

**Laboratório Nacional de Biorrenováveis  
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais**

**Projeto de Iniciação Científica PIBIC/CNPq**

**Prospecção de novos microrganismos e enzimas com potencial biotecnológico para  
despolimerizar plásticos**

**Pesquisadora Responsável  
Dra. Gabriela Felix Persinoti**

**Abril/2023**

## **Introdução**

Os polímeros sintéticos derivados do petróleo utilizados na produção de plásticos são omnipresentes e fundamentais no nosso estilo de vida atual; no entanto, seu acúmulo é uma grande preocupação para o ambiente e a saúde humana. A produção de plásticos em escala comercial começou no século passado e aumentou exponencialmente nos últimos anos, atingindo mais de 350 milhões de toneladas por ano, sendo uma grande fração utilizada uma única vez. Esta utilização excessiva e indiscriminada e a ausência de políticas de reciclagem em grande escala ou de utilização circular resultaram em um acúmulo sem precedentes de resíduos de plástico nos ecossistemas aquáticos e terrestres. De acordo com o programa ambiental das Nações Unidas, prevê-se que a quantidade de resíduos de plástico eliminados nos ecossistemas aquáticos irá triplicar até 2040, agravando os efeitos prejudiciais para a saúde humana e para a biodiversidade da Terra.

Para superar este enorme desafio da poluição plástica, é necessário repensar a o modo de utilização dos plásticos e impulsionar o desenvolvimento e o estabelecimento de novas biotecnologias para promover a despolimerização microbiana e a utilização circular dos plásticos. Assim, a identificação de novas enzimas e vias microbianas que atuam sobre plásticos é urgente.

A bioprospecção que consiste na busca sistemática por organismos, genes, enzimas ou compostos de interesse pode levar a incorporação de fontes renováveis para produção de combustíveis, energia e produtos químicos de valor agregado e diminuir nossa dependência por fosséis. Além disso, a bioprospecção de enzimas com atividade de despolimerização de plásticos (PAZymes) pode auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias para reduzir o acúmulo de poluentes plásticos, o que é essencial para tornar nossos processos produtivos mais sustentáveis do ponto de vista social, econômico e ambiental.

Neste contexto, o sequenciamento de amostras ambientais em larga escala (metagenômica) tem propiciado o aumento do número de sequências gênicas depositadas em bancos de dados, além de abrir novas possibilidades em relação a exploração de possíveis fontes genéticas para síntese de bioprodutos que podem ser aplicados em diversos setores industriais. Portanto, a identificação de novos microrganismos e enzimas com potencial ainda não explorado para despolimerizar plásticos será importante para o desenvolvimento de inovações dentro de processos industriais, que pode estimular a síntese de bioprodutos com valor agregado e promover a transição para uma bioeconomia circular.

## **Objetivos**

- 1- Estabelecimento de consórcios microbianos para a triagem de microrganismos com capacidade de despolimerizar plásticos por meio de ensaios de crescimento em meios de cultura específicos com diferentes substratos
- 2- Identificar os microrganismos de interesse por meio de sequenciamento em larga escala dos metagenomas dos consórcios microbianos que se mostrarem mais promissores
- 3- Realizar análises de Bioinformática para a montagem de genomas recuperados dos metagenomas dos diferentes consórcios microbianos estabelecidos
- 4- Empregar estratégias computacionais para a busca e predição de novos genes cujos produtos possam ter atividade de despolimerização ou processamento plásticos a partir dos dados de genomas recuperados dos consórcios microbianos.

## **Metodologia**

### **Estabelecimento de comunidades microbianas degradadoras de plástico**

Amostras de mangues contaminados com plásticos serão utilizadas como inóculo para o estabelecimento de comunidades microbianas degradadoras de plásticos (consórcios).

Resumidamente, 1g de solo será adicionado a 100 ml de meio Bushnell Haas Broth (Sigma-Aldrich) suplementado com um composto sintético recalcitrante derivado de plástico como única fonte de carbono, incluindo polietileno de baixa densidade (LDPE), polietileno de alta densidade (HDPE), policloreto de vinilo (PVC), polipropileno (PP) e politereftalato de etileno (PET) e cultivado de forma aeróbica a 50°C durante 7 dias. Os enriquecimentos microbianos serão obtidos através da transferência semanal de alíquotas (3 ml) da suspensão microbiana para meio fresco durante, pelo menos, 12 passagens. Os enriquecimentos microbianos serão realizados em triplicata e as amostras serão recolhidas e armazenadas a -80 °C até seu ao processamento.

### **Extração de DNA**

Amostras das comunidades microbianas previamente estabelecidas serão pulverizadas com um moinho de bolas oscilante (MM400; Retsch Inc., Newtown, PA), homogeneizadas e utilizadas para extração de DNA. Resumidamente, 0,25 g de cada amostra serão transferidas para o Lysing Matrix E Tube - Kit FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedical, Inc.). Para a lise celular, será adicionado 1 ml de tampão RBB + C a cada amostra, seguido de homogeneização em um instrumento FastPrep® FP120 (MP Biomedical, Inc.). A precipitação dos ácidos nucleicos será obtida com a adição de uma solução de acetato de amônio (10 M). As amostras serão incubadas em gelo por 30 minutos, seguidas de centrifugação a 4 ° C por 10 minutos a 16.000 × g. A solução de ácidos nucleicos será lavada com etanol a 70%, seguido de secagem à temperatura ambiente e posteriormente eluído em 75 µL de água ultrapura autoclavada. Possíveis contaminações com RNA serão removidas por meio da adição de RNase livre de DNase (10 mg / mL). A purificação do DNA será realizada usando o PowerClean® DNA Clean-Up Kit (Mo Bio Laboratories, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e integridade do DNA será avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A solução de DNA será armazenada a -20 °C até a realização do sequenciamento.

### **Sequenciamento híbrido integrando *short e long reads***

Comunidades microbianas associadas a despolimerização de plásticos serão investigadas quanto à estrutura e função via sequenciamento metagenômico. Bibliotecas metagenômicas serão sequenciadas utilizando o equipamento Illumina NextSeq 2000, gerando reads paired-end de 2x250pb. A fim de complementar as análises do perfil funcional das comunidades microbianas, de forma a facilitar a recuperação de genomas completos a partir de metagenomas (MAGs), será empregado o sequenciamento de *reads* longos. Os reads longos podem ser utilizados como moldes para a montagem de *reads* curtos, o que irá impactar significativamente na qualidade da montagem *de novo* dos metagenomas, pois permite a realização de montagens mais completas, com menor fragmentação, melhorando a qualidade da predição gênica das comunidades de interesse. O sequenciamento de *reads* longos será realizado no Sequel II (PacBio).

### **Montagem *de novo* de metagenomas e recuperação de Genomas a partir de Metagenomas**

Os dados metagenômicos serão submetidos à verificação de qualidade usando o software FASTQC e Trimmomatic [1] para remover sequências de adaptadores e de baixa qualidade. Dados provenientes do metagenoma (MG) serão submetidos à montagem *de novo*, utilizando o MEGAHIT [2]. *Reads* longos obtidos por meio do sequenciamento PacBio serão usados para a realização de montagens metagenômicas híbridas utilizando o software OPERA-MS [3]. As montagens obtidas serão avaliadas quanto à integridade e fragmentação. As montagens obtidas consideradas de melhor qualidade serão submetidas à processo de *binning*, usando o pipeline MetaWrap [4] que emprega diversos algoritmos como CONCOCT e MaxBin, seguidos de

processo de de-replicação para remover redundâncias, com o intuito de recuperar *Metagenomes Assembled Genomes* (MAGs), que serão avaliados quanto à qualidade utilizando o CheckM [5].

### Análises filogenéticas e reconstrução metabólica

Para atribuir taxonomia aos genomas recuperados a partir dos metagenomas, a ferramenta GTDB-tk v.1.4 será empregada usando a versão 202 do banco de dados GTDB [6]. Análises filogenéticas e fiolgenômicas serão realizadas utilizando o conjunto de marcadores moleculares proposto pelo UBCG [7], combinado à métodos de máxima verossimilhança para a reconstrução filogenética implementados na ferramenta IQ-Tree [8]. A predição de genes e a anotação funcional serão realizadas usando a ferramenta Prokka v.1.11 com parâmetro `-meta` [9]. A predição de vias metabólicas e anotação dos genes usando os identificadores KEGG Orthologous (KOs) serão realizadas usando os bancos de dados KOFAM [10]. A reconstrução metabólica será realizada com a ferramenta *Annotation of Metabolite Origins* (AMON) [11], que com base nos identificadores KOs anotados irá prever as vias e metabólitos presentes em cada MAG.

### Plano de trabalho

Cronograma	1º bim	2º bim	3º bim	4º bim
Estabelecimento de consórcios microbianos para despolimerização de plásticos				
Sequenciamento metagenômico dos consórcios				
Montagem <i>de novo</i> de dados de metagenômica integrando reads curtos e longos				
Recuperação de Genomas a partir de Metagenomas (MAGs)				
Análises filogenéticas, Reconstrução metabólica e predição funcional de MAGs				
Escrita de relatório e divulgação dos resultados obtidos				

### Referências

- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014; **30**: 2114–2120.
- Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 2015.
- Bertrand D, Shaw J, Kalathiyappan M, Ng AHQ, Kumar MS, Li C, et al. Hybrid metagenomic assembly enables high-resolution analysis of resistance determinants and mobile elements in human microbiomes. *Nat Biotechnol* 2019; **37**: 937–944.
- Uritskiy G V., DiRuggiero J, Taylor J. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome* 2018.
- Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 2015; **25**: 1043–1055.
- Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database. *Bioinformatics* 2020; **36**: 1925–1927.
- Na S-II, Kim YO, Yoon S-HH, Ha S min, Baek I, Chun J. UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *Journal of Microbiology* 2018; **56**.
- Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 2015; **32**: 268–274.
- Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; **30**: 2068–2069.
- Aramaki T, Blanc-Mathieu R, Endo H, Ohkubo K, Kanehisa M, Goto S, et al. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold. *Bioinformatics* 2020; **36**: 2251–2252.
- Shaffer M, Thurimella K, Quinn K, Doenges K, Zhang X, Bokatzian S, et al. AMON: Annotation of metabolite origins via networks to integrate microbiome and metabolome data. *BMC Bioinformatics* 2019; **20**: 614.