fatores podem ser verificados para atestar e medir o grau de degradação. A degradação em si é o processo de perda de propriedades físicas e/ou químicas de um material, dependente diretamente das características do mesmo. Essas características constituem fatores de degradação que podem favorecer ou limitar a degradação do material em si.

O processo de degradação ocorre de várias formas dependendo da quantidade e o grau de fatores que incidem em um material. Podemos ter duas fontes de fatores: bióticas ou abióticas. Os fatores abióticos compreendem processos de hidrólise ou oxidação provenientes de características ambientais, como a temperatura, a incidência de raios UV, a umidade, o pH, a pressão mecânica, dentre outros. Os fatores bióticos estão intrinsecamente relacionados com os materiais biodegradáveis, uma vez que esses fatores, constituídos da ação de microrganismos sob o material, aceleram exponencialmente a degradação de um objeto (Emadian et al., 2007).

Os fatores abióticos são extremamente simples de serem reproduzidos em laboratório, uma vez que são características físicas passíveis de ser imitadas por muitos equipamentos laboratoriais. Os fatores bióticos no entanto, são de difícil reprodução, uma vez que eles constituem a ação de enzimas como lipases, invertases, lactases, proteinases e amilases, que hidrolisam compostos e dependem do perfil da microbiota presente no local da degradação. Estimar a quantidade e o tipo de enzimas em si é uma tarefa de difícil execução sem análises moleculares mais complexas.

### 2.3.1 - Biodegradação de P(3HB)

O caráter biodegradável do P(3HB) já é bem consolidado na literatura científica, podendo apresentar períodos de 60 a 90 dias para a completa degradação de uma amostra feita desse material. Apesar disso, experimentos envolvendo microrganismos na degradação do P(3HB) são continuamente estudados para a avaliação de enzimas hidrolíticas eficazes para impulsionar ainda mais o processo de degradação desse material (Chanprateep, 2010).

Sendo um biopolímero e degradando principalmente em um ambiente microbiologicamente ativo, o P(3HB) conta com o mecanismo metabólico bacteriano para a sua degradação eficaz no meio ambiente. Muito embora todo microrganismo produtor de P(3HB) seja dotado de enzimas que podem degradar esse tipo de material intracelular, não são todos os que produzem as mesmas enzimas para excreção e assimilação do P(3HB) extracelular, cabendo à pesquisa e ao screening microbiológico identificar quais gêneros podem fazer tal tarefa.

As condições para a sua degradação ambientais estão intrinsecamente atreladas às condições de proliferação de microrganismos, uma vez que estes são essenciais

na degradação. Um aspecto importante de salientar, é que na degradação em solo do P(3HB), a massa molar do polímero tende a aumentar exponencialmente durante os primeiros 60 dias, tanto pela absorção de água quanto pelo crescimento de colônias bacterianas em contato direto com o material (Brito, 2011; Schröpfer, 2015).

Apesar de muitos gêneros de microrganismos como *Pseudomonas*, *Ilyobacter*, *Bacillus*, *Comamonase* e *Alcaligenes* serem ditos degradadores extracelulares do polímero, muitos fungos também possuem a cabacidade de degradação desse material e a assimilação do mesmo como fonte de carbono, em especial espécies do gênero *Aspergillus* (Merugu, 2012).

### *2.3.2 – Análises de degradação*

Para a análise de degradação de um material, seja ele biodegradável ou não, algumas características podem ser continuamente verificadas, para que as diferenças entre verificação contituam um atesto válido para degradação. Uma das principais características que se deve levar em consideração é a perda de massa, que pode determinar o grau de degradação frente ao processo degradativo sofrido. Associada a essa característica, outras variações de paremetros no sistema em que o material se encontra ao ser degradado, pode atestar conclusivamente o grau e a velocidade de sua degradação, como a umidade o pH e produção de compostos como nitrogênio e CO<sub>2</sub>, subprodutos da degradação em si (Chanprateep, 2010).

Algumas técnicas já estabelecidas na literatura podem fornecer dados importantes na estabilização dos parâmetros degradativos de um determinado material. Temos a termogravimetria, que é uma análise termica que consiste em submeter o material a diferentes temperaturas e acompanhar a perda de massa conforme o aumento da temperatura. A perda de massa frente à temperatura está associada ao grau de resistência, estabilidade e degradação de um material (SCHRÖPFER, 2015). Para avaliação de características como a temperatura de transição vítreia (T<sub>g</sub>) ou grau de cristalinidade temos análises como a Calorimetria Exploratória Diferencial, que é uma técnica que constitui analisar o material de pesquisa juntamente com o outro material com características estabelecidas, a fim de comparar o seu comportamento em um sistema onde a energia total é constantemente mudada. Para análise da massa molar, característica essa que pode ir se alterando conforme a degradação ocorre, temos a Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) ou Cromatografia de Exclusão

por Tamanho, que permite a avaliação do tamanho das moléculas e sua passagem através dos poros presentes na matriz cromatográfica, gerando gráficos cujos picos indicam a presença da amostra e sua massa molar. Se o material alterar suas condições químicas, uma das análises passiva de ser feita é a Espectroscopia Infravermelho, que através da aplicação de radiação eletromagnética, é possível determinar um padrão de absorção de radiação e associá-lo à configuração química da mesma, (Harwood et al., 1997). Por fim, uma maneira prática de visualização das modificações na superfície polimérica de amostras em testes de degradação, é através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), uma técnica de microscopia aprimorada, que pode fornecer detalhes importantes quanto a configuração física do objeto de estudo.

### **3- Objetivo**

O presente trabalho tem como objetivo determinar a taxa de degradação do polímero P(3HB) produzido em laboratório pelo microrganismo *Ralstonia solanacearum*, em processo de degradação em solo simulado, além de estipular o potencial degradativo de duas bactérias conhecidas na literatura por produzir P(3HB): *Ralstonia solanacearum* e *Bacillus megaterium*.

#### **2.1- Objetivos específicos**

- Validar o método de degradação utilizado no estudo.
- Comparar a diferença na perda de massa nas amostras de P(3HB) nos diferentes tratamentos.
- Atestar a biodegradação utilizando a microscopia ótica e eletrônica de Varredura (MEV).

#### **4- Artigo**

#### **Biodegradative capacity of *Bacillus megaterium* and *Ralstonia solanacearum* on biodegradation of P(3HB) films in simulated soil**

Matheus Marques Torres<sup>1†</sup>, Camila Rios Piecha<sup>2†</sup>, Karine Laste Macagnan<sup>3</sup>, Mariane Igansi Alves<sup>4</sup>, Angelita da Silveira Moreira<sup>5</sup>, Luciana Bicca Dode<sup>6</sup>, Cristiane Wienke Raubach Ratmann<sup>7</sup>, Patrícia Diaz de Oliveira<sup>\*8,4</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology, Center of Technological Development, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>2</sup>Biotechnology, Center of Technological Development, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Biotechnology, Center of Technological Development, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>4</sup>Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>5</sup>Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>6</sup>Biotechnology, Center of Technological Development, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>7</sup>Postgraduate Program in Materials Engineering, Center of Technological Development, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

<sup>8</sup>Postgraduate Program in Biotechnology, Center of Technological Development, Federal University of Pelotas, 96010-900, Pelotas – RS, Brazil.

\*Corresponding author - Email: [bilicadiaz@yahoo.com.br](mailto:bilicadiaz@yahoo.com.br). Telephone number: +55 53 981183899. ORCID 0000-0001-9601-296X

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Poly(3-hydroxybutyrate) is a microbial biodegradable bioplastic that has been used as a substitute for petrochemical-based plastics. It completely degrades in a microbiological environment containing microorganisms with biodegradative

capacity, being its identification important to the comprehension of the biodegradation process. In addition, new methodologies that are closer to a natural microenvironment increase the reliability of the experiment. In this context, the present study analyses the degradation capacity of the Brazilian strains *Ralstonia solanacearum* RS and *Bacillus megaterium* CN3 on biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate) synthesised by *Ralstonia solanacearum* RS and commercial poly(3-hydroxybutyrate). It was conducted under greenhouse conditions and P(3HB) production was performed in a bioreactor before extraction. Films were buried in the soil and removed at 20, 40, 60, 80 and 100 days intervals and analysed by biodegradation percentage and differences in macro and micro structural characteristics. After 100 days of experiment, the most degraded poly(3-hydroxybutyrate) was the one produced by *Ralstonia solanacearum* RS, completely degraded (100%) in non-sterile soil. In addition, *Bacillus megaterium* CN3 proved to be a potential degradative microorganism, degrading 88% of poly(3-hydroxybutyrate)RS in sterile soil. The macroscopic analysis showed surface modifications over time, including: cracks, holes, gradual mass loss and color changes. Microscopic analysis demonstrates the increase in the pore size and cracks confirming the steps of biodegradation. Therefore, the experiment proved to be able to simulate viable conditions for the growth of microorganisms and to evaluated the biodegradation capacity of bacteria.

**Key Words:** Biodegradation, Poly(3-hydroxybutyrate), Bioplastic, *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus megaterium*.

## Introduction

Plastics derived from petrochemical sources are highly consumed in today's society due to its wide range of uses, from the manufacture of surgical instruments to the production of disposable packages. However, due to their mechanical properties of integrity and durability, they present prolonged degradation time (Alves et al., 2017). In order to minimise the environmental impacts caused by these plastics, several European Union countries such as the Netherlands and Belgium have already adopted policies to discourage their use, the same is reported for the cities of Ladakh in India, Dhaka in Bangladesh and South Australia, where its use is prohibited (Chanprateep, 2010). In 2016, France also banned the use of plastic bags and should carry out the

transition from the use of plastic utensils, such as cups, plates and cutlery to materials that are at least composed of 50% biodegradable materials such as corn or potato starch, cellulose fibers or bioplastics by 2020 and 60% by January 1<sup>st</sup> 2025 (France, 2016).

To replace these plastics, biodegradable polyesters such as polyhydroxyalkanoates (PHAs), with wide production worldwide, are strong candidates. One of the most researched PHAs is the poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)], a biocompatible, biodegradable and thermoplastic material that can be used in several industrial areas such as the manufacture of disposable utensils, medical materials and drug delivery (Alves et al., 2017). Those, in a microbiologically active environment, shown effectively degradation in months compared to conventional plastics, which takes years (Boyandin et al., 2011; Altaee et al., 2016; Alves et al., 2017), resulting as final products carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), water (H<sub>2</sub>O) in O<sub>2</sub> presence and methane (CH<sub>4</sub>) under anaerobic conditions (Wang et al., 2013).

The complete biodegradation of a material is a very attractive feature development of an ecological plastic material for industrial use. Due to the high microbial biodiversity in the soil, literature describes several methodologies to simulate P(3HB) biodegradation under different environmental conditions (Boyandin et al., 2011; Anstey et al., 2014). Analyses are reported in soil (Altaee et al., 2016; Araújo et al., 2015); composted soil (Casarin et al., 2013; Rosa et al., 2002); composted and humid soil based on poultry manure and organic materials of plant origin (Pellicano et al., 2009); and soil simulating landfill (Weng et al., 2013)

Recently, Emadian et al. (2017) reviewed numerous bacteria and fungi from soils, river, sea water and activated sludge and reported them as responsible for the release of depolymerases that hydrolyses ester bonds of the polymer into water-soluble monomers and oligomers. Some bacteria such as *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Leptothrix*, also possess the ability of synthesis and biodegradation of P(3HB). In this context, the aim of the present work was to analyse the degradation capacity of Brazilian strains *Ralstonia solanacearum* RS and *Bacillus megaterium* CN3 on biodegradation of P(3HB) films synthesised by *Ralstonia solanacearum* RS and commercial P(3HB), conducted in a greenhouse, a procedure not described yet.

## Materials and methods

## **P(3HB) samples production**

P(3HB)RS was produced at Biopolymers Laboratory of the Federal University of Pelotas by submerged fermentation of *Ralstonia solanacearum* RS, isolated from the local biodiversity.

Multiplicative cultures were transferred to 500 mL Erlenmeyers containing 200 mL of liquid yeast malt (YM) medium composed of (in g.L<sup>-1</sup>) yeast extract (Kasvi®), 2.7; malt extract (Kasvi®), 2.7 and peptone (Kasvi®), 4.5, incubated in an orbital shaker at 32 °C (*R. solanacearum*) at 150 rpm for 24 hours for cell growth. On polymer production phase, the inoculum (DO<sub>600</sub>=10) was transferred to the F4 mineral medium, composed of (in g.L<sup>-1</sup>) glucose, 40.0 g; urea, 3.0 g; citric acid, 0.2 g; sodium citrate, 4.0 g; and 1.0 ml trace element solution (MgSO<sub>4</sub> 0.2 g; CaCl<sub>2</sub>, 0.01 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.005 g; ZnSO<sub>4</sub>, 0.1 g; FeCl<sub>3</sub>, 0.05 g), in Erlenmeyers of 500 mL of capacity, containing 200 mL of the final volume. Incubating in an orbital shaker at 32 °C and 200 rpm for 72 hours. Subsequently, the fermented broth was centrifuged at 10,000 x g for 15 min at 4 °C and the pellet resuspended in 0.89% saline solution and centrifuged again under the same conditions, being oven-dried at 56 °C until constant weight. The bioplastic extraction was performed as described by Macagnan et al. (2017).

Commercial P(3HB) (Biocycle®) was supplied as powder by PHB Industrial Usina da Pedra-Açúcar e Álcool (Serrana, SP, Brazil).

Films were obtained by solubilising the powder in chloroform 1:40 (w/v) at 58 °C under stirring. The solution was transferred to a 9 cm diameter semi-open petri dish for slow evaporation of the solvent and formation of the film. P(3HB) specimens of approximately 3.5 cm<sup>2</sup> were oven-dried at 56°C, weighed and individualised into polyester fabric envelopes measuring 5 x 6 cm.

## **Biodegradation assay**

To the biodegradation experiment, plastic seedling trays (6.5 x 6.5 x 6.0 cm) with individualised cells were used containing approximately 130 g of commercial soil. The experiment was carried out in a greenhouse with weekly monitoring of maximum and minimum temperature with the employment of a thermohygrometer (SH 122 - J. Prolab - Brazil).

The commercial soil used, contained 25% of clay and 5.4% of organic residues (pH 5.8) with a cation exchange capacity of 31.5 cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup> and water holding capacity of 24%. The moisture content was measured by withdrawing 5 g of soil samples during the periods of removal of the specimens, which were oven-dried at 56 °C until constant weight and analysed by gravimetry.

Different treatments were used: (T1) soil sterilised by two cycles of 45 min in autoclave at 121 °C (negative control); (T2) soil sterilised and added to *R. solanacearum* RS, (DO<sub>600</sub> = 6.0); (T3) soil sterilised and added to *B. megaterium*, (DO<sub>600</sub> = 5.8); (T4) natural soil with no processes of sterilisation; The treatments T1 to T4 were carried out from April to August 2016. The inoculums in T2 and T3 were made according to the cell growth phase described for P(3HB) production, with the temperature of 36 °C for *B. megaterium*. After that, 10 mL of the respective inocula were applied in 1 cm depth. After the experiments, the soils were sterilised prior to proper disposal.

The appropriately weighed phb samples were then individualized into polyester fabric housings, an inert material which, having a low degradation rate, did not interfere in the experiment itself. This individualization was due to the potential difficulty of recovery of the samples after the degradation test occurred.

## **Analysis of the Test Samples**

### **Percentage of biodegradation**

The samples were collected at 20, 40, 60, 80 and 100 days, carefully washed with distilled water and oven-dried at 56 °C for 24 hours. The mass loss was analysed by gravimetry and the biodegradation by the percentage of mass loss according to equation 1 (Yew et al., 2006),

$$\text{Biodegradation \%} = \left[ \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \right] \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

where W<sub>1</sub> is the initial mass of the film and W<sub>2</sub> is the mass of the film after the period of biodegradation.

## **Macro and micro structural characterisation**

Photographs to macrostructural analysis were performed using a digital camera (LG K8, South Korea) of 8 megapixels and 3264 x 2448 pixels of resolution.

The microstructural characterisation was performed by scanning electron microscopy (Carl Zeiss Supra 35-V, Germany), conducted at room temperature with a voltage of 10 kV with the samples being previously metallised with gold layer overlay. Samples were analysed at time 0 and after 60 days of biodegradation.

### **Statistical analysis**

All averages were calculated from the triplicates of each treatment and the statistical analyses were performed using Tukey test with significance level of 5% using the program Statistix 8 and the means with standard deviations were generated by the program GraphPad Prism 7.

## **Results and discussion**

### **Percentage of Biodegradation**

Microorganism biodegradation mechanism consists of 3 stages: first, the deposition of biofilms for bacterial adhesion and establishment of colonies on the surface (Capitelli et al., 2006); second, the biofilms serve as a surfactant facilitating ionic exchanges between hydrophobic and hydrophilic phases (Warscheid and Braams, 2000) and the third stage, where the polimeric degradation is related to the excretion of degradative enzymes by the bacterial colonies, which assimilates the polymer as a source of carbon and nitrogen (Pelman, 2005). In soil, under the tested conditions, all the bioplastics presented degradation, which increased according to the time elapsed as shown in figure 1.

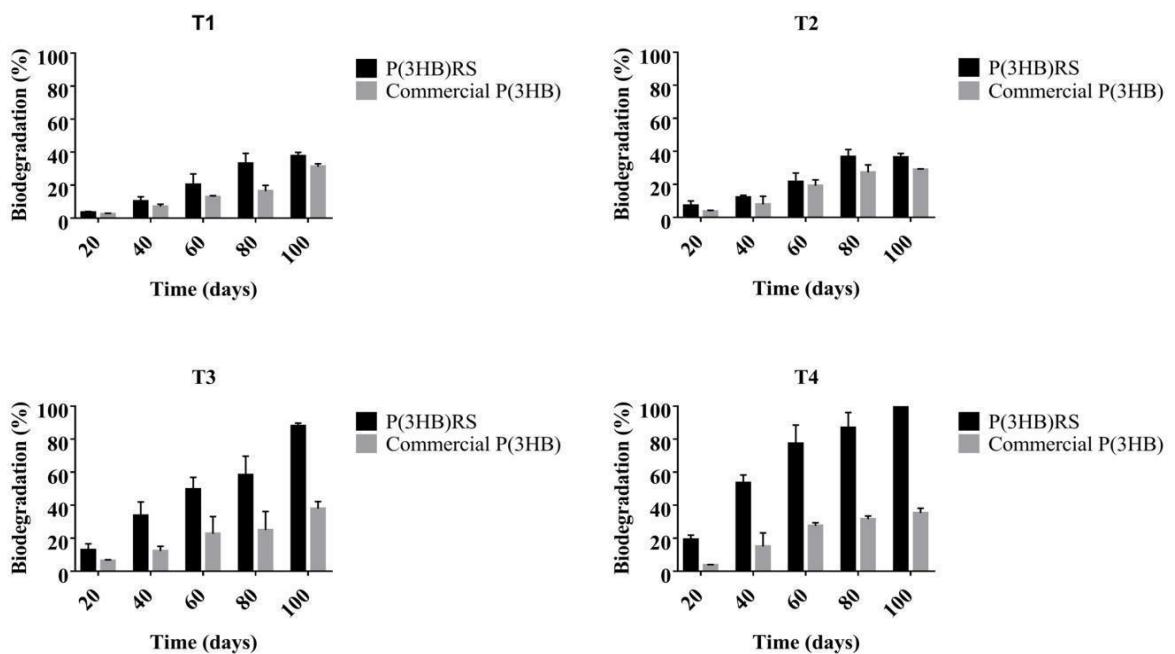
P(3HB)RS presented the highest biodegradation degree in all treatments which was different to that observed in commercial P(3HB). The most effective biodegradation results were shown in treatments T3 and T4 with soil sterilized and inoculated with *B. megaterium* CN3 (88%) and natural unsterilized soil (100%) respectively. Similar results to those obtained in T3 and T4 have been described by Bucci et al. (2007) that obtained 100% in 90 days, Altaee et al. (2016), with 56% in 42 days and Weng et al. (2011), with 79.9% after 110 days.

The biodegradability capacity of P(3HB)-producing bacteria was observed in T3 (88%) in 100 days for P(3HB)RS, with the presence of *B. megaterium* CN3, which shown much higher biodegradation when compared to inoculated soil with *Ralstonia solanacearum* RS (T2-33%) and sterilised soil (T1-37%). The bacterium *Bacillus megaterium* possibly followed the steps of the microbial degradation mechanism more effectively, since the soil is its natural environment and researches demonstrate that it can aid the development of plants in general (Mendes, 2003). This fact can be attributed to the ability of *B. megaterium* CN3 to synthesise and excrete a large amount of the depolymerase enzyme involved in the bacterial pathway responsible for the breakdown of P(3HB) monomers (Grigull et al., 2015). Tansengco and Tokiwa (1998) analysed the biodegradation capacity of *Bacillus* sp. *in vitro* incubated at 56 °C. It was observed after 2 weeks 14.3% of mass loss of the films *Bacillus gelatinii* was evaluated by Anh et al. (2010), achieving more than 50% PHB biodegradation after 30 days of incubation *in vitro*. These results are in agreement with those obtained in the present study.

In T2 (sterilised soil with *R. solanacearum* RS) comparing to T3, the lower biodegradation rates were probably due to the low adhesion of the inoculated bacteria to the bioplastic film or the low production of functional and effective depolymerases to degrade it. *Ralstonia solanacearum* has been known as a phytopathogenic bacterium and has its effective growth only in infectious process (Genin and Denny, 2012). Despite that, Boyandin et al. (2013) described the genus *Ralstonia* as a potentially P(3HB) degrader. Similar results were presented in T1 (negative control) where the sterilization process extinguished the native microorganisms of the soil, producing an unfavorable environment to microbiological biodegradation. To both treatments, the probable mechanism of degradation is related to the abiotic conditions, such as hydrolysis, which comprises a degradation process where the breakage of ester bonds occurs (Rosa and Filho, 2002). Similar results have been presented by Bonartesev et al. (2012) for the PHB synthesized by *Azotobacter chroococcum* 7b in the study of hydrolytic degradation, which obtained 20% degradation in 91 days.

Biodegradative capacity of microorganisms have been studied in *in vitro* systems by the measurement of the halo formed around colonies of microorganisms consuming bioplastic as the sole source of carbon in solid medium (Kumaravel et al., 2010; Volova et al., 2010) and by inoculation of bacteria with P(3HB) films in liquid

medium (Colak and Guner, 2004; Woolnough, et al., 2008). The present study was conducted under simulated conditions in a greenhouse, although not described in the literature, proved to be a valid method to describe the biodegradation and catabolic capacity of the bacteria tested.



**Figure 1.** Percentage of biodegradation of P(3HB)RS and commercial P(3HB) in 20, 40, 60, 80 and 100 days in the treatments. (T1) sterilised soil; (T2) sterilised soil with *R. solanacearum* RS; (T3) sterilised soil with *B. megaterium* CN3; (T4) natural soil;

The difference between the biodegradation of commercial P(3HB) and P(3HB)RS may be related to the molar mass thereof. According to Gu (2003), the molecular weight, composition of the polyester and the dominant specie of bacteria can interfere in the surface erosion. The average weight ( $M_w$ ) of P(3HB)RS of  $2.9 \times 10^5$  Da (Macagnan et al., 2017) being approximately two times lower in comparison to commercial P(3HB), which ranges from  $5.6 \times 10^5$  Da (Machado et al., 2010) to  $6.0 \times 10^5$  Da (Faria and Martins-Franchetti, 2010). This is an extremely important factor directly affecting the mechanical strength of the bioplastic as well as the expansion capacity, the hydrolysis and consequently the biodegradation rate (Montoro et al., 2010). This therefore explains the faster biodegradation of P(3HB)RS.

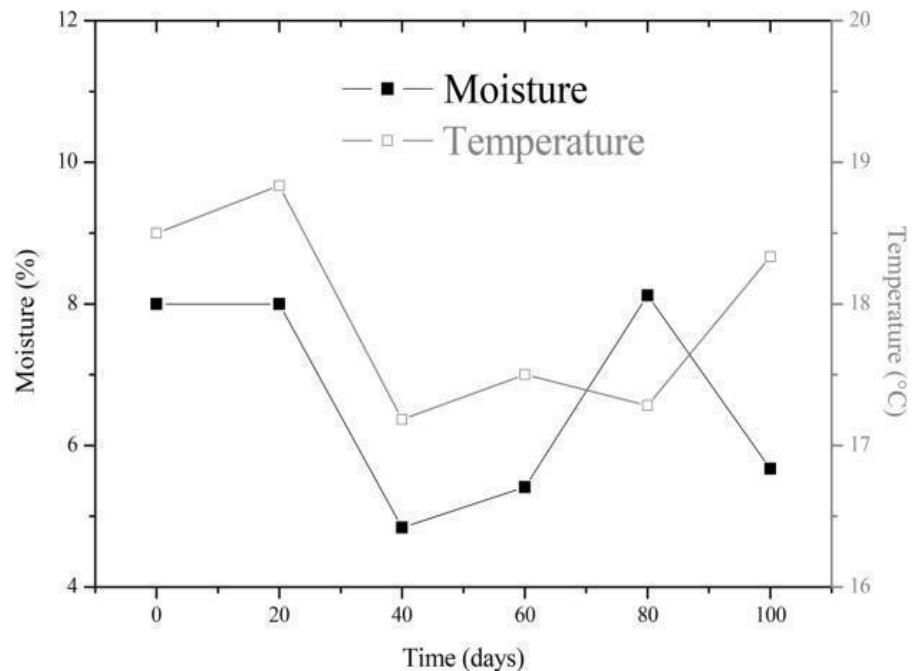
It is also reported in the literature that depolymerisation, consisting of the cleavage of polymer molecules progressively reducing their molar mass (Lucas et al., 2008) is one step of biodegradation process. Lim et al. (2005) demonstrated the decrease in molar mass of P(3HB) (Fluka) film from  $1.0 \times 10^5$  Da to  $8.3 \times 10^4$  Da and  $9.1 \times 10^4$  Da in mangrove and after biodegradation for 112 days in tropical forest soil. Volova et al. (2017) also determined the molar mass changes of P(3HB) films synthesised by *Cupriavidus eutrophus* B10646 after 28 days of soil biodegradation from  $6.2 \times 10^5$  to  $5.9 \times 10^5$  Da.

### **Soil Temperature and Moisture**

The experiments were performed from April to August 2016, period of lower temperature average as shown in figure 2. Similar temperatures were recorded in the experiment developed by Weng et al. (2013) on the biodegradation of P(3HB) in soil and by Lim et al. (2005) on biodegradation in forest and mangrove soils. Volova et al. (1998) reports that higher temperatures tend to favour biodegradation, however, they should not exceed 35 °C, the optimum temperature being 28 °C. In other study, Volova et al. (2017) found that temperatures near 21 °C tended to decrease the degradation level of PHAs, whereas at 28 °C it was higher. However, the results presented in this study demonstrated a higher rate of mass loss in average values of temperature of 18 °C. Therefore, temperature was adequate for survival and reproduction of microorganisms according to figure 1.

Superior soil moisture is presented in the experiments conducted by Boyandin et al. (2011) that analysed the biodegradation of P(3HB) in root zones of Siberian larch (*Larix sibirica L.*), obtaining 18-28% of humidity and under a drooping birch (*Betula pendula L.*), obtaining values between 11- 23%. In addition, Lim et al. (2005) reported values of humidity around 72% with bioplastic buried under mangrove soil. The moisture values recorded in the present study may differ from the values presented in the literature due to the use of greenhouse in opposition to open field. Despite this, even with moisture values lower than those reported in the literature, similar percentages of biodegradation were observed. For example, Lim et al. (2005) reported losses of 73.5% of P(3HB) buried in forest soil for 112 days and Boyandin et al. (2011) reports loss of mass in 78% of P(3HB). This evidences the validity of the degradation experiment conducted in the greenhouse by providing adequate data and simulating

natural disposal conditions. Although previous research has reported that low levels of moisture tend to limit the growth and activity of microorganisms (Kapanen et al., 2008; Accinelli et al., 2012), in the present study, moisture content was not a limiting factor.



**Figure 2.** Average soil moisture and temperatures during the 100 days of the greenhouse experiment.

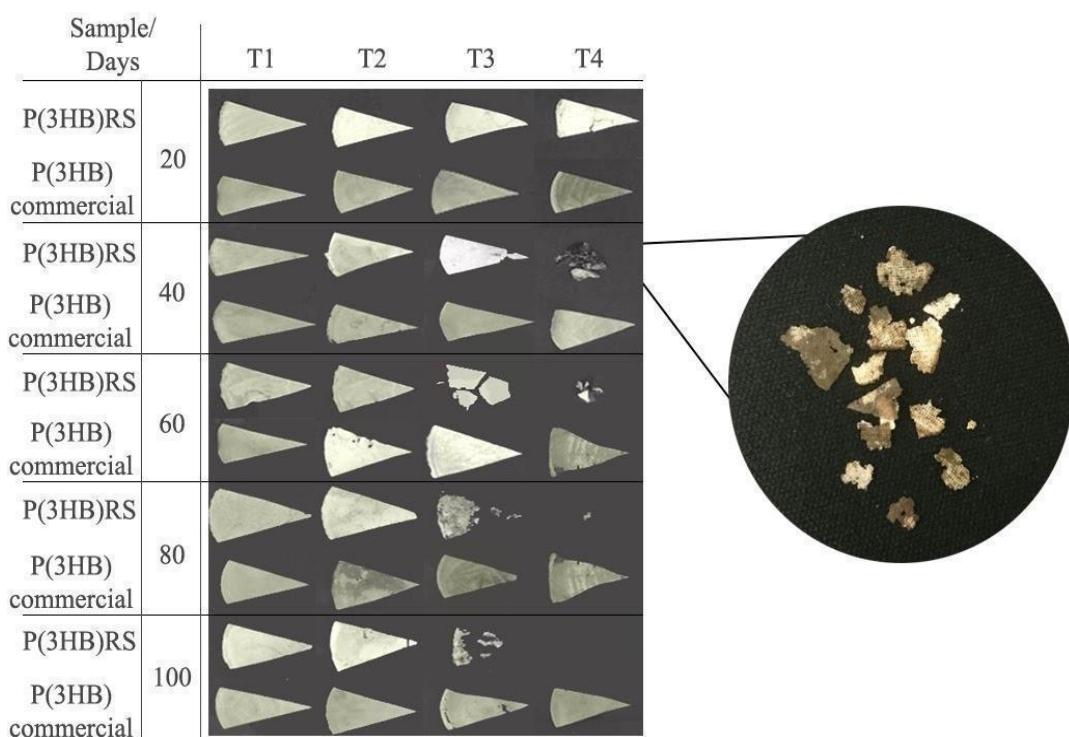
### Macro and Micro Structural Characterisation

Physical modifications in the surface morphology of P(3HB)RS films were observed by macrostructural analysis (figure 3) which includes cracks, holes, gradual mass loss and colour changes, which increased according to the time of biodegradation. As for commercial P(3HB), the physical surface modifications observed were a few cracks and colour changes. A correlation between the results of percentage biodegradation presented in figure 1 and the physical changes in the surface of the bioplastics can be observed, which can be attributed to the fragmentation and assimilation of the bioplastics by the microorganisms.

The physical modifications in the surface morphology of the films of P(3HB)RS were higher than those presented by the commercial P(3HB), as already observed in the T4 with the beginning of fissures at 20 days of biodegradation.

Similar results are reported by Weng et al. (2013) for the biodegradation of P(3HB) in landfill. After 30 days the fragmentation of the polymers were macroscopically visualized, which increased until 150 days of experiment, and at 90

days complete biodegradation of one of the samples was observed, which was also detected in T4 for P(3HB)RS at 100 days of biodegradation. Weng et al. (2011) evaluated the biodegradation of P(3HB) under simulated conditions of the intense aerobic composting process and a decrease in the size of the films from 10 days of the process was observed. Altaee et al. (2016) perceived the presence of holes and loss of mass in the biodegradation of P(3HB) in fertile garden soil.



**Figure 3.** Macroscopic analysis of P(3HB)RS and commercial P(3HB) films at 20, 40, 60, 80 and 100 days in the treatments. (T1) sterilised soil; (T2) sterilised soil with *R. solanacearum* RS; (T3) sterilised soil with *B. megaterium* CN3; (T4) natural soil.

The samples present in Figure 3 shows the changes in colouration of bioplastics through the appearance of dark blurred areas that may have been caused by deposition of extracellular material excreted by microorganisms, water accumulation, penetration into the matrix of and/or excretion of lipophilic microbial pigments, especially the highlighted sample (Araújo et al., 2015). Pellicano et al. (2009) reported the detection of dark brown and reddish pigments in the biodegradation assay of PHBV/Ecoflex®/cassava starch and PHBV/Ecoflex® blends, respectively. Altaee et al. (2016) also reports the colour change of bioplastics after the process of biodegradation of P(3HB) in fertile garden soil.

Bioplastics films micro-morphology modifications over time were more noticeable in T4, as presented in figure 4. It can be seen that the bioplastic samples surface at initial time have porosities and it was observed that P(3HB)RS had higher porosity than commercial PHB, being more susceptible to biodegradation due to its larger surface contact area.

For P(3HB) RS the formation of large round cavities occurs in 20 days evidencing the bacterial accumulation on the surface. After the 40 day period, there are cracks in the surface of the polymer that were observed even in higher number after 60 days, fractures increases as much as the number of hyphae and the appearance of structures derived from microorganism (Yew et al., 2006; Ong and Sudesh, 2016). Thereafter, the accumulation of biomass-derived material in continuous growth up to 60 days is evident. The results of pores and biological material deposited on the surface are consistent with Corrêa et al. (2008) in that the same conditions were found after five months of biodegradation in soil. As for commercial P(3HB), the appearance of pores was visible from the 40 day, increasing continuously up to 60 and possibly further, also evidencing the accumulation of colonies of microorganisms on surface.

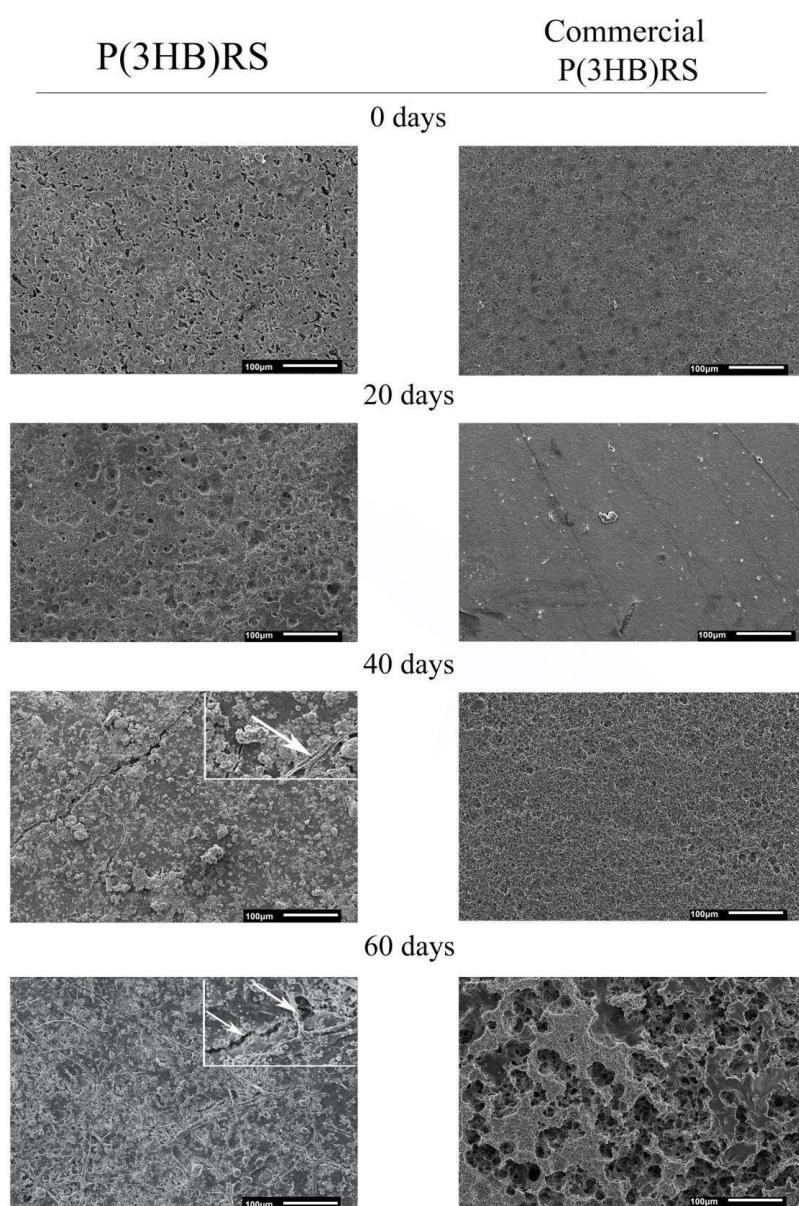
Since there are a different degrees of degradation between the polymers, the micrographs could evidence the establishment of a soil biodegradation process, since they cover most of the steps at different times of degradation.

The biodegradation process begins when the polymeric material is placed in a microbiologically active environment, in this study it starts when the film was buried. After the adaptation of the native microbiota with the material, the appearance of pores and cavities initiate, as evidenced by commercial P(3HB) in 40 days, and P(3HB) RS in 20 days. In this step it is important to note that the pores are formed due to enzymatic degradation and assimilation of the polymeric material by the colonies of adhered microorganisms (Pelmont, 2005), and the porosity of the material continues to increase until the surface is completely deformed.

After the bacterial degradation process, and most likely due to excessive deformation of the surface, the number of microorganisms like fungi begin to adhere more intrinsically to the polymer. The presence of hyphae could also exist on the surface of the film in 20 days, but with its integrity not yet fully committed, after washing with distilled water, the structure could have been easily removed. The presence of

hyphae that increase continuously with time (as evidenced at 40 and 60 days of P(3HB)RS on the right corner) may indicate internal cavities and relative increase of the contact surface. Finally, the biodegradation of the polymer material at its most advanced stage is associated with the physical and visible breakage of the polymer, with cracks derived from the mechanical strength of the hyphae and complete disintegration of the uniformity of the polymer surface, as shown in the 60 day micrograph of the P(3HB)RS.

According to the micrographs and the process described above, P(3HB)RS is in a more advanced stage of biodegradation, since by the difference of the mass loss, it is possible to prove the difference in the rates of degradation.



**Figure 4.** Scanning electron micrograph of the surface of P(3HB)RS and commercial P(3HB) films at 0, 20, 40 and 60 days of biodegradation assay in T4 (natural soil)

The treatments T1 and T3 that contained sterilised soil and *B. megaterium* CN3 respectively (data not show), presented a significant difference on the number of pores of the polymer surface, evidencing the biodegradation as a result of bacterial adhesion and enzyme excretion and the biodegradative capacity of this bacterium. T1 and T2 (sterilised soil with *R. solanacearum*) presented differences in relation to the samples at the initial time, but it was not significant enough, bearing in mind the results of biodegradation rate.

## Conclusion

Biodegradation was observed in both P(3HB)s in all treatments analysed, with the highest percentage of biodegradation being P(3HB)RS. It has been proven that the type of bacteria used interferes with the percentage of biodegradation, as observed in the *Bacillus megaterium* CN3 treatment, which presented biodegradation capacity on the biodegradation of P(3HB)RS. Moisture positively influenced the biodegradation process of P(3HB)s and the lower temperatures presents in this study not influence in the microbial growth. The microscopy and macroscopy analyses proved the presence of microorganisms and the biodegradation process which as confirmed by the color change and the presence of cracks and hyphae. Therefore, the greenhouse experimental methodology tested in this study was able to verify the biodegradation capacity of biologically active microorganisms and to simulate a microenvironment with the natural steps of biodegradation.

## 5- Conclusão Geral

O trabalho foi concluído produzindo resultados relevantes frente aos objetivos propostos. Foi atestado a biodegradabilidade do P(3HB) produzido em laboratório por *R. solanacearum*, e este se provou mais facilmente degradável do que o comercialmente disponível da marca BioCycle. Foi comprovada a capacidade do microrganismo *B. megaterium* em degradar extracelularmente o polímero no solo mais facilmente do que *R. solanacearum*, justificando assim seu uso como suplemento

auxiliar de solo, na degradação de polímeros. Além disso, baseado em valores de literatura, alguns resultados foram os mesmos encontrados em outros tipos de simulações de degradação, comprovando a validade do experimento realizado.

## **6- Perspectivas futuras**

O presente trabalho forneceu resultados interessantes que devem ser explorados ainda mais para fornecer uma análise mais completa acerca da degradação do P(3HB) em solo e a capacidade das respectivas bactérias em degradá-lo. Mais análises devem ser feitas nos tipos de polímeros, para diferenciá-los ainda mais sob pontos de vista físico-químico a fim de justificar as diferentes velocidades de degradação. Além disso, estudos *in vitro* devem ser conduzidos com a bactéria *B. megaterium* a fim de isolar possíveis enzimas responsáveis pela degradação extracelular de P(3HB) e analisar sua eficácia com modelos tridimensionais *in silico* e ensaios de degradação *in vitro*. Por fim, o estudo comprovou como a diferença de uma microbiota nativa na degradação em solo pode influenciar na velocidade de deterioração de um determinado objeto, análises interessantes e passíveis de serem feitas também incluem análises de metagenoma, capazes de identificar e comprovar gêneros de espécies de microrganismos presentes em uma determinada amostra de solo, para determinar o padrão de microbiota mais efetiva na degradação de P(3HB).

## Referências

Anderson, A.J.; Dawes, E.A. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, 4(4): 450-472.

Accinelli C, Saccà M, Mencarelli M, Vicari A. (2012) Deterioration of bioplastic carrier bags in the environment and assessment of a new recycling alternative. **Chemosphere**. 89(2):136-143. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.028>

Altaee N, El-Hiti G, Fahdil A, Sudesh K, Yousif E. (2016) Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. **Springerplus**. 5(1): 762. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2480-2>

Anh T T V, Toan N T K, Huy N Q. (2010) Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Bacillus gelatinii* isolated from Vietnam. **Tap chi Sinh hoc**. 32(3): 72-77.

Anstey A, Muniyasamy S, Reddy M, Misra M, Mohanty A. (2014) Processability and Biodegradability Evaluation of Composites from Poly(butylene succinate) (PBS) Bioplastic and Biofuel Co-products from Ontario. **J Polym Environ**. 22(2):209-218.

Araújo R, Conceição I, Carvalho L, Alves T, Barbosa R. (2015) Influência da argila vermiculita brasileira na biodegradação de filmes de PHB. **Polímeros**. 25(5):483-

Bonartsev A, Boskhamodgiev A, Iordanskii A, Bonartseva G, Rebrov A, Makhina T et al. (2012) Hydrolytic Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), Polylactide and their Derivatives: Kinetics, Crystallinity, and Surface Morphology. **Mol Cryst Liq Cryst**. 556(1):288-300.

Boyandin, A. N. et al. (2013) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 83:77–84.

Boyandin A, Prudnikova S, Filipenko M, Khrapov E, Vasil'ev A, Volova T. (2011) Biodegradation of polyhydroxyalkanoates by soil microbial communities of different structures and detection of PHA degrading microorganisms. **Appl Biochem Microbiol**. 48(1):28-36.

Brito, G.F.; Agrawal, P.; Araújo, E.M. Mêlo, T.J.A. (2011). Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, 6.2: 127-139.

Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R. (2011). Accumulation of microplastic on shorelines worldwide: sources and sinks. **Environ. Sci. Technol.** 45, 9175–9179.

Browne, M.A., Dissanayake, A., Galloway, T.S., Lowe, D.M., Thompson, R.C. (2008). Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, *Mytilus edulis* (L.). **Environ. Sci. Technol.** 42, 5026–5031.

Bucci D, Tavares L, Sell I (2007) Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. **Polym Test.** 26(7):908-915.

Cappitelli F, Principi P, Sorlini C. (2006) Biodeterioration of modern materials in contemporary collections: can biotechnology help?. **Trends Biotechnol.** 24(8):350-354.

Casarín S, Agnelli J, Malmonge S, Rosário F. (2013) Blendas PHB/copolíesteres biodegradáveis : biodegradação em solo. **Polímeros.** 23(1):115-122.

Colak A, Güner S. (2004) Polyhydroxyalkanoate degrading hydrolase-like activities by *Pseudomonas* sp. isolated from soil. **Int Biodeterior Biodegradation.** 53(2):103-109.

Corrêa M, Rezende M, Rosa D, Agnelli J, Nascente P. (2008) Surface composition and morphology of poly(3-hydroxybutyrate) exposed to biodegradation. **Polym Test.** 27(4):447-452.

Coutinho, B C Et Al. (2007) A Importância E As Vantagens Do Polihidroxibutirato (Plástico Biodegradável). **Hilos**, 3: 76-81.

Emadian S, Onay T, Demirel B. (2007) Biodegradation of bioplastics in natural environments. **Waste Manage.** 59:526-536.

Faria A, Martins-Franchetti S. (2010) Biodegradação de filmes de polipropileno (PP), poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e blenda de PP/PHB por microrganismos das águas do Rio Atibaia. **Polímeros.** 20(2):141-147.

Farrell, P., Nelson, K. (2013). Trophic level transfer of microplastic: *Mytilus edulis* (L.) to *Carcinus maenas* (L.). **Environ. Pollut.** 177, 1–3

Genin S, Denny T. (2012) Pathogenomics of the Ralstonia solanacearum Species Complex. **Annu Rev Phytopathol.** 50(1):67-89.

Grigull V, Mazur L, Garcia M, Schneider A, Pezzin A. (2015) Estudo Da Degradação De Blendas De Poli(Hidroxibutirato-Co-Hidroxivalerato)/Poli(L-Ácido Lático) Em Diferentes Condições Ambientais. **Engevista.** 17(4).

Gu J. (2003) Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **Int Biodeterior Biodegradation.** 52(2):69-91.

Harwood, P. (1997). **Further Chemistry.** Harper, Londres.

Jendrossek, D.; Knoke, I.; Habibian, R.; Steinfichel, A. (1993). Degradation of Poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by Bacteria and Purification of a Novel PHB Depolymerase from Comamonas sp. **Annu. Rev. Microbiol.** 56: 403–32.

Kapanen A, Schettini E, Vox G, Itävaara M (2008) Performance and Environmental Impact of Biodegradable Films in Agriculture: A Field Study on Protected Cultivation. **J Polym Environ.** 16(2):109-122.

Kumaravel S, Hema R, Lakshmi R (2010) Production of Polyhydroxybutyrate (Bioplastic) and its Biodegradation by Pseudomonas Lemoignei and Aspergillus Niger. **E- J Chem.** 7(s1):S536-S542

Lim S, Gan S, Tan I. (2005) Degradation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in tropical forest and mangrove soils. **Appl Biochem Biotechnol.** 126(1):23-33.

Lucas N, Bienaime C, Belloy C, Queneudec M, Silvestre F, Nava-Saucedo J. (2008) Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review. **Chemosphere.** 73(4):429-442.

Macagnan K, Rodrigues A, Alves M, Furlan L, Kesserlingh S, Moura A et al. (2017) Simplified recovery process of Ralstonia solanacearum-synthesized polyhydroxyalkanoates via chemical extraction complemented by liquid-liquid phase separation. **Quím Nova.** 40(2):125-130.

Machado M, Pereira N, Miranda L, Terence M, Pradella J. (2010) Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero Poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/pó de madeira. **Polímeros**. 20(1):65-71.

Mendes I, Reis Junior F. (2003) Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina: Embrapa Cerrados. **Embrapa Cerrados**, ISSN 15175111.

MERUGU, R.; (2012). Studies on PHB (Polyhydroxybutyrate) degradation by some species of Aspergillus. **International Journal of ChemTech Research**, 4(3):1111-1113.

Montoro S, Shigue C, Sordi M, Santos A, Ré M. (2000) Estudo cinético da redução da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). **Polímeros**. 20(1):19-24.

Ong S, Sudesh K. (2016) Effects of polyhydroxyalkanoate degradation on soil microbial community. **Polym Degrad Stab**. 131:9-19.

Pellicano M, Pachekoski W, Agnelli J. (2009) Influência da adição de amido de mandioca na biodegradação da blenda polimérica PHBV/Ecoflex®. **Polímeros**. 19(3):212-217.

Pelmont J. (2005) Biodégradations et métabolismes. **Les Ulis: EDP sciences**. Edp Sciences, Les Ulis Cedex A, France

REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; RASHMI, V.C.; (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137–146.

Rosa D, Chui Q, Pantano Filho R, Agnelli J. (2012) Avaliação da Biodegradação de Poli-beta-(Hidroxibutirato), Poli-beta-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-épsilon-(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros**. 12(4):311-317.

Schröpfer, S.B.; Bottene, M.K.; Bianchin, L.; Robinson, L.C.; Lima, V.; Jahno, V.D.; Barud, H.; Riberiro, S.J.L. (2015). Biodegradation evaluation of bacterial cellulose, vegetable cellulose and poly(3-hydroxybutyrate) in soil. **Polímeros**, 25 (2): 154-160.

Tansengco M, Tokiwa Y. (1997) Thermophilic microbial degradation of polyethylene succinate. **World J Microbiol Biotechnol**. 14(1):133-138.

Volova T, Belyaeva O, Plotnikov V, Puzyr A. (1998) Studies of Biodegradation of Microbial Polyhydroxyalkanoates. **Appl Biochem Microbiol.** 34(5):488-492.

Volova T, Boyandin A, Vasiliev A, Karpov V, Prudnikova S, Mishukova O et al. (2010) Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. **Polym Degrad Stab.** 95(12):2350-2359.

Volova T, Prudnikova S, Vinogradova O, Syrvacheva D, Shishatskaya E. (2017) Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates with Different Chemical Compositions and Their Biodegradability. **Microb Ecol.** 73(2):353-367.

Von Moos, N., Burkhardt-Holm, P., Kohler, A. (2012). Uptake and effects of microplastics on cells and tissue of the blue mussel *Mytilus edulis* L. after an experimental exposure. **Environ. Sci. Technol.** 46, 11327–11335.

Wang Z, Lin X, An J, Ren C, Yan X. (2013) Biodegradation of Polyhydroxybutyrate Film by *Pseudomonas mendocina* DS04-T. **Polym Plast Technol Eng.** 52(2):195-199.

Warscheid T, Braams J. (2000) Biodeterioration of stone: a review. **Int Biodeterior Biodegradation.** 46(4):343-368.

Weng Y, Wang L, Zhang M, Wang X, Wang Y. (2013) Biodegradation behavior of P(3HB,4HB)/PLA blends in real soil environments. **Polym Test.** 32(1):60-70.

Weng Y, Wang X. (2011) Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. **Polym Test.** 30(4):372-380.

Woolnough C, Charlton T, Yee L, Sarris M, Foster L. (2008) Surface changes in polyhydroxyalkanoate films during biodegradation and biofouling. **Polym. Int.** 57(9):1042-1051. <https://doi.org/10.1002/pi.2444>

Yew S, Tang H, Sudesh K. (2006) Photocatalytic activity and biodegradation of polyhydroxybutyrate films containing titanium dioxide. **Polym Degrad Stab.** 91(8):1800-1807.