UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) ISOLADAS EM RIOS DO AMAZONAS

LORENA MOTA DE CASTRO

Manaus – AM

2022

LORENA MOTA DE CASTRO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) ISOLADAS EM RIOS DO AMAZONAS

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador (a): Prof. Dr. José Odair Pereira

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Ézio Sargentini Junior

Manaus-AM

Abril/2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

L868ii Castro, Lorena Mota de
Isolamento, caracterização e análise genômica de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) isoladas em rios do Amazonas / Lorena Mota de Castro. Manaus : [s.n], 2022.
109 f.: color.; 30 cm.

Tese - PGSS - Biodiversidade e Biotecnologia (Doutorado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2022.
Inclui bibliografia
Orientador: Jose Odair Pereira
Coorientador: Ézio Sargentini Junior

1. Polihidroxialcanoatos. 2. Bactéria. 3. Lignina. 4. Genoma. I. Jose Odair Pereira (Orient.). II. Ézio Sargentini Junior (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Isolamento, caracterização e análise genômica de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) isoladas em rios do Amazonas

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

LORENA MOTA DE CASTRO

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS) ISOLADAS EM RIOS DO AMAZONAS

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Orientador (a): **Prof. Dr. José Odair Pereira**

Aprovada em 29/04/2022

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Odair Pereira
Presidente (UFAM)

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Membro Titular Interno (INPA)

Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen
Membro Titular Interno (UEA)

Profa. Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello
Membro Titular Externo (USP)

Prof. Dr. João Lucio de Azevedo
Membro Titular Externo (USP)

Prof. Dr. Lizandro Manzato
Suplente (IFAM)

Profa. Dra. Maria Helena Peregrinelli Fungaro
Suplente (UEL)

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu Senhor Jesus Cristo que tem sido o meu sustento nos bons e maus momentos, aos meus pais por todo o suporte e pelo amor incondicional e aos meus professores que foram essenciais para que tudo isso fosse possível.

AGRADECIMENTOS

A **Deus,** por ter me alcançado com sua Graça e me dado motivos para viver ao enviar seu Filho Jesus para me salvar.

A minha família, especialmente aos meus pais **Francisco Valdean** e **Rosemira de Castro** por todo o suporte emocional, financeiro e por me aguentarem nos maus momentos.

Ao meu orientador **Dr. Jose Odair Pereira** por ter aceitado o desafio de me orientar e por todo o suporte concedido.

Ao professor **Dr. Adolfo J. da Mota** por ter me recebido no seu laboratório, assim como, por ter aberto as portas para o intercâmbio no Japão, em parceria com o Prof**. Dr. Tetsuo Yamane** (*in memorian*) e, por toda orientação e contribuições valiosas nas publicações geradas.

Ao meu coorientador **Dr. Ézio Sargentini** Junior por toda a ajuda e por ter disponibilizado as instalações do seu laboratório.

A toda a equipe do **Laboratório de Biotecnologia/ Biodegradação** por todo o suporte e pelos divertidos momentos vivenciados no laboratório.

Ao professor **Dr. Keiji Numata** e a equipe do **Biomacromolecules Research Team**/RIKEN por ter me recebido em seu laboratório e dado todo o suporte e orientação para execução dos experimentos e publicações geradas.

Ao **RIKEN** pelo auxílio concedido como bolsista pelo programa International Program Associate.

A **FAPEAM** pela bolsa de doutorado concedida.

A **Universidade do Estado do Amazonas – UEA** por todo o suporte acadêmico.

A **Universidade Federal do Amazonas - UFAM** por toda a estrutura laboratorial e acadêmica.

Ao programa da **Rede BIONORTE/AM** por todo o suporte na minha formação.

A **todos** que contribuíram diretamente e indiretamente ao meu trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Porque o Senhor Deus me ajudou, pelo que não me senti envergonhado.

Isaías 50:7 Bíblia Sagrada

CASTRO, Lorena Mota de. **Isolamento, caracterização e análise genômica de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) isoladas em rios do Amazonas**. 2022. 109 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, 2022.

RESUMO

Polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros que possuem potencial para substituírem os plásticos derivados de fontes não renováveis de substratos e são naturalmente acumulados por microrganismos. Este estudo propôs o isolamento, identificação e análise genômica de bactérias provenientes de águas escuras em tributários do Rio Amazonas, capazes de sintetizar PHA utilizando diferentes fontes de carbono como substrato. Um meio de cultivo seletivo foi elaborado a partir da água superficial coletada, que foi enriquecida com material orgânico > 100KDa ao ser filtrada em filtro tangencial. Uma alíquota da água coletada foi espalhada neste meio preparado e foram obtidos 28 isolados que, após replicação em meio mineral salino e confirmação da fluorescência, 6 isolados foram selecionados. Outras 3 bactérias foram incluídas neste estudo. O método de coloração das células com o corante BODIPY^{TM} 505/515 também foi aplicado para confirmação das bactérias acumuladoras de PHA. *Ralstonia pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE foram isoladas de um lago de águas pretas localizado na reserva ecológica do Tupé, Iranduba, AM, Brasil. O isolado LB_TupeA foi capaz de acumular poli-(*R*)-3-hidroxibutirato [P(3HB)] quando cultivada em meio mineral salino acrescido de glicose, frutose e óleo de soja com rendimentos de 299.7, 573.4 e 622.2 mg.L^{-1}, respectivamente. Esta mesma cepa não acumulou PHA quando cultivada em lignina alcalina, porém P(3HB) foi detectado quando ácido vanílico e gálico foram utilizados em uma concentração de 10 g.L^{-1}. Por meio do sequenciamento e anotação genômica desta cepa, verificou-se que essa possui o arcabouço genético que possibilita o metabolismo desses derivados de lignina seguido da síntese de PHA. Altos rendimentos de P(3HB) foram obtidos com *Aquitalea* sp. quando submetida a cultura em uma fase, resultando em um aumento de 25x no acúmulo de PHA em comparação com a cultura em duas fases. *Aquitalea* sp. LB_TupeE produziu 1324.8 e 1060.0 mg.L^{-1} de P(3HB) respectivamente, quando foram utilizados como substrato glicose e sacarose. A identificação e confirmação taxonômica da cepa LB_RP2, isolada do rio Preto (Barcelos-AM), foi alcançada por meio de técnicas de análise genômica com a obtenção dos índices ANI (Average Nucleotide Identity) e TCS (Tetra Correlation Search) e análise de sequências multi-locus (MLSA) de genes do tipo housekeeping anotados do genoma deste isolado, confirmando assim que LB_RP2 se trata de um *Bacillus paramycoides*. Os genes associados as vias metabólicas de síntese de P(3HB-co-3HV) foram mapeados em *B. paramycoides* LB_RP2 e foi observado que esta cepa acumula P(3HB) quando cultivada em meios ricos em nutrientes. Em suma, esse é o primeiro relato de síntese de PHA por *B. paramycoides* e o sequenciamento de todo o genoma desses isolados permitiu a identificação do background genético para utilização de diversas fontes de carbono para a síntese de PHA.

Palavras-chave: *Polihidroxialcanoatos; Bactéria; Lignina; Genoma*

CASTRO, Lorena Mota de. **Isolation, characterization, and genomic analysis of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria (PHAs) isolated from Amazonian rivers**. 2022. 109 p. Thesis (Doctorate in Biotechnology) – State University of Amazonas, Amazonas, 2022.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers that have the potential to replace plastics derived from non-renewable sources of substrates and are also naturally accumulated by microorganisms. This study proposed the isolation, identification, and genomic analysis of bacteria from blackwaters in tributaries of the Amazon River, which are capable of synthesizing PHA using different carbon sources as substrate. A selective cultivation medium was prepared from the collected surface water, which was enriched with organic material of > 100 KDa when filtered in a tangential filter. An aliquot of the collected water was spread in this prepared medium and 28 isolates were obtained, which, after replication in saline mineral medium and fluorescence confirmation, 6 isolates were selected. Another 3 bacteria were included in this study. The method of staining the cells with the dye BODIPY^{TM} 505/515 was also applied for confirmation of the PHA-accumulating bacteria. *Ralstonia pickettii* LB_TupeA and *Aquitalea* sp. LB_TupeE were isolated from a blackwater lake located in the Tupé ecological reserve, Iranduba, AM, Brazil. *Bacillus paramycoides* LB_RP2 was isolated from the Preto River, which is a tributary of the Negro River and located in Barcelos, AM, Brazil. *R. pickettii* was able to accumulate poly-(*R*)-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] when cultivated in saline mineral medium with added glucose, fructose and soybean oil and produced yields of 299.7, 573.4 and 622.2 mg.L^{-1}, respectively. This same strain did not accumulate PHA when cultivated in alkaline lignin, but P(3HB) was detected when vanillic and gallic acid were used at a concentration of 10 g.L^{-1}. Through sequencing and genomic annotation of this strain, it was observed that it has a genetic framework that allows the metabolism of these lignin derivatives after the synthesis of PHA. High yields of P(3HB) were obtained with *Aquitalea* sp. when subjected to one-phase culture, which resulted in a 25-fold increase in PHA accumulation when compared to two-phase culture. Under the conditions mentioned, *Aquitalea* sp. produced 1,324.8 and 1,060.0 mg.L^{-1} of P(3HB) respectively, when glucose and sucrose were used as a substrate. The identification and taxonomic confirmation of LB_RP2 was achieved using genomic analysis techniques and acquisition of ANI (Average Nucleotide Identity) and TCS (Tetra Correlation Search) indices and analysis of multi-locus sequences (MLSA) of housekeeping-type genes annotated from the genome of this isolate, thus confirming that LB_RP2 is a *Bacillus paramycoides* strain. The genes associated with the metabolic pathways of synthesis of P(3HB-co-3HV) were mapped in *B. paramycoides* LB_RP2 and it was observed that this strain accumulates P(3HB) when grown in nutrient-rich media. In short, this is the first report of synthesis of PHA by *B. paramycoides,* and the sequencing of the entire genome of these isolates permitted the identification of the genetic background for use of various carbon sources for PHA synthesis.

Keywords: *Polyhydroxyalkanoates; Bacteria; Lignin; Genome*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção de plásticos global e resíduos gerados 18

Figura 2. Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos (em cinza) e alguns dos principais monômeros elucidados 20

Figura 3. Principais vias metabólicas elucidadas envolvidas na síntese de PHA 35

Figura 4. Sequência resumida das etapas executadas neste estudo 37

Figura 5. Processo de amostragem de bactérias selvagens com potencial para acumular PHA . 38

Figura 6. Métodos de seleção de bactérias sintetizadoras de PHA com os corantes Vermelho do Nilo (1 e 2) e BODIPY^{TM} (3 e 4) 50

Figura 7. Fluorescência característica da presença ou ausência de inclusões de PHA utilizando o corante BODIPY. S/F: Sem fluorescência 52

Figura 8. Morfologia das colônias e caracterização morfológica das células bacterianas cultivadas em meio rico nutriente dos isolados escolhidos 53

Figura 9. Árvore MLSA inferida usando o método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) 55

Figura 10. Perfil cromatográfico da fração clorofórmica da célula bacteriana submetida a reação de metanólise 57

Figura 11. Regressão linear baseada em diferentes concentrações do padrão externo de poli-(*R*)-3-hidroxibutirato versus a área do pico 57

Figura 12. **C**urva analítica com base no tempo de retenção de padrões de poliestireno e cromatograma GPC dos biopolímeros extraídos 58

Figura 13. Crescimento bacteriano x Tempo em meio rico nutriente das bactérias *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE 58

Figura 14. Polímeros de poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)] extraídos e secos 62

Figura 15. Crescimento celular de *R. pickettii* em meio salino adicionado a variantes da lignina comercial e lignina bruta (0,1%) em diferentes concentrações de metais 63

Figura 16. Influência da adição de lignina alcalina (0,1%) no crescimento bacteriano e síntese de PHA 63

Figura 17. Espectro de ^{1}H-RMN de P(3HB) sintetizado sob condições aeróbicas 69

Figura 18. Perfil de crescimento de *B. paramycoides* LB_RP2 em meio rico nutriente (A) e meio LB (B) em condições aeróbicas 70

Figura 19. Visualização de *B. paramycoides* cepa LB_RP$_2$ usando o método com corante BODIPY^{TM} 71

Figura 20. Mapeamento das vias metabólicas de *R. pickettii* LB_TupeA relacionadas a síntese de PHA montado a partir dos genes anotados no genoma 73

Figura 21. Mapeamento das vias metabólicas de *Aquitalea* LB_TupeE relacionadas a síntese de PHA montado a partir dos genes anotados no genoma 74

Figura 22. Vias metabólicas para a síntese de PHA propostas a partir dos genes anotados no genoma de *B. paramycoides* LB_RP2 79

Figura 23. Amplificação e clonagem do fragmento do gene *phaC* para posterior sequenciamento. 82

Figura 24. Árvore filogenética da sequência do gene da PHA sintase (*phaC*) de *R. pickettii* e *Aquitalea* sp. 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades mecânicas de alguns dos principais PHAs produzidos e caracterizados em comparação com o polipropileno derivado de petróleo 23

Tabela 2. PHAs sintetizados por diferentes espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* com alto acúmulo de polímero relativo a massa celular seca (>50%) 28

Tabela 3. Sequência dos primers degenerados desenhados para selecionar microrganismos produtores de PHA e composição da mistura de reação de ligação 44

Tabela 4. Identificação das bactérias isoladas por meio da comparação das sequências obtidas da região 16S rRNA com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI 51

Tabela 5. Resultados de índice de comparação de genoma par a par da cepa LB_RP2 e genomas selecionados no banco de dados. A porcentagem dos genomas cobertos é mostrada entre parênteses 54

Tabela 6. Avaliação da influência do tempo para produção do poliéster utilizando glicose 1% como fonte de carbono por *R. pickettii* LB_TupeA. (10 mL/ 30 °C/140 rpm) 60

Tabela 7. Síntese de PHA utilizando fontes de carbono tradicionais por *R. pickettii* (30 ^{o}C/120 rpm/48 h/100 mL) 61

Tabela 8. Resultado do acúmulo de PHA de *R. pickettii* por cultivo em duas etapas com derivados de lignina como única fonte de carbono 65

Tabela 9. Produção de PHA por *Aquitalea* sp. utilizando fontes de carbono não relacionadas entre si sob diferentes condições de cultivo em uma e duas etapas 67

Tabela 10. Conteúdo de P(3HB) (%) em *Bacillus paramycoides LB_RP2* por massa celular seca (MCS) em diferentes meios nutriente 71

Tabela 11. Anotação do genoma para enzimas relacionadas à biossíntese de PHA por *Ralstonia pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE 74

Tabela 12. Enzimas relacionadas a biossíntese de PHA pertencentes ao genoma anotado de *B. paramycoides* LB_RP2 80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANIb	Identidade de Nucleotídeo Média baseado no BLAST® (*do inglês Average Nucleotide Identity*)
ANIm	Identidade de Nucleotídeo Média baseado no cálculo do MUMmer (*do inglês Average Nucleotide Identity*)
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CoA	Coenzima A
DCW	Divisão da Parede Celular (*do inglês Division Cell Wall*)
DO_{600}	Densidade óptica em 600 nm
ED	Via metabólica Entner-Doudoroff
EMP	Via metabólica Embden–Meyerhof–Parnas
EPI	Equipamento de Proteção Individual
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel (*do inglês Gel Permeation Chromatography*)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactosídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
MCL	Comprimento de cadeia médio (*do inglês Medium Chain Length*)
MCS	Massa Celular Seca
MLSA	Análise de Sequência Multi-locus (*do inglês, Multi-locus Sequence Analysis*)
MLST	Digitação de Sequência Multi-locus (*do inglês, Multi-locus Sequence Typing*)
MMS	Meio Mínimo Salino
NCBI	National Center for Biotechnology Information
P(3HB)	Poli-3-hidroxibutirato
P(3HV)	Poli-3-hidroxivalerato
P(3HHx)	Poli-3-hidroxihexanoato
PBS	Tampão fosfato salino (*do inglês, Phosphate buffered saline*)
PDI	Índice de polidispersividade
PHA	Polihidroxialcanoato
PhaC:	Polihidroxialcanoato sintase
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes

SCL	Comprimento de cadeia curto (*do inglês Short Chain Length*)
S.O.C.	Meio comercial para crescimento de células transformantes
SSU-rRNA	Pequena Subunidade do ácido ribonucléico ribossomal (*do inglês Small Subunit ribosomal nucleic acid*)
TCS	Busca de Correlação baseado no índice TETRA (*do Inglês: Tetra Correlation Search*)
TMS	Tetrametilsilano
TSB	Caldo Triptona Soja (*do Inglês: Trypticase Soy Broth*)
UHMW	Peso molecular ultra-alto (*do Inglês Ultra-High Molecular Weight*)
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil β-D-Galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. OBJETIVO GERAL 16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
2. REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1. Plásticos: Importância, desafios e alternativas propostas 17
2.2. Polihidroxialcanoatos (PHA): Definição, principais fontes e aplicações 19
2.2.1. Classificação e propriedades mecânicas dos PHAs 22
2.2.2. Principais microrganismos sintetizadores de PHAs 24
2.2.2.1. Gênero *Cupriavidus* spp. 24
2.2.2.2. Gênero *Pseudomonas* spp. 25
2.2.2.3. Gênero *Bacillus* spp. 26
2.2.2.4. Gênero *Aquitalea* spp. 29
2.2.3. Fontes de carbono utilizadas na síntese de PHAs 29
2.2.3.1. Fontes de carbono tradicionais 29
2.2.3.2. Resíduos industriais 31
2.2.4. Proteínas relacionadas a síntese de PHA e suas vias metabólicas 33
2.2.5. Bactérias produtoras de PHA na Região Amazônica: Perspectiva 36
3. MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1. Diagrama metodológico 37
3.2. Químicos padrões 37
3.3. Obtenção dos isolados bacterianos 38
3.3.1. Bactérias da Reserva do Tupé – AM – BR 38
3.3.2. Bactérias isoladas de projetos anteriores 39
3.4. Testes de confirmação da síntese de PHA 39
3.5. Caracterização morfológica dos isolados bacterianos 40
3.6. Síntese de PHA e condições de cultivo 40
3.6.1. Isolado LB_TupeA 40
3.6.1.1. Otimização do tempo de cultura 40
3.6.1.2. Produção de PHA em diferentes fontes de carbono 41
3.6.2. Isolado LB_TupeE 41

3.6.3. Isolado LB_RP2 (Projeto Araçá) 42
3.7. Extração dos polímeros e procedimento analítico 42
3.8. PCR – Polihidroxialcanoato sintase Classe I e II 43
3.9. Sequenciamento da região 16SrRNA e do genoma dos isolados 45
3.10. Identificação da cepa LB_RP2 por meio de análise genômica 46
3.11. Análise filogenética – PhaC 47
3.12. Análise estatística 48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
4.1. Seleção das bactérias e confirmação da síntese de PHA 49
4.2. Identificação taxonômica das bactérias 51
4.2.1. Identificação por meio da determinação da sequência do RNA ribossomal 16S (SSU-16S rRNA) 51
4.2.2. Análise da sequência genômica dos isolados selecionados 53
4.2.2.1. Cepa Tupe A 53
4.2.2.2. Cepa Tupe E 54
4.2.2.3. Cepa RP2 54
4.3. Síntese, identificação e quantificação de PHA 56
4.3.1. Técnicas de análise dos PHAs: Interpretação dos resultados 56
4.3.2. Perfil de crescimento TupeA e TupeE 58
4.3.3. *Ralstonia pickettii* LB_TupeA 59
4.3.4. *Aquitalea* sp. LB_TupeE 66
4.3.5. Composição dos polímeros extraídos – ^{1}H-RMN 68
4.3.6. *Bacillus paramycoides* LB_RP2 69
4.3.6.1. Perfil de crescimento em meio nutriente 69
4.3.6.2. Síntese de PHA 70
4.4. Análise genômica: Vias metabólicas canônicas para a síntese de PHA 72
4.4.1. *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE 72
4.4.2. *B. paramycoides* LB_RP2 78
4.5. Polihidroxialcanoato sintases: PCR e categorização 81
5. CONCLUSÃO 85
REFERÊNCIAS 86
ANEXOS 107

1. INTRODUÇÃO

Diversos setores foram impactados positivamente com a invenção dos plásticos. Desde a fabricação de embalagens, que permitem a conservação e aumento de tempo de prateleira dos alimentos, até a aplicação de polímeros avançados em uma ampla gama de especialidades médicas, são alguns exemplos dos inúmeros benefícios atrelados a essa invenção. Porém, o contínuo aumento da fabricação e descarte desse material tem levado a reflexão constante da importância de se lidar com esses resíduos gerados. A substituição por polímeros biodegradáveis pode ser cotada como a alternativa mais promissora para substituir os plásticos derivados de combustíveis fósseis, sendo a adequação dos custos de produção um dos seus principais desafios. Os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres produzidos biologicamente a partir de fontes de carbono renováveis (OBRUCA *et al.* 2021) que são conhecidos pela sua alta degradabilidade. Diversos estudos existentes investigando estes biopoliésteres apresentam diferentes abordagens. Entre estas destacam-se o isolamento de microrganismos acumuladores de PHA de ambientes naturais (HIGUCHI-TAKEUCHI *et al.*, 2016; NG e SUDESH, 2016); a elucidação das vias metabólicas envolvidas na síntese de PHA utilizando diferentes fontes de carbono (FUJITA *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2009); construção de vias por meio de engenharia metabólica para a síntese de polihidroxialcanoatos compostos por diferentes copolímeros (STEINBÜCHEL e LÜTKE-EVERSLOH, 2003); assim como, das principais enzimas que estão atreladas a síntese e degradação destes polímeros (CHEK *et al.*, 2017; NUMATA *et al.*, 2004; USHIMARU *et al.*, 2014). Todavia, apesar dos desafios existentes e da extensa série de estudos envolvendo estes polímeros, as pesquisas envolvendo estes biopoliésteres ainda são consideradas promissoras (MOŻEJKO-CIESIELSKA e KIEWISZ, 2016; WANG *et al.*, 2014), principalmente pela variedade de substratos que podem ser aproveitados na síntese destes polímeros e a versatilidade de suas propriedades mecânicas.

Uma grande variedade de microrganismos que sintetizam PHA vem sendo isolados, estudados e geneticamente modificados no intuito de se obter avanços nessa tecnologia. Ambientes naturais com baixa pressão antropogênica são ambientes considerados ideais para o isolamento de bactérias potencialmente não-patogênicas para aplicação nestes fins. A região Amazônica possui uma vasta biodiversidade conhecida mundialmente, sendo composta de diversos ecossistemas (ROCHA e KAEFER 2019). Logo, a prospecção dos microrganismos responsáveis pela degradação de compostos recalcitrantes, como resíduos agro-industriais, por exemplo, e o emprego destes microrganismos na produção de biopolímeros necessita de maior exploração na região Amazônica.

1.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo propõe o isolamento, identificação e análise genômica de bactérias provenientes de águas superficiais de tributários do rio Amazonas, capazes de sintetizar PHA utilizando fontes de carbono convencionais, variantes de lignina e seus subprodutos como fontes de carbono.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e identificar bactérias que sintetizem polihidroxialcanoatos a partir de fontes convencionais e não convencionais de carbono;
- Aprimorar as condições de cultivo de forma se obter melhor rendimento na obtenção deste bioproduto;
- Elucidar a estrutura molecular dos polímeros sintetizados a partir de diferentes substratos como fontes de carbono;
- Identificar genes associados as vias metabólicas de síntese de PHA nos genomas anotados dos isolados selecionados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Plásticos: Importância, desafios e alternativas propostas

Logo após o início da Revolução Industrial, na metade do século XVIII e início do XIX, os plásticos foram sintetizados com o objetivo de prover ou substituir materiais usados em diferentes aplicações. Alguns polímeros foram desenvolvidos especificamente para substituir o marfim que era bastante apreciado por sua plasticidade, especialmente o obtido a partir das presas de elefantes devido a suas características consideradas singulares (CHAIKLIN, 2010). O polímero obtido (nitrato de celulose) chamado de "celulóide", que foi de grande utilidade para a indústria cinematográfica, juntamente com a baquelite, polianilina e o poliestireno, marcaram o início da história dos plásticos industriais (RASMUSSEN, 2018; SEYMOUR e KAUFFMAN, 1992). A versatilidade destes materiais resultou na difusão do seu uso em todo o mundo. O setor da medicina foi um dos mais beneficiados, especialmente na produção de dispositivos descartáveis, como seringas, EPIs e sondas, por exemplo, que consiste em praticamente 85% do seu uso neste setor (NORTH e HALDEN, 2013) reduzindo, consideravelmente, o perigo de contaminação por meio de riscos biológicos. A indústria de alimentos também é um dos principais consumidores de plástico, pois estes aumentam o tempo de estocagem dos alimentos protegendo-os das contaminações ambientais, preservando suas características sensoriais, possibilitando assim o seu transporte por longas distâncias (KOLLER, 2014). Com isso, os plásticos foram incorporados à sociedade moderna pós-revolução industrial, logo, abolir o uso de plásticos não é algo simples de se propor.

Porém, a demora em se compreender a complexidade deste material tem levado ao seu mal aproveitamento, assim como, nas tomadas de ações para o descarte ou reaproveitamento adequados destes polímeros (LOBO e BONILLA 2003). A gestão inadequada da disposição destes resíduos (Figura 1) tem resultado em impactos de curto e longo prazo, como o seu acúmulo contínuo nos sedimentos costeiros, giros oceânicos e no fundo dos oceanos, até a sua incorporação na cadeia alimentar (HOHN *et al.*, 2020). Neste último estudo citado, estima-se que as emissões de plástico irão atingir o seu ápice em 2029 e prevê que seu resíduo irá se acumular na superfície oceânica até 2052. Além da problemática envolvida na gestão dos resíduos plásticos, fatores como a finitude da matéria-prima para a síntese deste material e a emissão de gases de efeito estufa (GEE) ao longo de todo o processo da síntese ao descarte, é motivo de preocupação. A substituição das matérias primas provenientes de combustíveis fósseis por biomassa é uma alternativa que pode futuramente auxiliar na redução das emissões destes GEE (ZHENG e SUH, 2019). Todos os esforços voltados para ações conjuntas de remediação e prevenção têm sido aprimorados nas últimas décadas. Entre estes, a remoção

mecânica dos resíduos acumulados nas zonas costeiras tem sido empregada continuamente, porém, além das dificuldades na logística dessas operações, o acúmulo de uma parte destes resíduos no fundo dos oceanos e a fragmentação destes pela ação do intemperismo, sugerem que a melhor alternativa seja evitar que estes plásticos entrem no oceano (JAMBECK *et al.* 2015).

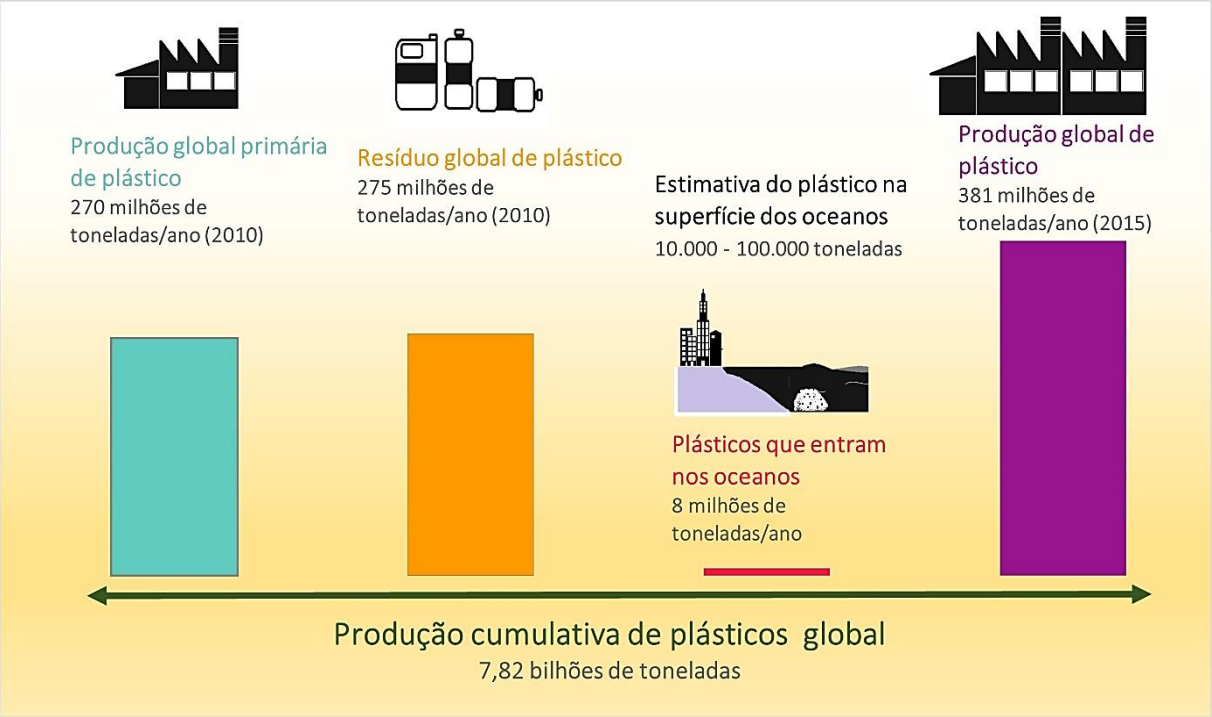


Figura 1. Produção de plásticos global e resíduos gerados. Imagem adaptada de RITCHIE e ROSER (2018) a partir de dados obtidos de JAMBECK *et al.*, (2015) e ERIKSEN *et al.*, (2014) - "Plastic Pollution". Publicado em: OurWorldInData.org. Obtido de: 'https://ourworldindata.org/plastic-pollution'.

Nas zonas urbanas, entre as ações tomadas para lidar com os resíduos plásticos destacam-se o uso de aterros sanitários, reciclagem e incineração. A maior parte destes rejeitos acabam enterrados em aterros sanitários, o que ocupa espaço e resulta na perda de boa parte do potencial energético destes materiais que, neste sistema, são decompostos muito lentamente. Outra parte é reciclada (dados mundiais: 18%, em 2015) (GEYER *et al.*, 2017), porém, este fator depende da ação conjunta entre governantes e residentes para a separação meticulosa do plástico dos demais resíduos, seguido da destinação correta deste. A incineração dos resíduos não-recicláveis é uma alternativa viável que permite a geração de energia e os resíduos sólidos restantes ocupam um espaço muito menor em aterros. Entretanto, a necessidade de se evitar a produção de poluentes orgânicos persistentes (POPs) presentes nos resíduos da incineração, assim como, de controlar a emissão de gases tóxicos encarecem todo o processo, que vem sendo

aprimorado ao longo dos anos juntamente com a reciclagem (OKUWAKI 2004; KAJIWARA *et al.*, 2021). Apesar de todos esses métodos serem de certa forma eficazes, a finitude do petróleo, principal matéria prima utilizada na síntese de alguns dos principais polímeros, é um fator que demanda a aceleração do processo de substituição do mesmo por outras possibilidades. Conforme as estatísticas publicadas pela British Petroleum (BRITISH PETROLEUM (BP), 2020), estima-se que restam, aproximadamente, 47 anos para que todo o petróleo das reservas existentes seja consumido.

A produção de bioplásticos como o bio-polietileno (Bio-PE), bio-polipropileno (Bio-PP) e bio-poli(etileno tereftalato) (Bio-PET) é uma alternativa para reduzir o uso e a dependência de petróleo (SIRACUSA e BLANCO, 2020). Porém, alguns destes biopolímeros não são biodegradáveis, colocando em evidência novamente a problemática inicialmente citada. Existem também bioplásticos que são biodegradáveis como a policaprolactona (PCL) e o poli-(succinato de butileno) (PBS), no entanto, a síntese destes é dependente de petróleo (RUDIN e CHOI, 2013). Polioxoésteres como os polihidroxialcanoatos (PHA) tem recebido maior destaque devido a seu potencial em substituir os plásticos derivados de petróleo e alta biodegradabilidade não limitada apenas as usinas de compostagem, como é o caso do ácido polilático (PLA) (BUGNICOURT *et al.*, 2014; DOI, 2002; MOŻEJKO-CIESIELSKA e KIEWISZ, 2016).

2.2. Polihidroxialcanoatos (PHA): Definição, principais fontes e aplicações

Polihidroxialcanoatos são poliésteres que consistem em unidades monoméricas de hidroxiácidos (HA) que são conectadas por uma ligação éster (Figura 2) (MOŻEJKO-CIESIELSKA e KIEWISZ, 2016). De acordo com NODA *et al.* (1999), PHAs como o poli(hidroxibutirato), P(3HB), produzidos por microrganismos são polímeros estereorregulares isotáticos semicristalinos com configuração 100% R, o que influencia na sua degradabilidade. São sintetizados e acumulados por uma vasta gama de microrganismos em forma de grânulos, funcionando como moléculas que estocam energia e fonte de carbono intracelular (HIGUCHI-TAKEUCHI *et al.*, 2016). Outra função que a presença destes grânulos acumulados no citoplasma dos microrganismos desempenha é a melhora na resistência destes ao stress e sua adaptação a diferentes condições ambientais não ideais (OBRUCA *et al.*, 2018).

Geralmente, a síntese e o acúmulo deste polímero ocorrem quando o organismo é submetido a condições de cultivo sob desequilíbrio nutricional, como o excesso de carbono associado ou não à limitação de nutrientes inorgânicos como nitrogênio, fósforo, enxofre ou

oxigênio (PRIETO *et al.*, 2016; SURENDRAN *et al.*, 2020). Além de sua função de armazenamento energético e manutenção da integridade celular, o P(3HB) (poli-(*R*)-3-hidroxibutirato), associado com polifosfato inorgânico, compõem a formação de um complexo de canais transmembrana, atuando na regulação das concentrações internas de íons e servindo como veículos para o transporte seletivo desses íons entre as membranas (REUSCH, 2020).

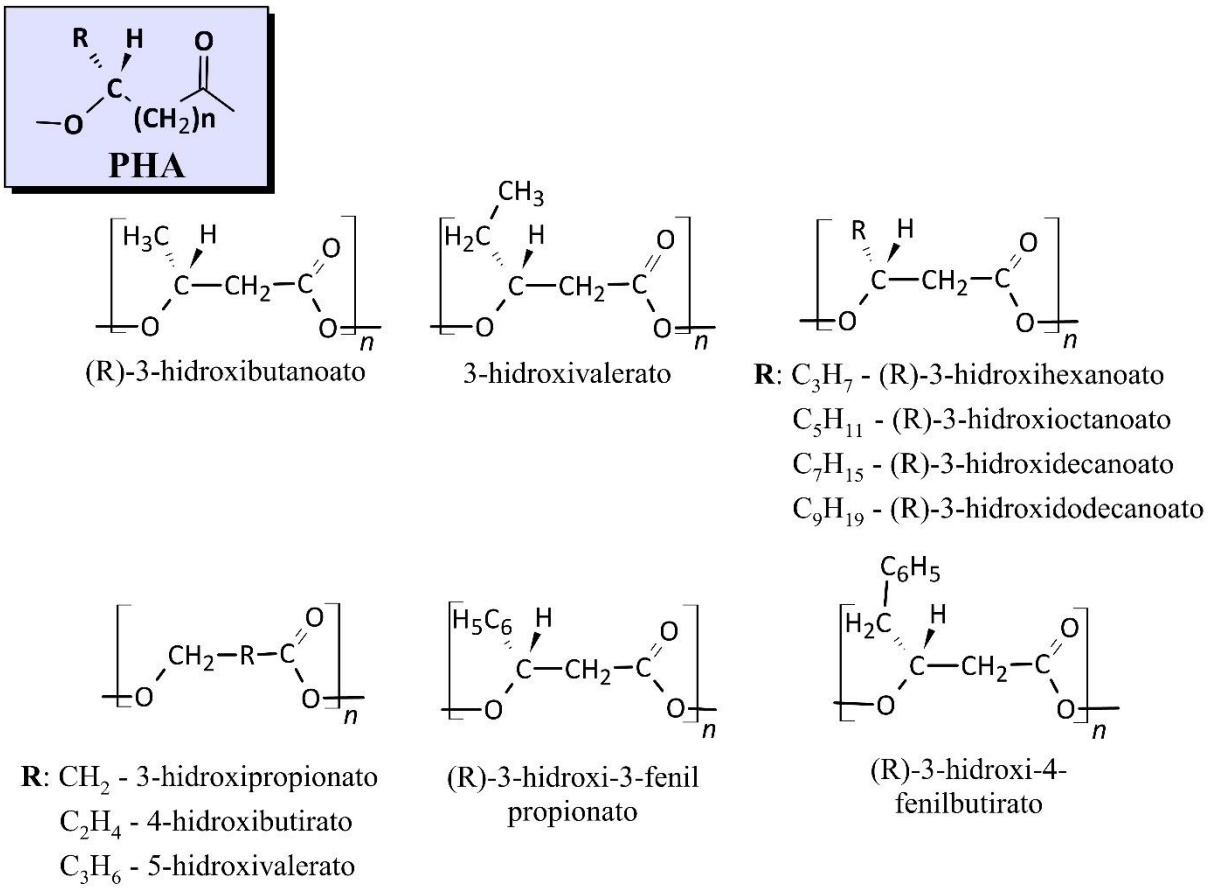


Figura 2. Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos (em cinza) e alguns dos principais monômeros elucidados.

Cerca de 150 tipos diferentes de PHA e seus blocos de construção foram elucidados, sendo que o homopolímero P(3HB) é o mais estudado (CHEN 2010b). Com isso, existe uma enorme variedade na composição e comprimento das cadeias laterais de homo e copolímeros. Outro fator importante acerca dos PHAs é o grau de polimerização do biopolímero que, não somente afeta o peso molecular do produto final, mas influencia significativamente em suas propriedades mecânicas. Além das cadeias laterais alifáticas, a incorporação de um grupo lateral fenil foi realizada para formar o copolímero de PHA poli (3HB-co-3-hidroxi-3-fenilpropionato)

[P(3HB-co-3H3PhP)] por meio da expressão de polihidroxialcanoato sintase do tipo II de Pseudomonas (PhaC1Ps) em *Ralstonia eutropha* PHB^{-4} (MIZUNO *et al.*, 2017). A diversificação dos monômeros já identificados nestes poliésteres bacterianos é considerável. Copoliésteres insaturados, cadeias laterais contendo grupos funcionais como bromo, hidroxila e metiramificados, além de ácidos mercaptoalcanóicos são exemplos de poliésteres já produzidos por processos de biossíntese *in vivo* e *in vitro* (HAZER e STEINBÜCHEL 2007). Todos esses fatores somados torna o PHA uma família de polímeros com uma série de aplicações potenciais (DOI 1990).

Por serem biocompatíveis, alguns produtos de PHA vêm sendo comercializados com fins em aplicações médicas, como: fibras para suturas, malhas de monofilamento absorvíveis, filmes para uso pós-cirúrgicos, como os fabricados pela Tepha® (Massachusetts – EUA). Alternativas promissoras para substituir as embalagens descartáveis, que representam cerca de 45% de toda a produção de resina polimérica (GEYER *et al.*, 2017), têm sido propostas por companhias como a Kaneka (Hyogo – Japão) e a Biocycle® (São Paulo- Brasil). Utensílios como canudos, sacolas de compra, talheres, embalagens de alimentos e copos têm sido produzidos a partir de PHAs. Uma companhia que tem tido destaque na síntese de PHA é a Yield10 Bioscience (antiga Metabolix – EUA, criada em 2005) que comercializa bioplásticos biodegradáveis baseados em PHA para diversas aplicações. Outro PHA bastante citado e comercializado é o Nodax™ (Danimer Scientific-EUA) que é um copolímero de P(3HB-co-3HHx) produzido a partir de óleo de canola. Destaca-se também o polímero Mirel™ que possui aplicações em moldagem por injeção, filme fundido e folha, revestimento por extrusão, termoformação e filme soprado, que foi utilizado, por exemplo, para fabricar cartões de presentes que se decompõem em 40 dias em uma composteira (CHEN 2010a; DIGREGORIO, 2009; KOLLER e MUKHERJEE 2020).

A utilidade dos polihidroxialcanoatos se expande além do uso como plásticos. Alguns estudos vêm evidenciando a aplicação de PHAs na obtenção de ácido crotônico [$CH_3(CH)_2COOH$], um precursor de rotas alternativas para a síntese de produtos químicos finos e industriais de alto valor (MULLEN *et al.*, 2014). Oligômeros de PHA mostraram-se eficazes para compor sistemas poliméricos de liberação controlada de pesticidas com resistência potencialmente maior (KWIECIEŃ *et al.*, 2015). As próprias unidades monoméricas dos PHAs, os hidroxiácidos (HA), possuem uma ampla gama de aplicações em diferentes campos da indústria de cosméticos, de processamento de alimentos e farmacêutica (BHALLA *et al.*, 2011).

2.2.1. Classificação e propriedades mecânicas dos PHAs

Os PHAs apresentam múltiplas variações estruturais, o que lhe confere diferentes propriedades físicas, possibilitando o seu uso em diversos campos de aplicação (KOLLER, 2014). Estes são classificados em três classes, conforme o número de carbonos da cadeia lateral, sendo estas cadeias de curto, médio e longo comprimento (scl, mcl e lcl, respectivamente, *do inglês short, medium and large chain length*). Os scl-PHAs possuem entre 3 e 5 átomos de carbono, mcl-PHAs possuem entre 6 e 14 átomos de carbono e lcl-PHAs possuem mais de 14 átomos compondo a unidade monomérica destes biopolímeros (KUNASUNDARI e SUDESH, 2011; RAZA *et al.*, 2018).

Alguns PHAs como P(3HB) possuem propriedades (Tabela 1) em comum com outros polímeros derivados de petróleo como o polipropileno (PP), tais como alta temperatura de fusão (~175 °C) e resistência à tração (30-35 MPa). Porém, propriedades como tensão de fratura (tração) diferenciam significativamente sendo aproximadamente 5-60% e 400% para P(3HB) e PP, respectivamente. Essa baixa capacidade de alongamento até a quebra também foi visualizada em copolímeros como poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) [P(3HB)-co-P(3HV)] (15%), sendo que a rigidez de ambos os polímeros é atribuída a fatores como a cristalização secundária da fase amorfa a temperatura ambiente, temperatura de transição vítrea próxima a temperatura ambiente e baixa densidade de nucleação. (BUGNICOURT *et al.*, 2014; IWATA, 2005; TSUGE, 2016). De forma a reduzir a rigidez e conferir maior resistência ao polímero, propõe-se como solução a copolimerização de P(3HB) com outros monômeros. Em comparação com o homopolímero P(3HB), copolímeros como o P(3HB-co-3HV) com diferentes percentagens de HV possuem um ponto de fusão menor (142-153 °C) e, quando submetidos a aquecimento, mostram melhor manutenção do peso molecular com redução no grau de cristalinidade (CHEN *et al.*, 2013; OWEN *et al.*, 1992).

O tamanho da cadeia lateral influencia diretamente nas propriedades mecânicas dos PHAs. Por exemplo, o poli(3-hidroxibutirato), formado por uma única unidade monomérica (homopolímero), tem como principal característica ser um polímero forte, porém quebradiço (CHUAH *et al.*, 2013). Conforme o número de comonômeros dos copolímeros aumenta, com a adição de 3-hidroxivalerato por exemplo, propriedades como a temperatura de fusão (Tm) e temperatura de transição vítrea (Tg) diminuem devido a espessura laminar reduzida, aumentando assim o volume livre do polímero (KIMURA *et al.*, 2002; MIZUNO *et al.*, 2017).

Quanto a razão dos monômeros em copolímeros, estes são divididos em copolímeros em bloco ou randômicos. Este controle na incorporação dos monômeros, apesar de difícil, tem sido

alcançado com o acréscimo intercalado da fonte de carbono em razões pré-definidas, sendo precedida da deleção de genes relacionados a via de degradação de ácidos graxos (β-oxidação). Logo, tem sido constatado que materiais que possuem razões estáveis dos seus monômeros apresentam propriedades estáveis (CHEN e JIANG 2017; TRIPATHI *et al.*, 2012; TRIPATHI *et al.*, 2013). TRIPATHI *et al.* (2013), utilizou *Pseudomonas putida* KTQQ20 transformada com o cluster de genes phaPCJA de *A. caviae* cultivada com hexanoato e ácido dodecanóico adicionados em sequência para produzir copolímeros em bloco composto de P(3HHx)-b-P(15.86mol%. 3HD-co-35.25 mol% 3HDD). Ao comparar os homopolímeros P3HHX e P3HDD (WANG *et al.*, 2011) que são, respectivamente, amorfos e cristalinos, verificou-se que cada bloco do copolímero obtido capturou as propriedades dos polímeros individuais, com aumento na força de tensão, módulo de Young e alongamento até a quebra (CHEN e JIANG 2017). Esta diferença na distribuição dos copolímeros nas propriedades físicas do material fica evidente no estudo de TRIPATHI *et al.* (2012) que compara copolímeros de P(3HB)/P(3HHx) organizados de forma misturada, em blocos e randômica.

Tabela 1. Propriedades mecânicas de alguns dos principais PHAs produzidos e caracterizados em comparação com o polipropileno derivado de petróleo.

Polímero	**Temperatura de fusão (°C)**	**Resistência à tração (MPa)**	**Tensão de fratura (%)**
Polipropileno (PP)	176	38	400
P(3HB)	180	40	5-60
UHMW-P(3HB)	~	1320	35
P(3HB-co- 20 mol% 3HV)	145	20	50
P(4HB)	53	0.97-104	150-1000
P(3HB-co-2,4%-3HV-co-13,4%-3HHx)	114	8	481
P3HD	72.2	11.96	312.86
P3HDD	77.62	5.24	88.3
PHB/PHHx(PHHx 42 mol %) (Mistura)	173.8	4.32	10.14
PHB/PHHx(PHHx 42 mol %) (Blocos)	172.1	1.42	207.31
P(3HB-co-3HHx) (HHx 21 mol %) (Randômico)	55.4	1.84	75.29

WANG *et al.* (2011), LIU *et al.* (2011), TRIPATHI *et al.* (2012)

O peso molecular médio de PHAs sintetizados por bactérias estão na faixa de $0.1\text{-}2.0\times10^6$ $g.mol^{-1}$. Polímeros com peso molecular > 3.0×10^6 $g.mol^{-1}$ são nomeados P(3HB) de peso

molecular ultra-alto [UHMW-P(3HB), *do inglês Ultra-high Molecular Weight*] (TSUGE, 2016). UHMW-PHA foi sintetizado por KUSAKA *et al.* (1997) em recombinante *E. coli* abrigando os genes phbCAB da síntese de P(3HB) de *Alcaligenes eutrophus*. A síntese deste UHMW-PHA aprimorada por IWATA *et al.* (2004) sendo obtido um material com alta resistência a tração (1320 MPa) e alto módulo de Young (18.1 GPa), apresentando potencial para ser utilizado como fibra resistente, como, por exemplo, na aplicação de suturas.

A incorporação de unidades mcl-3HA em PHAs efetivamente reduz temperatura de fusão e a cristalinidade do polímero, fornecendo ductilidade, resistência e baixa capacidade de contração, resultando em um polímero com potencial de uso em diferentes aplicações (CORRE *et al.*, 2012). Alguns mcl-PHA são homopolímeros amorfos ou semicristalinos com alta capacidade de elongação até a quebra. CRUZ *et al.* (2016) obteve um copolímero formado de unidades monoméricas de mcl-PHA composto de 3-hidroxioctanoato (3HO) (48 ± 7.3 mol%), 3-hidroxidecanoato (3HD) (3HHx) (12 ± 1.1 mol%), 3-hidroxidodecanoato (3HDd) (31 ± 2.6 mol%), com pequenas quantidades de 3-hidroxihexanoato (<1 mol%). Este mcl-PHA obtido foi um polímero amorfo com baixa cristalinidade (6.0 ± 0.2%), baixo ponto de fusão (36.0 ± 1.2 °C) e baixa temperatura de transição vítrea (-16.0 ± 0.8 °C).

Em suma, a produção de polihidroxialcanoatos com composição diversificada se deve a escolha da cepa apropriada, associada as condições de cultivo e das fontes de carbono, o que regula as propriedades físicas e termais do biopoliéster obtido (HAZER e STEINBÜCHEL, 2007).

2.2.2. Principais microrganismos sintetizadores de PHAs

2.2.2.1. Gênero *Cupriavidus* spp.

PHAs têm sido encontrados em uma grande quantidade de arqueobactérias e eubactérias. Entre as bactérias sintetizadoras de PHA, nenhuma é tão mencionada e investigada quanto a Proteobacteria Gram negativa *Cupriavidus necator* (nomeada anteriormente como *Alcaligenes eutrophus* e *Ralstonia eutropha*) devido a sua capacidade de armazenar carbono orgânico na forma de grânulos de poli [R-(-)-3-hidroxibutirato] alcançando altas densidades celulares (~118-200 g de massa celular seca por litro, MCS/L) em condições litoautotróficas ou heterotróficas, acumulando entre 72-78% de PHA (homo e copolímeros) em termos de massa seca, dependendo do método de cultivo aplicado (CHANPRATEEP *et al.*, 2008; KAHAR *et al.*, 2004; POHLMANN *et al.*, 2006). Outras bactérias do gênero *Cupriavidus* spp. foram reportadas por sintetizarem PHAs. A cepa *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020 acumulou entre 25-73% MCS de P(3HB-co-4HB) quando cultivada em γ-butirolactona, 1,4-butanodiol e

1,6-hexanodiol (HUONG *et al.*, 2015; RAMACHANDRAN *et al.*, 2018). *Cupriavidus basilensis* C-8 mostrou a capacidade de acumular P(3HB) a partir da bioconversão direta de lignina kraft, produzindo 128 $mg.L^{-1}$ de PHA, porém, sua maior eficácia foi demonstrada na degradação desse tipo de lignina em 44.4% (SHI *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2017).

2.2.2.2. Gênero *Pseudomonas*

Bactérias do gênero Pseudomonas spp. têm sido bastante estudadas, principalmente por acumularem mcl-PHA, que são considerados PHAs com propriedades superiores, conforme anteriormente abordado. *Pseudomonas putida* é uma bactéria presente em diferentes nichos que apresenta alta robustez em condições extremas e possui alta capacidade de degradar xenobióticos recalcitrantes, além de não demandar nutrientes complexos para se desenvolver. Tanto scl-PHA como P(3HB) e P(3HV) quanto mcl-PHA contendo unidades de poli (3-hidroxihexanoato), poli(3-hidroxiheptanoato), poli(3-hidroxioctanoato) e poli(3-hidroxidecanoato), foram obtidos quando utilizadas fontes de carbono como glicose e octanoato de sódio, por exemplo (BORRERO-DE ACUÑA *et al.*, 2014; ELBAHLOUL e STEINBÜCHEL 2009; POBLETE-CASTRO *et al.*, 2012). Os genes envolvidos no metabolismo de PHA de *Pseudomonas aeruginosa* são homólogos aos genes de *P. putida*, acumulando PHA em octanoato e gluconato (HOFFMANN e REHM 2004). A produção simultânea de dois produtos de importância biotecnológica como PHA e biossurfactantes (ramnolipídios) foi conseguida para *P. aeruginosa* utilizando óleo de palma como fonte de carbono (em 10 $mL.L^{-1}$ de óleo: 31% m/m de PHA e 436 $mg.L^{-1}$ de ramnolipídios). *P. aeruginosa*, diferente de *P. putida*, secreta a enzima lipase que provoca a lise de triacilgliceróis em ácidos graxos, possibilitando assim o uso de óleos vegetais não hidrolisados na síntese de PHA (MARSUDI *et al.*, 2008).

No início das pesquisas, *Pseudomonas oleovorans* esteve entre os primeiros organismos investigados e o mais publicado, juntamente com *R. eutropha* quanto ao acúmulo de PHA. Foi verificado que esta espécie acumula mcl-PHA utilizando açúcares simples, n-alcanos, ácidos n-alcanóicos e *n*-álcoois, sendo identificados polímeros contendo unidades de (*R*)-3-hidroxioctanoato e (*R*)-3-hidroxihexanoato, sem o acúmulo do scl-PHA P(3HB) (ANDERSON e DAWES 1990). Um híbrido do gene que codifica a PHA sintase de *P. oleovorans*/*Zoogloea ramigera* foi selecionado para compor a sequência dos plasmídeos do DNA de transferência (T-DNA) de vetores binários usados para transformação de *Camelina sativa*, o que resultou no rendimento máximo de 15.2% m/m de P(3HB) em termos de massa de sementes maduras (MALIK *et al.*, 2015).

Pseudomonas fluorescens também esteve entre os primeiros organismos acumuladores de PHA investigados, mostrando produzir mcl-PHA a partir de ácidos graxos, porém com baixos rendimentos (2-10%) (HAYWOOD *et al.*, 1989). JIANG *et al.* (2008) que isolaram *P. fluorescens* do solo do Alasca – EUA, mostraram que essa cepa foi capaz de acumular 70 % de P(3HB) (32 $g.L^{-1}$ MCS) quando cultivada com licor de cana de açúcar em um biorreator de 5 litros. *P. fluorescens*, juntamente com *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes* e *P. cepacia*, além de serem espécies acumuladoras de PHA, foram investigadas quanto a especificidade de substrato de suas lipases extracelulares e de suas polihidroxialcanoato depolimerases (enzima degradadora de PHA) purificadas (JAEGER *et al.*, 1995). Com isso, verificou-se que as PHA-depolimerases fazem distinção entre diferentes polímeros como scl-PHA e mcl-PHA e, com relação a especificidade da P(3HO) depolimerase de *P. fluorescens*, verificou-se esta ser capaz de hidrolisar copolímeros de scl-co-mcl PHA, porém, homopolímeros de scl-PHA não foram hidrolisados por esta classe de depolimerases.

Ainda em relação a PHA-depolimerases, *Pseudomonas pickettii* (*Burkholderia pickettii*), posteriormente classificada como pertencente ao gênero Ralstonia (YABUUCHI *et al.*, 1995), tem sido investigada quanto à eficácia desta enzima ao ser excretada extracelularmente em degradar copolímeros de scl-PHA como P(3HB-3HV) (HIRAISHI *et al.*, 2006; NUMATA *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 1993; YAMASHITA *et al.*, 2003). Poucos estudos têm mostrado o potencial desta espécie em acumular poliésteres, como o de Bonatto *et al.* (2004) onde a cepa de *Ralstonia pickettii* 61A6 acumulou P(3HB) utilizando sacarose e melado de cana como fonte de carbono. Portanto, os gêneros *Ralstonia* e *Pseudomonas*, são considerados predominantes dentro do grupo das bactérias gram-negativas (BONATTO *et al.*, 2004; GOMEZ *et al.*, 1996), entre as bactérias isoladas de solos sintetizadoras de PHA. Ressalta-se também, a habilidade destas em consumirem diferentes fontes de carbono, que variam entre açúcares simples até compostos recalcitrantes tóxicos.

2.2.2.3. Gênero *Bacillus* spp.

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* estão entre os microrganismos mais antigos já utilizados em processos de fermentação. Com o avanço da bioquímica e das pesquisas em análises genômicas, o conhecimento dos produtos de interesse biotecnológico fornecidos por estas espécies, assim como sua biossegurança, tem aumentado consideravelmente, possibilitando a melhor exploração destes organismos para aplicação em diferentes finalidades. Um exemplo são os fatores como a capacidade de secretar diversas proteínas, como proteases e amilases, por exemplo, associada as altas taxas de crescimento, sendo atrativos que colocam

o *Bacillus* spp. como o gênero com mais aplicação industrial atualmente (SCHALLMEY *et al.*, 2004). Com relação a síntese de PHAs, muitas espécies deste gênero têm sido reportadas por acumularem este polímero com altos rendimentos (Tabela 2), começando pelo *Bacillus megaterium*, que foi a primeira bactéria descoberta por produzir estes poliésteres pelo pesquisador Maurice Lemoigne em 1925. Porém, entre as indústrias produtoras de PHA, apenas a PHB Industrial S.A. (Brasil) produz P(3HB) a partir de *Bacillus* sp. com rendimento celular >90 $g.L^{-1}$ acumulando >90% de PHA (m/m) (CHEE *et al.*, 2010; MOŻEJKO-CIESIELSKA *et al.*, 2016).

Em comparação com outros organismos produtores de PHA, as espécies de *Bacillus* spp. possuem algumas vantagens como: desenvolvimento em condições extremas, crescimento celular em substratos de baixo custo com alta habilidade de produzir estes biopoliésteres e demanda de menos etapas no processo de extração do polímero produzido. Homo e heteropolímeros de PHA têm sido produzidos em espécies deste gênero que adotam mecanismos associados ou não ao crescimento. Síntese de PHA não associada ao crescimento depende do desequilíbrio de nutrientes, como a ausência ou limitação de minerais, oxigênio e excesso de fonte de carbono. A síntese de PHA associada ao crescimento demanda o fornecimento de nutrientes de forma equilibrada (MOHAPATRA *et al.*, 2017).

Bacillus subtilis é bastante aplicado na indústria biotecnológica com a produção de proteínas recombinantes, enzimas, aminoácidos, alimentos e bebidas, principalmente por se tratar de um organismo reconhecido como seguro, ou seja, que não produz toxinas que possam ser nocivas aos seres humanos. Tanto esse fator quanto a ausência de lipossacarídeos na membrana celular, característico de bactérias gram-positivas, faz com que esse organismo seja aproveitado como biofábrica de PHAs. ANJALI *et al.* (2014) verificou que *B. subtilis* ANM1 acumula PHA em meio Luria-Bertani (LB), suplementado com diferentes fontes de carbono, onde os maiores rendimentos foram obtidos quando sacarose (1.58 $g.L^{-1}$) e melado de cana (2.5 $g.L^{-1}$) foram adicionados ao meio.

Espécies pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*, têm sido reportadas por acumularem PHAs quando cultivadas em diferentes substratos. Polímeros de 3HB contendo 2-4 % mol de co-monômeros de 3HHx, assim como, terpolímeros de 3HHx e 3HO, e copolímeros de P(3HB-co-3HV-co-6HHx) foram produzidos por *B. cereus* ATCC 14579 usando, caproato, octanoato e ε-caprolactona como fonte de carbono, respectivamente (CABALLERO *et al.*, 1995, LABUZEK e RADECKA 2001, VALLAPIL *et al.*, 2007). Bactérias produtoras de PHA podem ser divididas em dois grupos conforme a condição de cultivo aplicada. O primeiro grupo requer

a limitação de algum nutriente para que o acúmulo de PHA seja eficiente. O segundo grupo acumula PHA durante o seu crescimento (LEE 1996). *B. cereus* e outras espécies de Bacillus, conforme mostrado por CHEN *et al.* (1991), acumulam PHA quando cultivadas em meio rico nutriente (4.8-21.7% m/m de PHB) e triplicam o acúmulo quando transferidas do meio rico para o meio salino livre de nitrogênio rico em carbono (11.0-44.6% m/m de PHB).

Tabela 2. PHAs sintetizados por diferentes espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* com alto acúmulo de polímero relativo a massa celular seca (>50%).

Espécie	Fonte de carbono	Rendimento % (m/m)	PHA ($g.L^{-1}$)	Polímero sintetizado	Referência
B. subtilis	Melado de cana	82.99	32.3	P(3HB)	GOMAA (2014)
B. thuringiensis	Amido	72.9	2.6	P(3HB)	GOWDA e SHIVAKUMAR (2014)
B. mycoides	Sacarose	69.4	2.49	P(3HB)	BORAH *et al.* (2002)
B. cereus	Glicose	80.6	-	P(3HB-co-3HV)	MASOOD *et al.* (2017)
Bacillus sp.	Glicerol	85.2	4.44	P(3HB-co-3HV)	MORYA *et al.* (2018)
B. megaterium	Xarope de fruta	52%	1.72	P(3HB)	OMAR *et al.* (2001)
B. licheniformis	Efluente de fábrica de óleo de palma	88.6	16.2	P(3HB-co-3HV-co-3HH)	SANGKHARAK e POONSUK (2013)

Muitas espécies nativas pertencente ao gênero *Bacillus* produzem PHA em diferentes substratos sendo muitos destes de baixo valor atrelado, como efluentes industriais, o que ajuda a reduzir o custo do polímero final obtido. Processos de otimização são necessários para cada espécie de forma a aumentar o rendimento de PHA. Entre as várias estratégias adotadas podem ser citadas: efeito da razão C:N (GOWDA e SHIVAKUMAR 2014); uso de biofermentadores para alcançar altas densidades celulares (MOZEJKO e CIESIELSKI 2013); mutação sequencial de espécies nativas (SANGKHARAK e POONSUK 2013) e tratamento químico dos substratos para reduzir seu efeito citotóxico (GOMAA *et al.*, 2014). Esses fatores somados fazem das bactérias do gênero *Bacillus*, juntamente com o *Pseudomonas*, organismos bastante apreciados por serem biofábricas de polímeros, metabólitos secundários, produção de energia e com aplicação em biorremediação (MOHAPATRA *et al.*, 2017).

2.2.2.4. Gênero *Aquitalea* spp.

Bactérias do gênero Aquitalea são bacilos pequenos gram negativos, anaeróbicos facultativos que vem sendo isolados de ambientes naturais como pântanos, lagos húmicos e águas doces (LAU *et al.*, 2006, LEE *et al.*, 2009, NG e SUDESH 2016). Por se tratar de uma espécie classificada taxonomicamente recentemente, apenas quatro espécies estão registradas no NCBI pertencentes a este gênero: *A. aquatilis, A. denitrificans, A. magnusonii* e *A. pelogenes*. Os demais organismos pertencentes ao gênero têm sido depositados como sem classificação (*Aquitalea* sp.). Estes organismos têm atraído a atenção pela sua capacidade de acumular PHA. NG e SUDESH (2016) mostrou que *Aquitalea* sp. sintetizou P(3HB) quando cultivada em meio mineral contendo açúcares como glicose, frutose e sacarose como fonte de carbono, além de produzir copolímeros de 3HV quando foram acrescidos no meio os sais proprionato, valerato e heptanoato de sódio. Copolímeros de 4HB foram incorporados ao polímero quando adicionados ao meio 4-hidroxibutirato de sódio e γ-butirolactona. Os estudos com essas espécies demandam maior aprofundamento, principalmente no uso de substratos mais econômicos na síntese de PHA.

2.2.3. Fontes de carbono utilizadas na síntese de PHAs

2.2.3.1. Fontes de carbono tradicionais

Fontes de carbono baseadas em alimentos (*food-based*) são escolhidos primariamente como substratos para a produção fermentativa de polihidroxialcanoatos, por serem fontes renováveis de matéria-prima e devido a facilidade que microrganismos acumuladores de PHA usarem esses substratos, principalmente os açúcares simples. Substratos simples como monossacarídeos, triacilgliceróis e hidrocarbonetos podem atravessar a membrana celular bacteriana, enquanto moléculas maiores poliméricas precisam sofrer uma transformação extracelular para, enfim, serem metabolizadas intracelularmente (JIANG *et al.*, 2016). Para a síntese de biopolímeros em escala industrial, a glicose é considerada o substrato mais barato e disponível (AGNEW e PFLEGER 2013).

Alta replicação celular bacteriana, assim como, altos rendimentos em termos de acúmulo de PHA tem sido observado em variados microrganismos que são cultivados em substratos simples. *E. coli* VG1 recombinante contendo o cluster de genes phbCAB acumulou 80.7% m/m de P(3HB) quando cultivada em glicose (YU *et al.*, 2003). *Alcaligenes eutrophus* H16 selvagem consegue utilizar apenas frutose como substrato, porém a mutante *A. eutrophus* Glu-9 mostrou-se capaz de acumular 58% de P(3HB) em meio contendo glicose (20 $g.L^{-1}$) cultivada em sistema de cultura em dois estágios (KIM *et al.*, 1995) Algumas bactérias do

gênero Pseudomonas spp. são capazes de sintetizar mcl-PHAs utilizando glicose e outros açúcares simples, porém com rendimentos inferiores (10-26% m/m MCS) (KATO *et al.*, 1996; JIANG *et al.*, 2016).

A inserção de monômeros com específicos grupos enquanto estes são sintetizados *in vivo* ocorre ao se adicionar ao meio de produção os precursores químicos relacionados, o que resulta na alteração da funcionalização química do PHA sintetizado, alterando por fim suas propriedades físicas (KOLLER e MUKHERJEE 2020). A incorporação de unidades 4-hidroxibutirato (4HB) ao copolímero é alcançada quando é acrescido ao meio 1,4-butanediol, ácido butírico ou ácido γ-hidroxibutírico (HAZER e STEINBÜCHEL 2007). Copolímeros contendo unidades 3HV podem ser obtidos, normalmente, quando ácidos carboxílicos de número de carbono ímpares como o ácido propanóico ou valérico (pentanóico) são fornecidos ao meio de cultivo (KOLLER *et al.*, 2005).

Óleos vegetais, semelhante aos açúcares, são considerados fontes de carbono baratas e renováveis, desejáveis para a síntese de PHA (CIESIELSKI *et al.*, 2015), com rendimento teórico reportado maior (0.65 $g.g^{-1}$) que a glicose (0.30-0.40 $g.g^{-1}$) (CHANPRATEEP 2010). Uma cepa recombinante de *Wautersia eutropha* possuindo o gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae* sintetizou o scl,mcl-PHA poli(3-hidroxibutirato-co-5 mol% 3-hidroxihexanoato) utilizando óleo de soja como fonte de carbono (AKIYAMA *et al.*, 2003). KAHAR *et al.* (2004) obteve altos rendimentos de P(3HB-co-3HHx) ao cultivar a cepa recombinante de *R. eutropha* PHB^{-4}/pJRDEE32d13 que abriga um gene de PHA sintase de *Aeromonas caviae* (phaCAc) em meio mineral acrescido de óleo de soja (20 $g.L^{-1}$) em um fermentador de 10 L. Foi também obtido uma produção de massa celular de 138 $g.L^{-1}$ e 74% (m/m) de conteúdo de PHA após 96 h de cultivo. Uma cepa mutante de *P. aeruginosa* foi relatada por acumular 50.27% (m/m) (0.98 $g.L^{-1}$) de PHA com óleo de soja a 2% (ABID *et al.*, 2016). Um ocorrido pouco comum foi o encontrado por SINGH e MALLICK (2008), onde a cepa isolada *P. aeruginosa* MTCC 7925 sintetizou um novo copolímero de PHA de cadeia curta-longa (scl-co-lcl-PHA) contendo scl 3HAs [ácido 3-hidroxibutírico (3HB) e ácido 3-hidroxivalérico (3HV)] e LCL 3HAs de 3 - ácido hidroxihexadecanóico (3HHD) e ácido 3-hidroxioctadecanóico (3HOD) quando cultivada em meio mineral acrescido de óleo de soja e outras fontes de carbono de baixo valor. Máximo acúmulo deste PHA (30-33% m/m) foi obtido quando o óleo de soja e óleo de palma foram usados como substrato.

O uso de açúcares e óleos vegetais são de uso prioritário como fontes alimentícias, portanto, é preferível evitar conflito de uso ao elencar estes como matéria prima para síntese de

biopolímeros. Apesar desse viés, um estudo feito por NONATO *et al.* (2001), que investigou a produção em larga escala de P(3HB) em uma usina de cana de açúcar, pontuou que a produção de PHA não afetaria os estoques de açúcar, não afetando também o seu preço. Contudo, maiores esforços da pesquisa têm sido voltados a exploração de materiais brutos de baixo custo com o objetivo de reduzir o preço dos biopolímeros sintetizados (SINGH e MALLICK 2009).

2.2.3.2. Resíduos industriais

O principal desafio da síntese de PHAs em larga escala é o preço do produto final que, estima-se, ser 5 a 10 vezes maior comparado aos polímeros de origem petroquímica. Uma das alternativas para reduzir esses custos de produção é o uso de fontes de carbono mais baratas para a síntese bacteriana desses biopolímeros (KOLLER 2014). Resíduos de diferentes setores industriais e agrícolas são cotados como uma fonte abundante de matéria prima para a produção de PHA, além de oferecer uma alternativa sustentável ao descarte inadequado destes resíduos, contribuindo com a redução do impacto ambiental (PAKALAPATI *et al.*, 2018).

Vários substratos de carbono de baixo custo, como melaço, ácido láurico, soro de leite, celulose, óleos vegetais e hidrolisados de amido são frequentemente testados quanto a sua eficiência como substratos para bactérias produzirem PHAs (SINGH e MALLICK 2009). TUFAIL e colaboradores (2017) obtiveram um rendimento maior com resíduo de óleo de fritura (2% m/m), comparado com demais óleos vegetais e com glicose, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* que acumulou cerca de 53.2% (23.7 $g.L^{-1}$) de PHA após 72 h de incubação. Outro resíduo da indústria de refinamento de óleo vegetal que foi aplicado na síntese de PHA foi o destilado desodorizante de azeite (OODD, *do inglês Olive oil deodorizer distillate*), rico em ácidos graxos livres. Neste estudo, a espécie *Pseudomonas resinovorans* acumulou em um biorreator cerca de 4.7 ± 0.3 $g.L^{-1}$ (36 ± 0.8% MCS) contendo meio mineral adicionado 20 $g.L^{-1}$ de OODD e o PHA produzido foi caracterizado como sendo um copolímero composto por 3-hidroxioctanoato (3HO) (48 ± 7,3 mol%), 3-hidroxidecanoato (3HD) (3HHx) (12 ± 1,1 mol%), 3-hidroxidodecanoato (3HDd) (31 ± 2,6 mol%), e 3-hidroxihexanoato (<1 mol%), possuindo propriedades de cola adesiva com baixo ponto de fusão (36.0 ± 1.2 °C) (CRUZ *et al.*, 2016).

As fontes de carbono mais utilizadas na produção de PHA estão restritas a pequenas moléculas e, em alguns casos, alguns ácidos orgânicos e álcoois são usados como precursores de copolímeros. Monossacarídeos e dissacarídeos podem ser aplicados diretamente no processo de fermentação para obtenção do PHA, em contrapartida, polissacarídeos necessitam sofrer um processo de hidrólise para serem fermentados (JIANG *et al.*, 2016). Os componentes da biomassa lignocelulósica (Celulose, hemicelulose e lignina) têm recebido atenção das

biorrefinarias com fins de aproveitamento dessa fonte abundante de carbono, mais especificamente, na bioprodução dos PHAs (CESÁRIO *et al.*, 2014). Todavia, boa parte dos estudos existentes estão voltados para a fermentação dos carboidratos poliméricos celulose e hemicelulose e, segundo Jiang e colaboradores (2016) a lignina não é aproveitada para este fim devido a sua natureza aromática complexa. Entretanto, estudos como de MOUSAVIOUN *et al.* (2012); NUMATA e MORISAKI (2015); TOMIZAWA *et al.* (2014) e WANG *et al.* (2018) têm mostrado ser possível o beneficiamento da lignina, tanto na forma de mistura de um substrato com um PHA (blend) para aperfeiçoamento das propriedades do polímero final, quanto na utilização desta como fonte de carbono para fermentação bacteriana e obtenção deste biopoliéster.

Os resíduos da indústria de processamento da cana-de-açúcar são bastante investigados quanto ao seu aproveitamento como biocombustíveis e na biossíntese de polímeros. Destaca-se o melado de cana, que é o subproduto da remoção da sacarose cristalina do licor de açúcar, por ser um substrato rico em sacarose e componentes adicionais como minerais e vitaminas do complexo B (KOLLER *et al.* 2012). Tanto o melado de cana quanto outros subprodutos relacionados a refinarias de açúcar (hidrolisado de bagaço e vinhaça de cana-de-açúcar) foram utilizados como fonte de carbono em um estudo publicado por DE PAULA *et al.* (2021). Neste, constatou-se um maior crescimento e acúmulo de PHA (5.88 ± 0.30 g.L^{-1}; 46.61 ± 0.28%, m/m MCS) quando *Burkholderia glumae* MA13 foi cultivada em meio mineral acrescido de melado de cana bruto (30 g.L^{-1}), sendo este polímero composto de 3HB-co-3HV (99.58/0.42%). PAN *et al.* (2012) utilizaram *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 para sintetizar 8.72 g.L^{-1} de P(3HB) 51.4% MCS a partir de hidrolisado hemicelulósico de bordô, uma matriz complexa que contêm xilose, ramnose, manose, glicose e outros derivados de açúcar menores e de lignina, em sistema de fermentação descontínua (fed-batch).

Entre os componentes da renovável biomassa lignocelulósica, a lignina é a segunda mais abundante, estando atrás somente da celulose, compreendendo cerca de 15-40% de sua composição. Este polímero amorfo é composto de três unidades fenilpropanóides aril-C3 diferentes: álcool guaiacil (unidade tipo G), álcool p-cumarílico (unidade tipo H) e álcool siringílico (unidade tipo S) (HAMMEL 1997, XU *et al.*, 2019). A lignina é um subproduto abundante da indústria de celulose e papel e oferece um potencial para ser uma matéria prima para químicos, materiais, combustíveis e fonte de carbono para microrganismos (SHI *et al.*, 2017). Para ser metabolizada por microrganismos, a lignina precisa ser degradada enzimaticamente. Na natureza, alguns fungos da podridão branca secretam enzimas que

degradam a lignina ainda unida a fibra vegetal, sendo estes, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (Lac). Algumas bactérias capazes de metabolizar lignina têm sido identificadas, como a *Cupriavidus basilensis* B-8 por exemplo, e estas utilizam vias metabólicas mais elaboradas que as dos fungos para degradar este composto considerado recalcitrante (SHI *et al.*, 2013). Com relação a *C. basilensis*, esta mostrou capacidade de degradar lignina (44.4% da lignina kraft a 2 $g.L^{-1}$ em 7 dias) e acumular P(3HB) (128 $mg.L^{-1}$ de PHA) utilizando a lignina bruta a uma concentração de 5 $g.L^{-1}$, sendo que se verificou que a atividade da enzima MnP foi Lac apresentaram o maior nível durante o processo (SHI *et al.*, 2013, SHI *et al.*, 2017). Outra bactéria capaz de converter lignina em PHA identificada foi a *Pandoraea* sp. que acumulou 24.7% (m/m) de P(3HB) em 6 $g.L^{-1}$ de lignina kraft (LIU *et al.*, 2019). A abundância deste composto, assim como, seu potencial para ser utilizado como matéria prima para a síntese de biopolímeros degradáveis, incentiva o desenvolvimento de estudos que visem isolar bactérias capazes de metabolizar lignina e melhorar o rendimento dos polímeros sintetizados.

2.2.4. Proteínas relacionadas a síntese de PHA e suas vias metabólicas

A composição química dos PHAs depende do substrato utilizado como fonte de carbono, da polihidroxialcanoato sintase que cada microrganismo expressa e das rotas metabólicas que são utilizadas para acumular estes polímeros. Entre as principais vias metabólicas (Figura 3) de síntese de PHA pode-se citar as vias glicolítica, β-oxidação e biossíntese de ácido graxo *de Novo* (NUMATA *et al.*, 2013; POHLMANN *et al.*, 2006; REHM *et al.*, 2001). A via glicolítica envolve a conversão de glicose em piruvato em condições aeróbicas (KUMARI 2018). A β-oxidação é a principal via quando ácidos graxos são usados como fonte de carbono, sendo que a biossíntese de ácido graxo *de novo* é a rota principal quando algumas fontes de carbono como gluconato, acetato ou etanol são metabolizadas para acetil coenzima A (acetil-CoA) (REHM, *et al.*, 2001). As bactérias do gênero *Pseudomonas* são as principais representantes dos produtores de mcl-PHA tanto a partir de fontes relacionadas, como ácidos graxos, quanto fontes não relacionadas entre si como glicose e glicerol. Um exemplo é a síntese de copolímeros de mcl-PHA por *P. oleovorans* quando cultivada em meio mineral acrescido de n-alcanos, n-alquenos e ácidos graxos de cadeia longa. A β-oxidação de unidades acil-CoA supre unidades monoméricas de substratos de carbono-par variando de C6 a C14 ou de substratos de carbono-ímpar variando de C7 a C13. Porém, unidades menores que C6 não são incorporados ao PHA formado, sendo convertidas em acetil-CoA e utilizadas para prover energia ou crescimento celular por meio da via do ciclo do ácido cítrico (YU 2007). Acetil-CoA é o composto intermediário chave que supre unidades 3-hidroxialcanoil-CoA de diferentes comprimentos que

será polimerizado em PHA pelas PHA sintases.

Muitas bactérias e algumas archaea utilizam a seguinte via de 3 etapas para sintetizar P(3HB): O operon que compõe os genes para a síntese de PHAs inclui uma b-cetotiolase (PhaA) que une duas unidades de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA (ANDERSON e DAWES, 1990), uma acetoacetil-coenzima A (CoA) redutase (phaB) e uma sintase (PhaC). PhaC está envolvida na atividade de polimerização de unidades (*R*)-3HA-CoA em P(3HA) com liberação de CoA, controlando o peso molecular e a composição monomérica do PHA, sendo assim, as enzimas chave para a síntese deste polímero (INSOMPHUN *et al.*, 2014). A enzima PhaC, em contraste com a alta especificidade química atribuída as enzimas, mostra uma versatilidade notável, sendo capaz de usar substratos artificiais como ácidos mercaptoalcanóicos, por exemplo, para realizar a mesma reação de polimerização levando a formação de politioésteres (DOI, 2002).

Poliéster sintases (PhaC) pertencem a família das transferases e são classificadas em quatro classes baseado na especificidade de seus substratos, assim como, na composição de sua subunidade, sendo que TAI *et al.* (2015) propôs a existência de uma nova classe de PhaC que está sendo investigada. PHA sintases de Classe I são compostas de uma subunidade de PhaC e, preferencialmente, utilizam como substrato unidades tio ésteres CoA contendo de 3 a 5 átomos de carbono, resultando na formação de scl-PHA. PhaCs de Classe II também são compostas de apenas uma subunidade de PhaC, porém possuem preferência por unidades 3-hidroxiacil-CoA com comprimento de cadeia médio (6-14 átomos de carbono), resultando na formação de mcl-PHAs. PhaCs de Classe III são constituídas de duas subunidades diferentes PhaC + PhaE, onde a unidade PhaC possui similaridades na sequência de aminoácidos com as PhaC de classe I e II e, a subunidade PhaE não possui similaridade com nenhuma das PHA sintases. PhaCs de Classe III possuem afinidade por unidades tio ésteres CoA contendo 3 a 5 átomos de carbono (scl-3HA-CoA), resultando na formação de scl-PHA. Semelhante as PhaCs de Classe III, as de classe IV também são compostas de duas subunidades, sendo que a PhaE é substituída por uma subunidade PhaR (PhaC + PhaR) e possui afinidade por $3HA_{SCL}$-CoA (REHM 2003). Logo, classificar as PHAs sintases contribui para o conhecimento de suas especificidades de substratos.

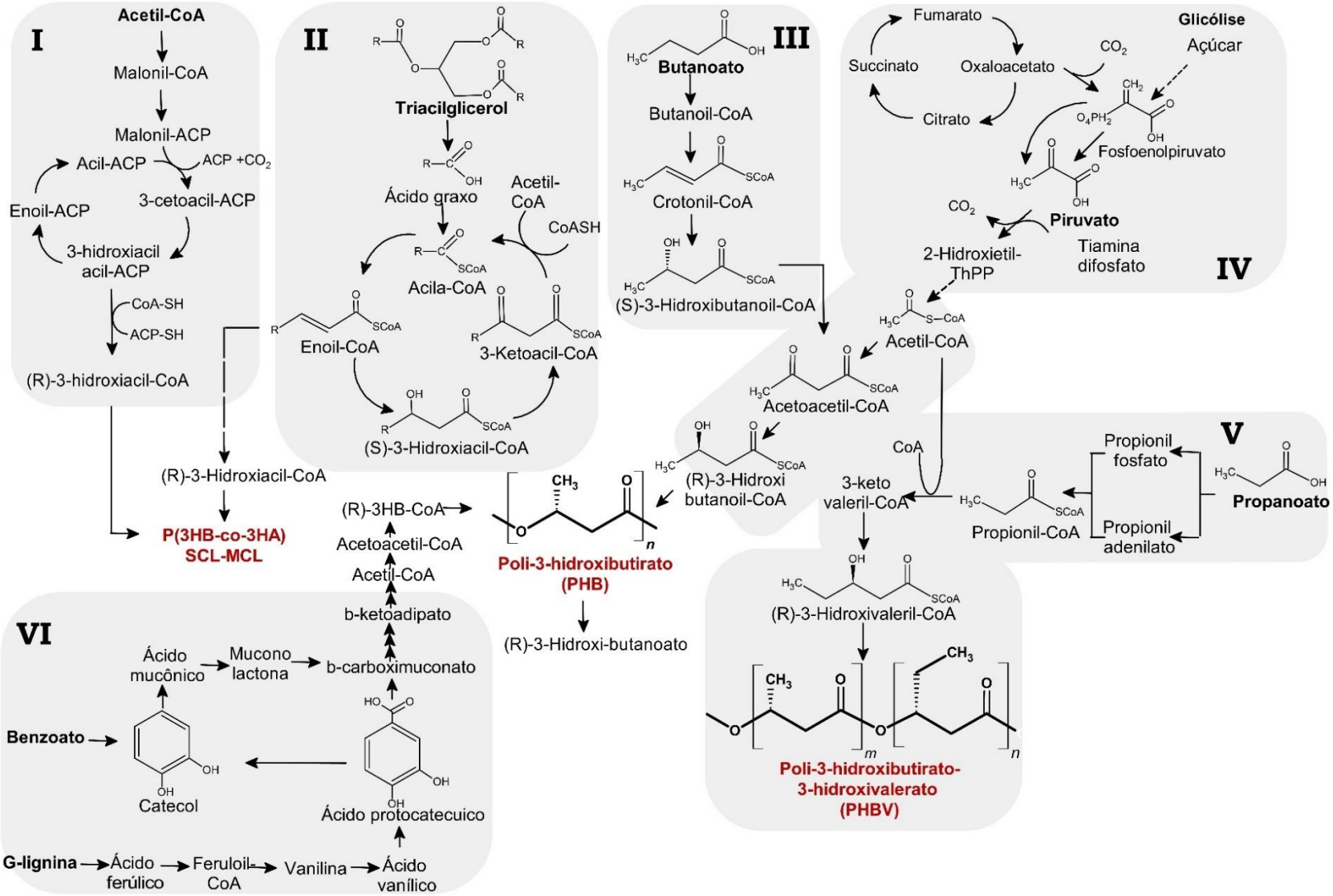


Figura 3. Principais vias metabólicas elucidadas envolvidas na síntese de PHA. (I) Via *De Novo* (SUDESH *et al.* 2000), (II) Via da β-oxidação, (III) Via do Crotonil (LU *et al.* 2009), (IV) Via do piruvato (BECKERS *et al.*, 2016), (V) Via do propionil-CoA (HAN *et al.*, 2013) e (VI) Via do ácido protocatecuico (TOMIZAWA *et al.* 2014).

2.2.5. Bactérias produtoras de PHA na Região Amazônica: Perspectiva

Nos diferentes ambientes que compõem a floresta Amazônica está contida uma rica biodiversidade que é considerada pouco conhecida em face da dimensão deste ecossistema. Tanto os microrganismos presentes nas águas e solos, quanto a microbiota associada a plantas abrigam uma vasta fonte de bioativos com potencial para aplicação comercial (PEREIRA *et al.*, 2017). Quanto as bactérias acumuladoras de PHA provenientes dessa região, alguns estudos buscando isolar estes microrganismos foram realizados. LOPES *et al.* (2009) isolou bactérias produtoras de PHA, utilizando xilose como fonte de carbono, de diferentes ambientes, incluindo a floresta Amazônica e, espécies bem conhecidas por sintetizarem este polímero como *B. cepacia, B. megaterium, e B. cereus* foram identificadas. *Lynisibacillus* é um gênero pouco mencionado na literatura quanto a síntese de PHA, sendo este isolado do rio Madeira – AM por FERREIRA *et al.* (2016), constatando-se que a cepa *Lynisibacillus* sp. UEA-20.171 acumulou PHA utilizando glicose como fonte de carbono. MOURÃO *et al.* 2020 investigou a otimização e síntese de P(3HB) da microalga Amazônica *Stigeoclonium* sp. cepa B23, ampliando ainda mais o conhecimento acerca deste grupo de microrganismos presentes na região.

Como foi explanado anteriormente, o beneficiamento da biomassa lignocelulósica para a síntese de biopolímeros, assim como de resíduos industriais pode ser alcançado utilizando microrganismos capazes de metabolizar esses substratos. As características naturais dos mananciais Amazônicos fornecem pistas de onde estes microrganismos podem ser isolados. A análise da composição da matéria orgânica de alguns dos principais tributários do rio Amazonas mostrou que os ácidos húmicos e fúlvicos dessas águas são caracterizados pela presença de fenóis derivados da lignina. Essa degradação da lignina de origem alóctone é marcante em rios de águas escuras, principalmente, o rio Negro que difere dos demais tributários com relação a sua composição elementar (Carbono Orgânico Dissolvido ~ 10.8 $mg.L^{-1}$ em comparação com o valor encontrado no rio Amazonas de 4.82±0.33 $mg.L^{-1}$) (ERTEL *et al.*, 1986). Este mesmo estudo mostrou um alto grau de biodegradação das substâncias húmicas do Rio Negro em distinção aos demais tributários, ocorrendo, primeiramente, nas camadas aeróbicas dos solos podzólicos da região do Rio Negro com posterior lixiviação destes fenóis derivados de lignina para o curso d'água. TADINI *et al.* (2018) mostrou que os ácidos húmicos presentes em solos podzólicos no município de Barcelos – AM são originados da degradação da lignina e derivados. Com isso, o isolamento destas bactérias nativas capazes de metabolizar lignina e, simultaneamente, sintetizar PHA merece extensiva exploração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Diagrama metodológico

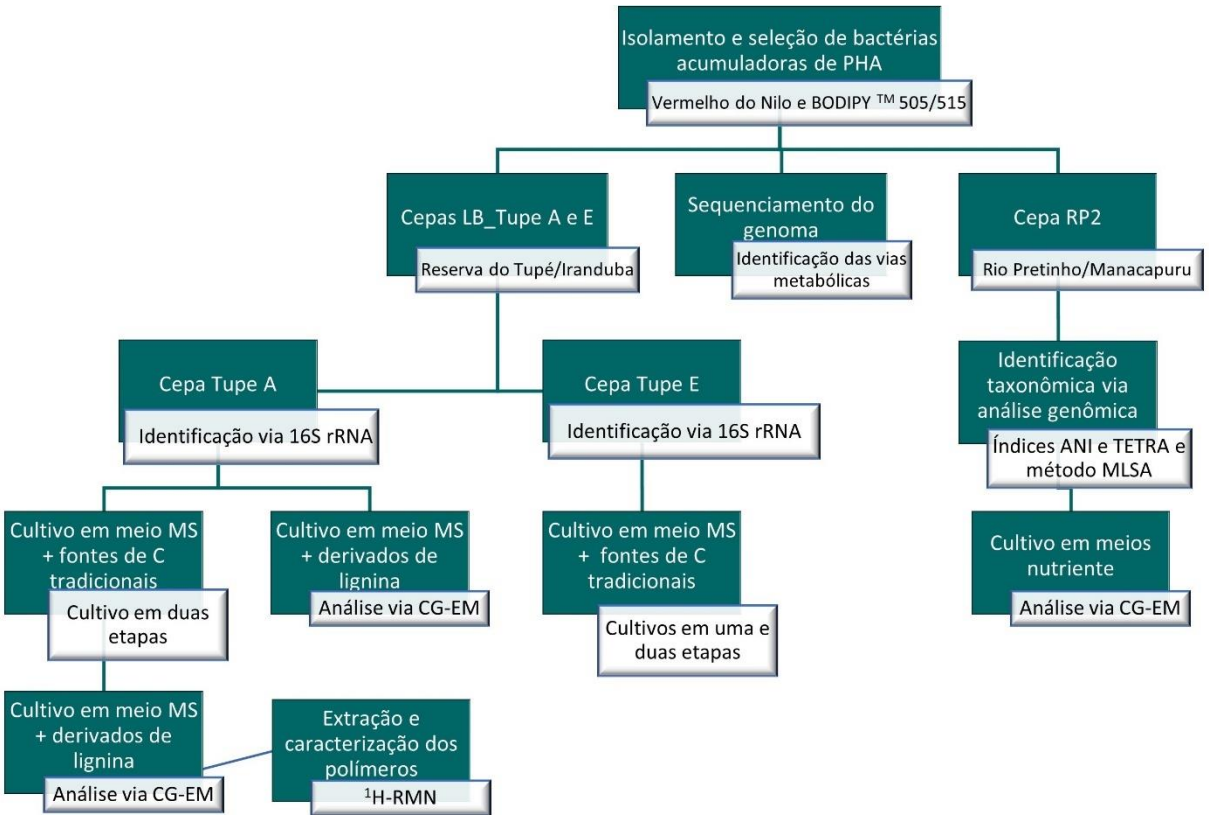


Figura 4. Sequência resumida das etapas executadas neste estudo

3.2. Químicos padrões

Os corantes utilizados para triagem das bactérias acumuladoras de polihidroxialcanoato foram: Vermelho do Nilo da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha) e BODIPY™ 505/515 da Invitrogen™ (Carlsbad, CA). As soluções para diluição das células bacterianas foram: cloreto de sódio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) 0.9% e PBS 1X com 0.011% éter octilfenílico de polioxietileno (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japão).

Extrato de levedura, caldo nutriente, extrato de carne bovina e digestão pancreática de caseína (grau de cultura médio) foram adquiridos da Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA). Os derivados de lignina foram adquiridos da Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. Clorofórmio e metanol P.A. ACS foram adquiridos da FUJIFILM Wako Chemicals (EUA). Clorofórmio deuterado (≥99.8% D, 0.5 m/m % folha de prata como estabilizador e 0.03 % (v/v) TMS) para análise em ^{1}H-NMR foi adquirido da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha).

Para análise genômica bacteriana o kit PureLink® Genomic DNA Mini foi adquirido da Invitrogen™ da Thermo. Os kits DNeasy® Blood & Tissue e QIAquick PCR Purification foram adquiridos da QIAGEN (Hilden, Alemanha) e o kit Bacterial 16S rDNA PCR foi adquirido da

Takara Bio (Japão). O kit de ensaio dsDNA BR para análise no fluorômetro Qubit™ 2.0 foi adquirido da Invitrogen™ da Thermo. Sais e fontes de carbono foram adquiridos da Wako Chemicals (Osaka, Japão).

3.3. Obtenção dos isolados bacterianos

3.3.1. Bactérias da Reserva do Tupé-AM-BR

Amostras de água superficial foram coletadas (Figura 5) no lago do Tupé localizado na Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé (lat -3.045740, long -60.253118), município de Iranduba, Amazonas, Brasil. Um total de 20 L de água foram submetidas a filtração em filtro de fluxo tangencial KrosFlo® Research Iii utilizando filtros de 0.22 µm e 100 kDa sequencialmente. A matéria orgânica dissolvida <0.22 µm/>100 kDa retida no coletor foi avolumada para 1 L utilizando a fração <100 kDa, ágar (18 $g.L^{-1}$) e vermelho do Nilo (0.5 $\mu g.mL^{-1}$) foram adicionados a água concentrada e, após esterilização em autoclave (121 °C/15 min), o meio foi distribuído em placas de Petri estéreis.

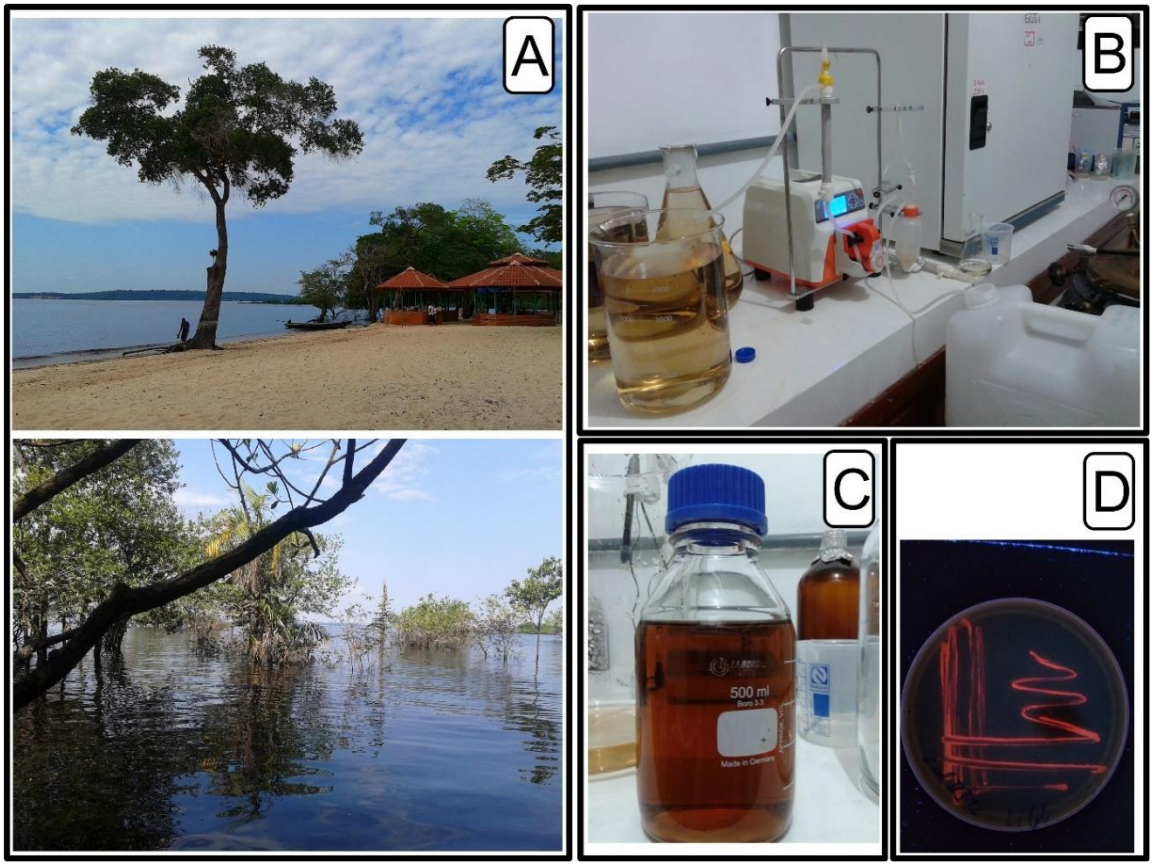


Figura 5. Processo de amostragem de bactérias selvagens com potencial para acumular PHA. A) Local de coleta: Água superficial na Reserva do Tupé; B) Filtração da amostra em filtro tangencial; C) Fração >100KDa e, D) Fluorescência da cepa selecionada submetida a radiação UV após ser cultivada em meio contendo vermelho do Nilo.

A mesma amostra de água foi coletada separadamente em um frasco esterilizado sendo aplicada a técnica de diluição seriada (10^{-1}, 10^{-2}) em tampão fosfato salino (PBS) 1X (Corning ®, Nova Iorque – EUA). Em seguida, foram distribuídas alíquotas (100 µL) da água bruta e das diluições por meio de espalhamento com alça de Drigalski. Após 7 dias de incubação em estufa a 30ºC, as placas foram expostas a luz ultravioleta λ 302 nm em um transiluminador (Kasvi) e as colônias fluorescentes foram selecionadas, cultivadas em meio LB e armazenadas em glicerol 15% a -80 °C.

3.3.2. Bactérias isoladas de projetos anteriores

Bactérias armazenadas no Laboratório de Biodegradação (UFAM) foram reativadas em 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) (30 °C/120 rpm) para serem submetidas a triagem pelo método do Vermelho do Nilo. A origem destas bactérias é descrita a seguir: Amostras de água superficial foram coletadas no início do período chuvoso (fevereiro) do rio Preto, um dos afluentes do rio Negro, localizado no Parque Estadual da Serra do Araçá (lat 0 ° 32'28,5 "N, long 62 ° 29'52,2 "W) no município de Barcelos, estado do Amazonas, Brasil. Água bruta foi diluída dez vezes em solução esterilizada de NaCl a 0.9% e diluições seriadas (10^{-1} - 10^{-3}) foram preparadas a partir desta primeira. Uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada manualmente (técnica de Drigalski-espátula) em meio de ágar soja tríptico (TSA) e incubada por 24 horas / 28 °C. Cada cepa foi preservada em glicerol (12% / - 20 ºC) e reativada em caldo Luria Bertani (LB) (Miller: NaCl, 10 $g.L^{-1}$; Triptona, 10 $g.L^{-1}$ e extrato de levedura, 5 $g.L^{-1}$) (5 mL / 30 °C / 120 rpm).

As bactérias foram cultivadas em meio LB ágar e as colônias foram semeadas em placas com dois diferentes meios minerais salinos (DOI *et al.* 1995 e TOMIZAWA *et al.* 2014) acrescidos, separadamente, de glicose 1%, frutose 2% e lignina bruta 0,1%. As placas foram submetidas a radiação em transiluminador (Kasvi – Paraná - Brasil) a cada 24 horas e, as colônias que apresentaram fluorescência em qualquer um dos meios cultivados, foram selecionadas e armazenadas para posterior confirmação do acúmulo de PHA.

3.4. Testes de confirmação da síntese de PHA

As bactérias isoladas foram cultivadas em meio mineral salino (TOMIZAWA *et al.* 2014) acrescentado de glicose 1% para seleção das bactérias sintetizadoras de PHA utilizando o método de coloração BODIPY™ 505/515 (Invitrogen™ da Thermo). Após incubação, as células foram centrifugadas (8000 rpm/10 min) e o precipitado bacteriano (pellet) foi ressuspendido em 1X PBS 0.011% Polioxietileno octilfenil Eter (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Japão), onde, 10 µL da suspensão foi misturada ao corante (0.5 µM) e,

após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente, as células foram visualizadas em microscópio invertido (IX73, Olympus, Japão) utilizando um filtro de fluorescência.

3.5. Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

As bactérias selecionadas no primeiro processo de triagem com Vermelho do Nilo foram caracterizadas quanto a sua morfologia utilizando o kit de coloração de Gram (Laborclin – Paraná - Brasil) e visualizadas em microscópio óptico (magnificação 100 x). Após a segunda etapa da seleção utilizando o corante BODIPY, as cepas codificadas como Tupe A, Tupe E e RP2 tiveram seu perfil de crescimento determinado em meio rico nutriente (NR) (13 g de caldo nutritivo, 5.0 g de digestão pancreática de caseína, 0.5 g de extrato de levedura, 8.5 g de extrato de carne por 1000 mL), sendo que, a cepa RP2 teve seu perfil de crescimento avaliado também em meio LB (Lennox). Cada bactéria foi reativada em 5 mL do meio nutriente de cultivo (24 h/ 30 °C/ 120 rpm) e, após a determinação da densidade óptica a 600 nm (DO_{600}), uma alíquota da cultura foi transferida para 50 mL do meio de cultivo de forma que a DO_{600} iniciasse em 0.1. A cada 1 hora, 100 µL da cultura era coletada, diluída para 1000 µL e a DO_{600} era determinada.

3.6.Síntese de PHA e condições de cultivo

3.6.1. Isolado LB_TupeA

3.6.1.1. Otimização do tempo de cultura

A influência do tempo de cultivo foi avaliada de forma a determinar o tempo ideal para coletar as células bacterianas com maior acúmulo de PHA. O isolado Tupé A foi submetido a um tipo de cultura em dois estágios em menor escala. A bactéria armazenada em glicerol foi reativada em 4 mL de meio NR sob agitação constante a 200 rpm/30 °C e a DO_{600} foi determinada para que a subsequente cultura iniciasse em uma DO_{600} de 0.1. A alíquota de cultura bacteriana calculada foi adicionada em 10 mL de caldo NR (12 tubos tipo Falcon de 50 mL) e esta foi cultivada a 30 °C/140 rpm/18 h. Após isso, os tubos foram centrifugados (8000 rpm/10 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com água destilada esterilizada e transferidas para um tubo contendo meio mineral salino (TOMIZAWA *et al.*, 2014) contendo a seguinte composição: 1.50 g de KH_2PO_4, 9 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$, 0.5 g de NH_4Cl, 0.20 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H_2O$ (esterilizado separadamente), sendo suplementado também com 1 mL de solução-traço (7.8 g de $CaCl_2.H_2O$, 9.7 g de $FeCl_3.6H_2O$, 0.218 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.156 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.118 g de $NiCl_2.6H_2O$, e 0.105 g de $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ por litro em 0.1 M HCl) (KATO *et al.*, 1996). Glicose a 1% foi selecionada como fonte de carbono e acrescida ao meio mineral para este teste. A leitura da DO_{600} foi feita a cada 12 horas, assim como a

visualização das células utilizando o corante BODIPY^{TM} e estas foram centrifugadas, lavadas e liofilizadas para determinação do conteúdo de PHA por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

3.6.1.2. Produção de PHA em diferentes fontes de carbono

A cepa Tupé A foi submetida a cultura em duas etapas onde, após a reativação em NR, 1 mL da cultura foi transferida para 100 mL de NR e incubada em shaker rotatório até o tempo determinado para a fase estacionária de cada espécie. As células foram centrifugadas, lavadas com água esterilizada e transferidas para 100 mL de meio mineral salino acrescidos de glicose (1%), frutose (1%), óleo de soja (2%) e lignina alcalina (0.1%) acrescidos ao meio salino como única fonte de carbono separadamente em frascos tipo Sakaguchi de 500 mL. As amostras foram incubadas por 48h a 30 ^{o}C/120 rpm. Para o cultivo em óleo de soja, o meio NR foi acrescido de óleo de soja a 0.5 % (v/v) de forma a estimular as enzimas que degradam este composto.

Outras fontes de carbono foram testadas na concentração de 0.1% como: lignina alcalina, lignina dealcalina (TCI, Japão) e lignina bruta liofilizada fornecida pelo laboratório de Celulose e Papel do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. A lignina dealcalina foi submetida a fracionamento por meio da acidificação (adição de HCl até se obter pH 2.0) do pó diluído, onde o sobrenadante foi liofilizado e essa fração foi nomeada lignina solúvel em ácido (LSA). Ao precipitado, adicionou-se NaOH 10 M até atingir o pH 9.0, sendo essa fração nomeada lignina solúvel em base (LSB). As frações foram neutralizadas antes de liofilizadas. Simultaneamente, a influência da concentração de metais no crescimento celular e no acúmulo de PHA foi verificada. Fez-se duas baterias de teste onde, foi utilizada a solução-traço e $MgSO_4$ na concentração previamente mencionada (1 X) e a uma concentração 10X.

Derivados de lignina (ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, 4-HBA, 2,5-DHBA, 2,4-DHBA, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido gálico) foram acrescentados ao meio salino como única fonte de carbono na concentração de 1%. Ácido gálico, vanílico, ferúlico e vanilina foram selecionados e testados a uma concentração de 10%. As células foram crescidas sob agitação constante (120 rpm) por 48 horas, coletadas por centrifugação, seguida de lavagens com água deionizada, e foram liofilizadas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.6.2. Isolado LB_TupeE

O isolado Tupé foi submetido ao mesmo processo de fermentação em duas etapas de acordo com o item 3.5.1.2., onde glicose 1%, frutose 1%, óleo de soja 2% e lignina alcalina

0.1% m/V foram utilizados também como fonte de carbono. Este isolado foi submetido ao processo de fermentação em uma etapa onde a bactéria foi reativada em placa contendo meio NR ágar e uma colônia foi transferida para 50 mL de meio NR que cresceu sob constante agitação a 120 rpm a 30 °C por 16h. Após esse tempo de cultivo, as células foram centrifugadas (8000 rpm/10 min), lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 1X (8.0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 0.2 $g.L^{-1}$ de KCl, 1.44 $g.L^{-1}$ de Na_2HPO_4 e 1.8 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, pH 7.4) e foram transferidas para frascos de 500 mL contendo 250 mL de meio mineral salino (2.80 g de KH_2PO_4, 3.32 g de Na_2HPO_4, 0.50 g de NH_4Cl por litro) (DOI *et al.* 1995) suplementado com 0.20 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4.7H_2O$ (esterilizado separadamente), 0.54 $g.L^{-1}$ de uréia (NG e SUDESH 2016), 1 mL/1000 mL de solução traço e glicose e sacarose a 1% (m/V). Iniciou-se com uma densidade óptica (D.O.) inicial de 0.1 e as células foram crescidas sob constante agitação a 30 °C a 120 rpm por 48 horas. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas, lavadas 3x com água destilada e liofilizadas para posterior determinação do conteúdo de PHA e eventual extração destes polímeros.

3.6.3. Isolado LB_RP2 (Projeto Araçá)

Primeiramente, a cepa foi cultivada em meio rico nutriente por 24 horas e transferida para o mesmo volume de meio mineral salino (TOMIZAWA *et al.*, 2014) sendo suplementado também com 1 mL de solução-traço (KATO *et al.*, 1996), conforme mesmo processo de fermentação em duas etapas de acordo com o item 3.5.1.2., acrescido de glicose (1 $g.L^{-1}$), lignina alcalina (1 $g.L^{-1}$) + glicose (1 $g.L^{-1}$) e lignina alcalina (1 $g.L^{-1}$), separadamente como fonte de carbono. Após 72 horas de incubação, uma alíquota das células foi coletada e visualizada em microscópio utilizando o corante BODIPY™ e o total das células foram lavadas 3x com água destilada e foram liofilizadas para posterior determinação do conteúdo de PHA por CG-EM. Em outra etapa, este isolado foi cultivado em 50 mL nos meios NR e LB a 30 °C a 120 rpm por 16 horas. Após a incubação, as células foram centrifugadas, lavadas e liofilizadas para determinação do conteúdo de PHA. O desenvolvimento desta bactéria em condição anaeróbica (50 mL de meio NR e LB em tubo Falcon de 50 mL a 30 °C/42 h) nos meios nutrientes foi aplicado. A DO_{600} foi determinada a cada 6 h e o possível acúmulo de PHA visualizado em microscópio de fluorescência utilizando o corante BODIPY™.

3.7. Extração dos polímeros e procedimento analítico

O conteúdo e a composição do PHA foram determinados por cromatografia gasosa acoplada à técnica de espectroscopia de massa (CG-EM) (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu,

Kyoto, Japão); as células secas foram submetidas a uma reação de metanólise (NUMATA e MORISAKI, 2015). O conteúdo de PHA e a composição do monômero foram determinados com base em uma curva de calibração de cinco pontos (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 e 2.5 $mg.mL^{-1}$) de P (3HB). O dispositivo de CG foi equipado com uma coluna capilar de 30 m x 0.25 µm x 0.25 mm tipo DB-1 - Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EUA) utilizando He como gás carreador (2.10 $mL.min^{-1}$). A temperatura de injeção (modo split), interface CG-EM e da fonte do EM foram, respectivamente, 250, 250 e 200 °C. O programa de corrida configurado foi o seguinte: temperatura inicial de 45 °C por 1 minuto, seguido por uma rampa de temperatura de 7 °C/min até 117 °C e outra rampa de 35 °C/min até 300 °C mantida por 5 min. O EM foi operado em modo SCAN e SIM com a faixa de razão m/z de 44 e 350.

O método de extração de PHA foi ligeiramente modificado de um estudo anterior (HIGUCHI-TAKEUCHI *et al.*, 2016). Aproximadamente 1 g de células liofilizadas foi misturada com clorofórmio sob agitação constante para extrair o PHA. Após 4 dias, a mistura foi filtrada, concentrada em um evaporador rotativo a vácuo (R-300, BUCHI), e o polímero foi precipitado usando metanol frio. O polímero extraído foi lavado duas vezes com hexano e seco à temperatura ambiente.

As estruturas químicas do PHA foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de ^{1}H) (VNMRS 500, Agilent Technologies, Inc., Califórnia, EUA). Dois miligramas de polímero purificado foram dissolvidos em 0.6 mL de $CDCl_3$ com 0.05% (v/v) de tetrametilsilano (TMS) (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japão). O espectro de ^{1}H-RMN foi registrado a 25 °C com aquisição de 57692 pontos de dados. O peso molecular do PHA extraído foi determinado por cromatografia de permeação em gel (GPC) (RI-2031, PU-2086, AS-2055, CO-2056; JASCO, Tóquio, Japão) com coluna Shodex K-806M, K802 e KG a 40 °C. A concentração da amostra utilizada foi de aproximadamente 1 $mg.mL^{-1}$ em clorofórmio e o mesmo solvente foi aplicado como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0.8 $mL.min^{-1}$. Padrões de poliestireno com os seguintes pesos moleculares: 1.22×10^3, 2.98×10^3, 6.94×10^3, 1.83×10^4, 4.72×10^4, 1.24×10^5, 3.26×10^5, 6.61×10^5, 1.39×10^6 e 2.70×10^6 $g.mol^{-1}$, foram usados para estimar o peso molecular da amostra.

3.8. PCR – Polihidroxialcanoato sintase Classe I e II

O DNA genômico extraído de cada bactéria selecionada (IT6, RP2, Tupé A e E) foi testado por eletroforese em gel de agarose para confirmar a integridade do DNA e sua quantidade aproximada. Um fragmento do gene PHA sintase foi amplificado utilizando primers

degenerados (Tabela 3) construídos por ROMO *et al.* (2007). A mistura de reação foi obtida do kit GoTaq® Green Master Mix -PROMEGA (Wiscosin – EUA) seguindo o protocolo do fabricante. Os amplicons foram purificados usando o kit de Purificação de PCR QIA quick® - QIAGEN (Hilden – Alemanha).

Tabela 3. Sequência dos primers degenerados desenhados para selecionar microrganismos produtores de PHA e composição da mistura de reação de ligação.

Primer	**Sequência 5' – 3'**	
G-D (Fw)	GTGCCGCCSYRSATCAACAAGT	
G-1R (Rv)	GTTCCAGWACAGSAKRTCGAA	
Protocolo da reação de ligação	**Tupé A (µL)**	**Tupé E (µL)**
H_2O	2.5	1.0
Tampão de ligação rápida 2x	5.0	5.0
pGEM® – T easy	1.0	1.0
Produto de PCR	0.5	2.0
DNA ligase T_4	1.0	1.0

A amplificação do gene foi feita por clonagem utilizando o vetor pGEM-T easy (PROMEGA). Os produtos de amplificação purificados foram quantificados em NanoDrop 2000 para determinação da quantidade de DNA necessário para a reação de ligação (Tabela 2). A mistura foi mantida a 16 °C por 1 hora e transferida para 4 °C até a etapa de transformação. Separadamente, placas contendo LB ágar + 100 $\mu g.mL^{-1}$ de ampicilina e, após o resfriamento, IPTG 1M e X-Gal 4% foram espalhados na placa com auxílio de alça de Drigalski. O protocolo de transformação em *E. coli* DH5α obedeceu às seguintes etapas: 100 µL de células competentes foram misturadas a 10 µL do produto de ligação e mantidos em gelo por 30 minutos. Após o tempo de incubação a mistura foi transferida para banho seco a 42 °C por 40 segundos e retornadas para o gelo por 5 minutos. Exatamente 900 µL de meio S.O.C. (Invitrogen™) foi adicionado em cada tubo e estes foram incubados em agitador horizontal (37 °C/200 rpm/ 1 hora). As células foram centrifugadas (4000 rpm / 8 minutos) e o sobrenadante descartado até que restasse 100 µL da mistura que foi espalhada na placa de LB ágar preparada anteriormente. Cada cepa foi diluída 10 x e uma alíquota de 100 µL foi espalhada nas placas de ágar separadamente sendo estas, em seguida, incubadas a 37 °C/ 16 horas. As colônias transformantes (coloração azul) foram numeradas, selecionadas e estriadas em uma nova placa de LB ágar/ampicilina/IPTG/ XGal sendo posteriormente incubada a 37 °C/ 16

horas. A PCR de cada colônia foi feita utilizando os primers T7p e p-58G do kit pGEM® – T easy seguindo o protocolo de reação do fabricante e o termociclador foi programado da seguinte maneira: Desnaturação inicial a 94 °C de 5 min seguido de uma etapa de 30 x de desnaturação (94 °C / 30 s), anelamento (50 °C/ 30 s) e extensão (72 °C/ 1 minuto), sendo finalizada por uma extensão final a 72 °C/ 3 minutos. Após a confirmação da transformação e seleção dos indivíduos, foi feita a extração do DNA plasmidial com o kit QIA prep® Spin Miniprep (250) – QIAGEN (Hilden – Alemanha). A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose e estes foram enviados para determinação da sequência em analisador genético.

3.9. Sequenciamento da região 16S rRNA e do genoma dos isolados

O DNA genômico dos 9 isolados foram extraídos com Mini kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen™, Thermo), tendo a qualidade visualizada em Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) e a quantificação em Fluorímetro Qubit™ 2.0 utilizando um kit de ensaio dsDNA BR (Invitrogen™ da Thermo). O gene que codifica a região 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando os primers universais 27F: 5'GAGTTTGATCATGGCTCAG 3' e 1492R: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'usando o kit Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen™ da Thermo Fisher Scientific). O mix de reação era composto de: 10 ng DNA genômico, 0.2 μM de cada iniciador, 0.2 mM dNTPs, 1,5 mM $MgCl_2$, 1X tampão de PCR, 1 U da enzima Taq DNA polimerase e água ultrapura até o volume final de 25 μL. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida por 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 59 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, e uma única etapa de 7 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram purificados usando o kit PureLink ™ Quick PCR Purification (Invitrogen da Thermo Fisher Scientific) e sequenciados com o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems™ da Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. As sequências dos nucleotídeos foram determinadas usando o analisador genético automatizado ABI 3500 (Applied Biosystems™ da Thermo Fisher Scientific). As sequências foram comparadas com as sequências de RNA ribossômico 16S (bactérias e archaea) do NCBI - National Center for Biotechnology Information (http://ncbi.nlm.nih.gov) - usando o software BLASTn® (Basic Local Alignment Search Tool).

Uma alíquota de um micrograma de cada DNA foi enviada para análise pela Genone Soluções em Biotecnologia (Rio de Janeiro, Brazil), sendo encomendadas inserções curtas de bibliotecas de DNA genômico e 1 GB de (150 leituras tipo paired-end, Q30> 80%) sequenciamento do genoma completo em um sistema Illumina HiSeq 2500. Os dados brutos foram avaliados utilizando o software FastQC v.0.11.9 seguidos da remoção dos adaptadores

com o Trimmomatic v.0.39 (BOLGER *et al.*, 2014). A montagem *De novo* foi realizada com o ABySS v.2.1.5 (JACKMAN *et al.*, 2017) e CAP3 02/10/15 (HUANG e MADAN, 1999). Com o software KmerFinder obteve-se a identificação baseada no genoma. A reordenação dos contigs utilizando genomas de referência indicados após a análise no KmerFinder foi realizada no Mauve v. 2.4.0 (RISSMAN *et al.*, 2009). Prokka 1.14.6 (SEEMANN, 2014) e Rapid Annotations foram aplicados utilizando o servidor da rede Subsystem Technology (RAST) (AZIZ *et al.*, 2008) para identificação das características do genoma (features. Essa abordagem foi utilizada para todos os genomas anotados, sendo estes depositados no banco de genoma do GenBank com os seguintes números de acesso PRJNA641460 (*Ralstonia pickettii* cepa LB_TupeA), PRJNA641464 (*Aquitalea* sp. cepa LB_TupeE) e PRJNA641466 (*Bacillus paramycoides* cepa:LB_RP2).

3.10. Identificação da cepa LB_RP2 por meio de análise genômica

De maneira a confirmar a identificação da cepa LB_RP2, duas ferramentas foram utilizadas como suporte para auxiliar e esclarecer a resolução da espécie bacteriana: cálculo dos índices de Identidade de Nucleotídeo Média – Average Nucleotide Identity (ANI) - baseado no BLAST+ (ANIb) e no MUMmer (ANIm), assim como nos índices de correlação de assinaturas de nucleotídeos (Tetra) por meio da função Busca de Correlação Tetra – Tetra Correlation Search (TCS). A segunda ferramenta consiste na análise comparativa de sequências multilocus (MLSA, do inglês Multilocus Sequence Analysis). Ambos os softwares BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e MUMmer são algoritmos de código aberto que possibilitam a comparação de sequências genômicas, sendo que, este último permite comparar com eficiência duas sequências na escala de megabase, uma limitação do algoritmo do BLAST (KURTZ *et al.* 2004). A similaridade do genoma foi estimada através da determinação do índice de similaridade entre os genomas depositados no banco de dados JSpeciesWS e a sequência de alvo de LB_RP2 usando JSpecies Web Server (JSpecies WS) (RICHTER *et al.*, 2016). O genoma anotado da cepa LB_RP2 foi carregado no servidor da web e o recurso Tetra Correlation Search (TCS) foi aplicado para obter a lista dos genomas mais semelhantes com base no índice gerado. Seis espécies com pontuação Z> 0.999 e outras três com pontuação Z> 0,989 foram selecionadas para realizar o cálculo do índices ANIb e ANIm.

Para a análise de sequência multilocus (MLSA), a cepa LB_RP2 e quatorze linhagens do gênero *Bacillus* do banco de dados do genoma NCBI foram incluídas neste estudo. Os critérios usados para selecionar cepas adicionais foram baseados no resultado da porcentagem

de identidade (> 99%) da comparação da sequência da subunidade do rRNA 16S (SSU rRNA) anotada com as sequências disponíveis no banco de dados de sequências do RNA ribossômico 16S (Bacteria e Archaea) usando o software BLASTn®. Os seis genes selecionados, do tipo housekeeping, estão contidos no operon mraZ-rsmH-ftsLI-murEF-mraY-murD-ftsW-murGC-ddlB-ftsQAZ-lpxC em *Escherichia coli*, também conhecidos como cluster de genes da divisão da parede celular (dcw, do inglês division cell wall) (VICENTE *et al.* 1998). Os genes selecionados foram: rsmH (16S rRNA (citosina (1402) - N (4)) metiltransferase), FtsLAZ (proteínas celulares de divisão celular L, A e Z), murE (UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligase) e murD (UDP-N-acetilmuramoilalanina-D-glutamato-ligase). *Escherichia coli* 97-3250 foi usada como grupo externo para fins de comparação. Cada gene foi submetido a alinhamento múltiplo usando ClustalW, e todas as posições contendo dados ausentes e lacunas foram deletadas (MORIUCHI *et al.*, 2019). Todos os genes foram concatenados na ordem rsmH-ftsL-murE-murD-ftsA-ftsZ, constituindo um fragmento de comprimento total de 6388 pb. A árvore filogenética foi construída de acordo com as seguintes etapas: Similaridades pareadas para as sequências foram analisadas usando o método de máxima verossimilhança usando o modelo geral reversível no tempo e taxas distribuídas por gama (G) (GTR + G) entre os locais com as 1000 réplicas de bootstrap. Todas as análises foram realizadas usando o software MEGA versão X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.11. Análise filogenética - PhaC

Com o objetivo de classificar as polihidroxialcanoato sintases (PhaC) entre as diferentes classes de PhaC, selecionou-se sequências das enzimas depositadas nos bancos de dados Proteínas de Referência (RefSeq) e/ou Sequências de Proteínas não redundantes (nr) do GenBank (NCBI). Após a execução do alinhamento global utilizando o MUSCLE, a história evolucionária foi inferida utilizando o método de máxima probabilidade e o modelo de Le_Gascuel_2008 (LE e GASCUEL, 2008) contanto que apresentasse o menor índice de Critério de Informação Bayesiano (BIC) no teste do melhor modelo (FELSENSTEIN, 1985). A árvore de consenso bootstrap foi inferida de 1000 réplicas. Para obtenção das árvores iniciais para a busca heurística foram aplicados os algoritmos Neighbour-joining e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo JTT e, então, selecionando a topologia com valor de log verossimilhança superior. Uma distribuição gama discreta foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os sítios, 5 categorias + G (parâmetro = 1. 2090). Esta análise envolveu 24 sequências de aminoácidos, e todas as etapas das análises evolutivas foram conduzidas no MEGA X (KUMAR *et al.*, 2018).

3.12. Análise estatística

Todos os resultados mostrados são as médias ± desvios padrão de experimentos em triplicata. A diferença entre os grupos foi determinada pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção das bactérias e confirmação da síntese de PHA

A elaboração de um meio seletivo, a partir da filtração da água superficial coletada e seu enriquecimento com a matéria orgânica > 100 KDa, possibilitou o isolamento de 28 colônias nas duas coletas realizadas. Após sucessivas etapas de confirmação de fluorescência em meio mineral salino acrescido de açúcares como glicose e frutose, um total de seis bactérias foram selecionadas, utilizando a técnica com o corante vermelho do Nilo. Esta estratégia de isolamento permitiu uma seleção mais específica de bactérias capazes de metabolizar matéria orgânica, onde boa parte desta matéria é composta de ácidos fúlvicos e húmicos ricos em derivados de degradação da lignina (ERTEL *et al.*, 1986). Posteriormente, das bactérias armazenadas no banco de microrganismos do Laboratório de Biodegradação, isoladas do rio Preto (Barcelos-AM) e de Manacapuru, foram selecionadas três bactérias que apresentaram fluorescência característica de acúmulo de PHA ao serem cultivadas em meio mineral salino acrescido de glicose e frutose como fonte de carbono. Estas bactérias foram inicialmente isoladas utilizando meios ricos em nutriente, como LB e TSB (Tryptic Soy Broth) o que resultou na obtenção de centenas de indivíduos. Estes isolados permaneceram armazenados em glicerol a -20 °C até o processo de triagem e seleção das bactérias com potencial para sintetizar PHA. De maneira comparativa, o isolamento de bactérias por este método resulta na obtenção de uma grande quantidade de isolados, o que leva ao aumento no número de testes que serão efetuados pós-isolamento, consumindo assim recursos e tempo. A amostragem de bactérias utilizando a própria água de coleta para elaboração do meio de cultivo foi aplicada por HIGUGHI-TAKEUCHI *et al.* (2016), onde o meio de cultivo inibe o crescimento de espécies não adaptadas as condições extremas do meio elaborado. Entre as bactérias reativadas provenientes de Barcelos e Manacapuru, três foram selecionadas devido apresentarem fluorescência característica de acúmulo de PHA utilizando glicose e frutose como fonte de carbono, conforme exemplificado na Figura 6.

Comparando os métodos para triagem de microrganismos produtores de PHA, o método utilizando Vermelho do Nilo tem sido o mais aplicado (SPIEKERMANN *et al.*, 1999; SRUAMSIRI *et al.*, 2020) seguido do corante Sudan Black (STEINBUCHEL *et al.*, 1987) que permite selecionar bactérias com potencial para sintetizar polihidroxialcanoatos. Porém, dos nove isolados selecionados pelo método com V. do Nilo, sete apresentaram fluorescência similar ao controle positivo (*R. eutropha* H16). Logo, o uso do corante BODIPY associado a microscopia de fluorescência mostrou melhor acuracidade e sensibilidade para selecionar

bactérias acumuladoras de PHA, conforme observado também por CHOI *et al.* (2015) e LEE *et al.* (2013). Nestes dois últimos estudos, os experimentos permitiram obter uma rápida coloração das células e uma seleção mais efetiva das bactérias positivas para PHA.

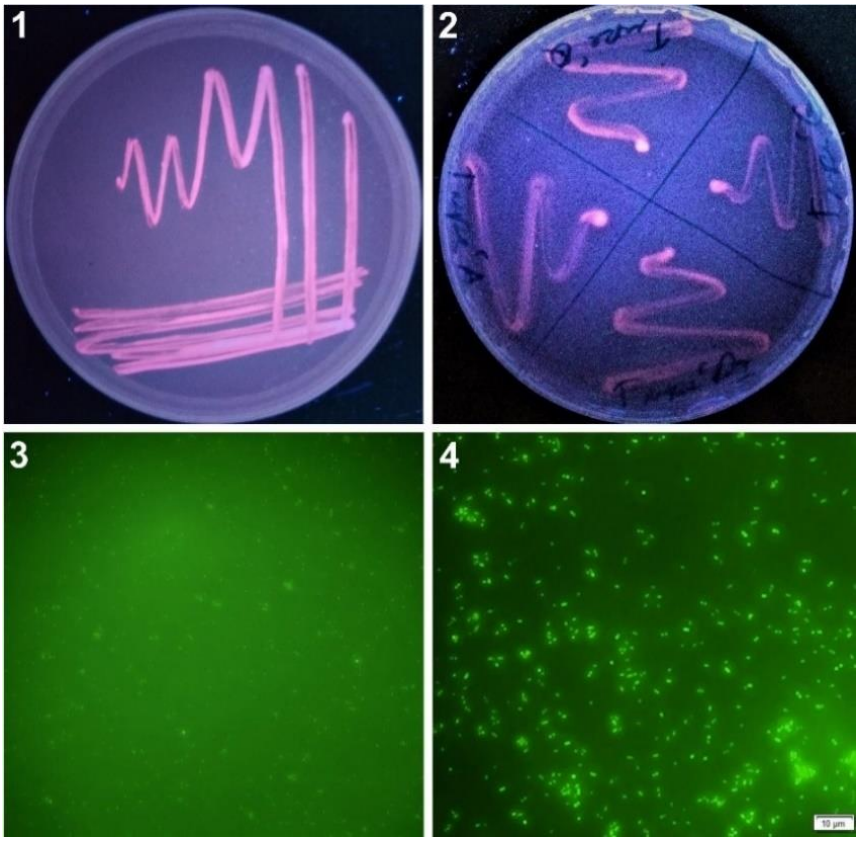


Figura 6. Métodos de seleção de bactérias sintetizadoras de PHA com os corantes Vermelho do Nilo (1 e 2) e BODIPY^{TM} (3 e 4). (1) Falso positivo – Bactéria não acumuladora de PHA; (2) Fluorescência característica de acúmulo de PHA; (3) Controle negativo *R. eutropha* PHB^{-4} e (4) Controle positivo *R. eutropha* H16.

A análise das bactérias utilizando o corante BODIPY^{TM} 505/515 permitiu identificar com maior precisão as bactérias acumuladoras de PHA ao comparar a fluorescência da bactéria alvo com o controle negativo [*R. eutropha* PHB^{-4}, Figura 6(3)] e o controle positivo [*R. eutropha* H16, Figura 6(4)]. O corante BODIPY® 505/515 (4,4-difluoro-3a, 4a-diaza-s-indaceno) é um fluoróforo de propriedades lipofílicas, ou seja, com alta afinidade a lipídios neutros, ácidos graxos, óleos e polímeros. A natureza anfifílica de PHAs, contendo grupos alquila hidrofóbicos e oxigênios de grupos éster carbonil hidrofílicos faz com que estes polímeros possuam alta afinidade a sais e seus grupos hidrofóbicos com afinidade por componentes das membranas celulares (REUSCH 1992; REUSCH 2000). A afinidade do corante aos grânulos intracelulares de PHAs é visível no microscópio, apresentando uma fluorescência mais intensa localizada no citoplasma bacteriano, confirmando a importância da

comparação com controles positivos e negativos como no caso das cepas de *R. eutropha* [Figura 6(4)].

4.2. Identificação taxonômica das bactérias

4.2.1. Identificação por meio da determinação da sequência do RNA ribossomal 16S (SSU-16S rRNA)

As sequências do gene 16S rRNA de todos os organismos foram determinadas e comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI, permitindo assim identificar as espécies (Tabela 4). Apenas os isolados RP2 e MS3 não foram classificados taxonomicamente a nível de espécie por meio da determinação da sequência de SSU-16S rRNA, demandando experimentos adicionais que permitam identificar estas bactérias com maior precisão. Os isolados Tupe E, G e Q foram identificados como pertencentes ao mesmo gênero, *Aquitalea* sp. Com isso, selecionou-se a cepa E para desenvolvimento dos experimentos de acúmulo de PHA.

Tabela 4. Identificação das bactérias isoladas por meio da comparação das sequências obtidas da região 16S rRNA com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Código	Morfologia (Gram)	Ponto de amostragem	BLAST	Identidade (%)
IT6	Bacilo (+)	Lago do Tupé – AM	*Gordonia polyisoprenivorans*	100
IT11	Bacilo (+)	Lago do Tupé – AM	*Bacillus infantis*	99,9
Tupé A	Bacilo (-)	Lago do Tupé – AM	*Ralstonia pickettii*	100
Tupé E	Bacilo (-)	Lago do Tupé – AM	*Aquitalea* sp.	99,9
Tupé G	Bacilo (-)	Lago do Tupé – AM	*Aquitalea* sp.	99,8
Tupé Q	Bacilo (-)	Lago do Tupé – AM	*Aquitalea* sp.	98,9
RP$_2$	Bacilo (+)	Rio Preto – AM	*Bacillus paramycoides*	100
MS3a	Bacilo (+)	Manacapuru – AM	*Exiguobacterium indicum*	99,9
			Exiguobacterium acetylicum	99,9
MS6 LB	Bacilo (+)	Manacapuru – AM	*Bacillus* sp.	100

Dos nove isolados selecionados, as bactérias IT6 e MS3a identificadas como *Gordonia polyisoprenivorans* e *Exiguobacterium* sp. mostraram fluorescência pelo método do V. Nilo quando cultivadas em meio mineral salino, porém, nenhum PHA foi encontrado.

Conforme análise dos genomas já depositados de *G. polyisoprenivorans*, *E. indicum* e *E. acetylicum* no GenBank do NCBI, mostram que estas espécies não possuem os genes pertencentes as vias de síntese de PHA, portanto, não acumulam estes grânulos. Estas espécies foram investigadas por possuírem aplicabilidade de interesse biotecnológico ao degradarem compostos recalcitrantes como poliestireno, óleo cru e naftaleno (LIN *et al.*, 2012; PANDEY 2020). *G. polyisoprenivorans* teve sua aplicabilidade na síntese de PHA ao ser inserido nesta cepa o cluster de genes da síntese de PHA de *R. eutropha* (phaCAB) e *P. aeruginosa* (phaC1), sendo utilizado poli(cis-1,4-isopreno) como substrato. Utilizando este derivado da degradação da borracha como fonte de carbono, entre 6.4 e 10.2 % de P(3HB-co-3HV) em termos de MCS foi alcançado (ANDLER *et al.*, 2019).

Entre as nove bactérias selecionadas na primeira triagem, por meio da técnica utilizando o corante BODIPY (Figura 7) foram selecionadas as bactérias *R. pickettii* (Tupé A), *Aquitalea* sp. (Tupé E) e *Bacillus* sp. (RP_2) para os testes de fermentação e síntese de PHA. A morfologia e a determinação da coloração de Gram foram visualizadas para as três espécies escolhidas, como também a morfologia das colônias em meio rico nutriente ágar (Figura 8). A bactéria facultativa quimiolitoautotrófica acumuladora de PHA *C. necator* H16 (REINECKE e STEINBÜCHEL 2009) foi utilizada como controle positivo para visualização da fluorescência com o corante BODIPY e sua cepa mutante *Cupriavidus necator* PHB^{-4}, que contém uma mutação no gene da PHA sintase que a torna incapaz de acumular PHA (RABERG *et al.*, 2014), foi selecionada como controle negativo.

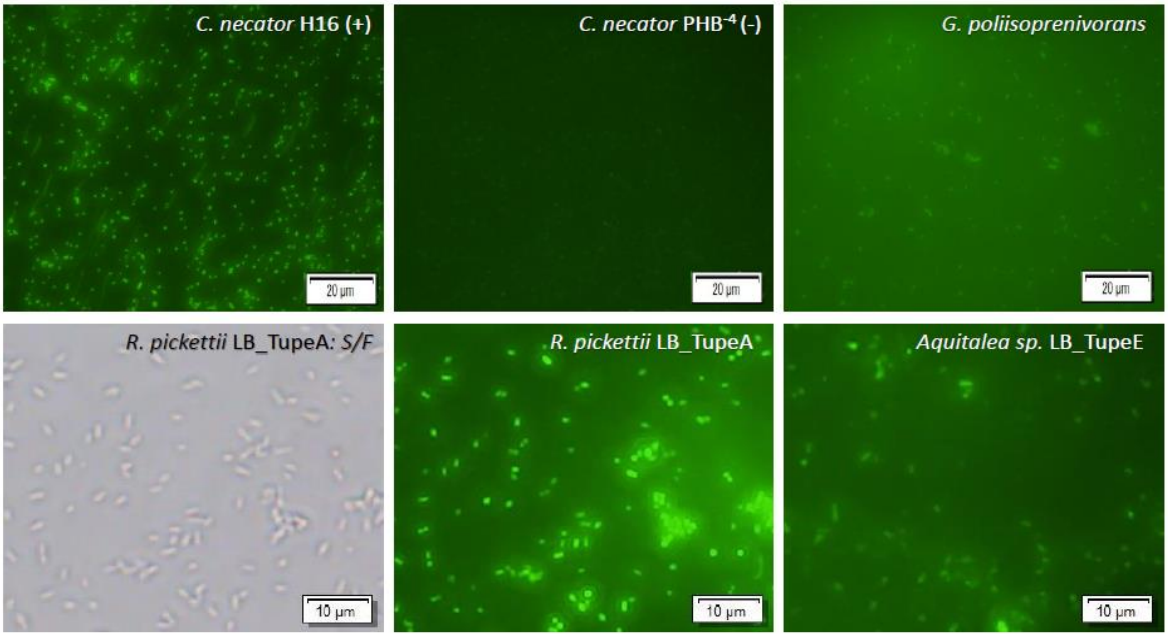


Figura 7. Fluorescência característica da presença ou ausência de inclusões de PHA utilizando o corante BODIPY. S/F: Sem fluorescência

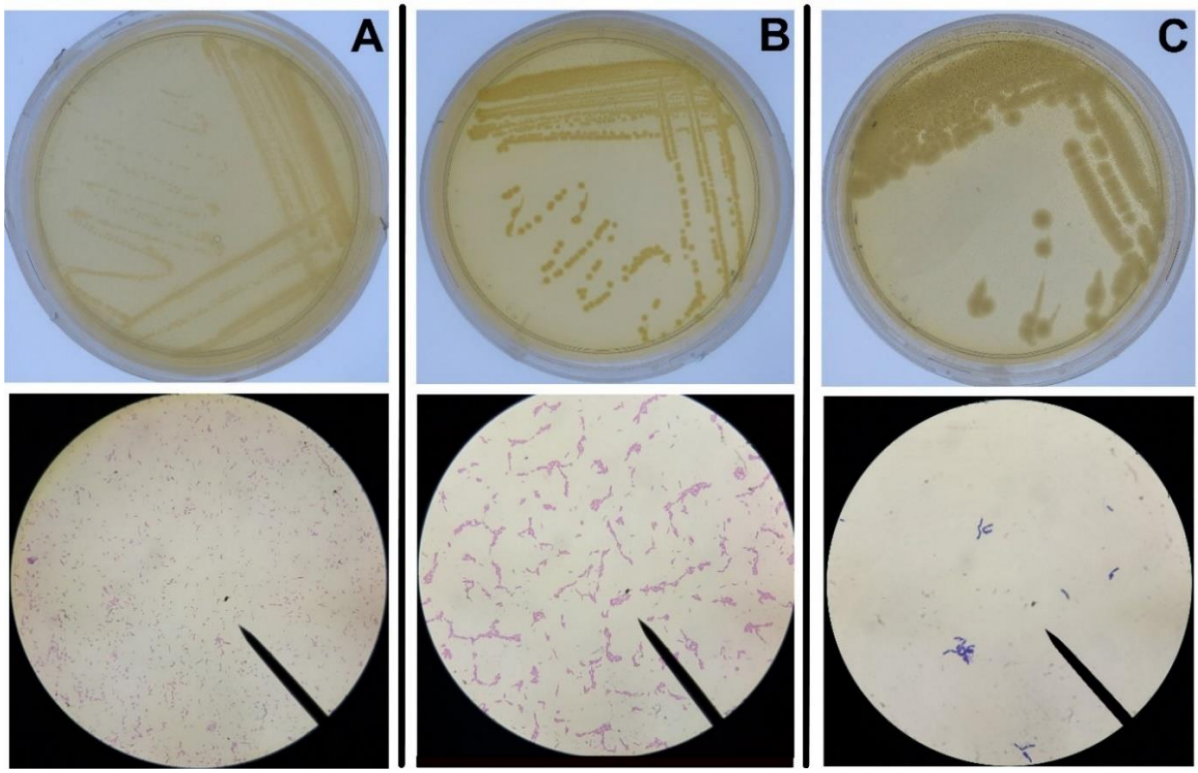


Figura 8. Morfologia das colônias e caracterização morfológica das células bacterianas cultivadas em meio rico nutriente dos isolados escolhidos. (A) Cepa Tupe A (*Ralstonia pickettii*) (B) Cepa Tupe E (*Aquitalea* sp.) e (C) Cepa RP2 (*Bacillus* sp.).

R. pickettii (Tupe A) é um bacilo gram-negativo, móvel e pequeno com atividade positiva para catalase e suas colônias são redondas e convexas, beges, lisas e brilhantes. *Aquitalea* sp. (Tupe E) é um bacilo gram negativo, móvel e com atividade positiva para catalase e suas colônias são redondas, beges, opacas e convexas, com, aproximadamente, 1.8 mm de diâmetro. *Bacillus sp.* (RP2) é um bacilo gram positivo, grande, com atividade positiva para catalase e sua colônia é branca, opaca, margens onduladas e elevação em relevo com diâmetro de 4.3 mm.

4.2.2. Análise da sequência genômica dos isolados selecionados

4.2.2.1. Cepa Tupe A

A quantidade de leituras dos dados brutos (reads) obtidos foram de 8,600,184 com eficácia de 99.91%. O esboço (draft) do genoma (draft) de 5.32 Mb de *R. pickettii* (Tupe A) está distribuído em 11 contigs com um valor de N50 de 1,205,870 e conteúdo G+C de 63.6%. A anotação feita pelo NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) permitiu identificar que o genoma de *R. pickettii* é composto de 4,935 genes, sendo que 4,874 são codificantes (CDS), 62 pseudogenes, 51 tRNAs, 6 rRNAs e 4,812 proteínas. O genoma montado e anotado de *R. pickettii* LB_TupeA foi depositado no banco de dados de genoma do GenBank (NCBI) sob o número de acesso PRJNA641460.

4.2.2.2. Cepa Tupe E

A quantidade de leituras dos dados brutos (reads) obtidos foram de 10,409,634 com eficácia de 99.92%. O genoma draft de 4.47 Mb de *Aquitalea* sp. está distribuído em 68 contigs com um valor de N50 de 207,132 e conteúdo G+C de 58.6 %. Após anotação do genoma desta cepa verificou-se que este é composto de 4,216 genes (CDS: 4,141), 37 pseudogenes, 3 rRNAs, 69 tRNAs e 4,104 proteínas. Este genoma também foi depositado no GenBank sob número de acesso PRJNA641464.

4.2.2.3. Cepa RP2

A determinação taxonômica da cepa LB_RP2 foi inconclusiva analisando apenas a sequência SSU-rRNA 16S. Logo, a análise genômica foi crucial para determinar a espécie desta cepa. A quantidade de leituras dos dados brutos (reads) obtidos foram de 7,699,810 com eficácia de 99.86%. O esboço do genoma de 5.34 Mb de LB_RP2 está distribuído em 76 contigs com um valor N50 de 216,793 e conteúdo G+C de 35.2%. A anotação feita pelo NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) revelou a existência de 5.531 genes, 276 pseudogenes, 83 tRNAs, 8 rRNAs e 5,159 proteínas. Até o momento, apenas dois genomas montados e anotados de *Bacillus paramycoides* foram relatados no banco de dados: as cepas NH24A2 (PRJNA326288) e DE0103 (PRJNA543692). A sequência completa montada está disponível no banco de dados do genoma do GenBank, sob os números de acesso JACAXA010000018.1 (BioProject: PRJNA641466) (CASTRO *et al.*, 2021). Os índices ANI e TCS obtidos são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados de índice de comparação de genoma par a par da cepa LB_RP2 e genomas selecionados no banco de dados. A porcentagem dos genomas cobertos é mostrada entre parênteses.

Organismo	**ANIb (%)**	**ANIm (%)**	**TETRA**
Bacillus paramycoides NH24A2	97.77 (86.64)	98.24 (89.61)	0.99968
Bacillus cereus VD107	96.81 (82.11)	97.56 (85.17)	0.99952
Bacillus sp. LK2	97.44 (81.74)	98.20 (83.99)	0.99949
Bacillus mycoides GOE11	91.26 (72.64)	92.32 (76.96)	0.99901
Bacillus proteolyticus TD42	90.81 (74.72)	91.63 (79.23)	0.99902
Bacillus cereus HuA2-9	91.09 (72.43)	92.05 (76.95)	0.99905
Bacillus mycoides PE8-15	91.05 (72.94)	92.08 (77.35)	0.99897
Bacillus toyonensis BAC3151	89.08 (72.89)	90.10 (76.18)	0.99875
Bacillus nitratireducens 4049	90.65 (74.17)	91.56 (78.23)	0.99873

A cepa LB_RP2 tem um ANI acima de 95% com a cepa de *Bacillus paramycoides* NH24A2, *B. cereus* VD107 e *Bacillus sp*. LK2. A maioria dos genomas bacterianos apresentou índice de correlação de tetranucleotídeos acima do valor de corte de 0,999, em que a maior correlação foi entre a cepa LB_RP2 e a cepa NH24A2, o que confirma que essa cepa pertence a esse táxon.

Na Figura 9, a árvore MLSA inferiu uma alta diversidade genética. Os genes de manutenção selecionados para desenvolver esta análise são altamente conservados entre bactérias da ordem Bacilalles e estão distribuídos no genoma de LB_RP2. As dez sequências são divididas em três grupos. Um grupo homogêneo com 97% de similaridade é formado entre as linhagens de *B. paramycoides* LB_RP2 e DE0103. Essas análises indicam que a conjunção de análise comparativa genômica e MLSA nos permite elucidar as espécies de uma bactéria pertencente a um táxon muito complexo, como o grupo *B. cereus*, com mais precisão do que a abordagem de sequenciamento da região 16S rRNA.

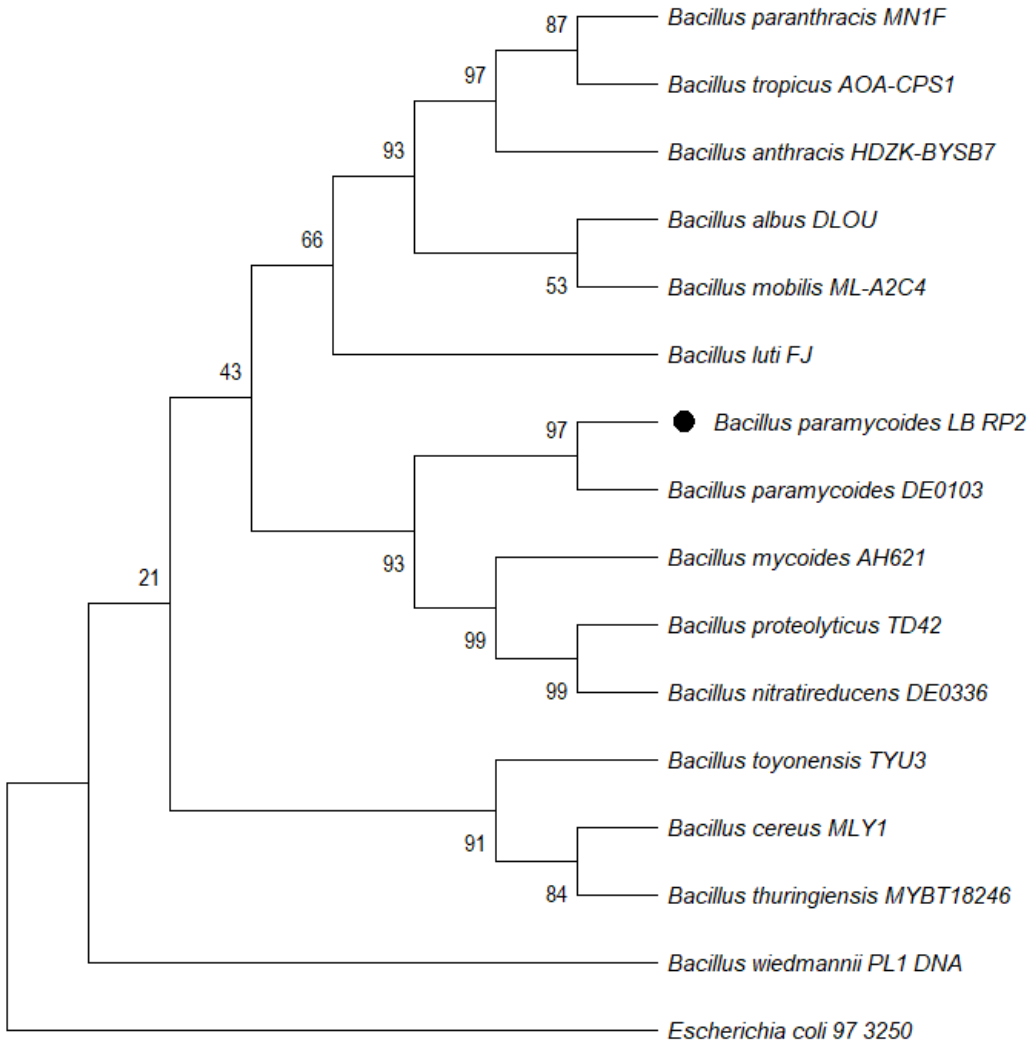


Figura 9. Árvore MLSA inferida usando o método de máxima verossimilhança (Maximum Likelihood) para 16 linhagens selecionadas a partir de genes do tipo *housekeeping* (*RsmH-FtsL-MurE-MurD-FtsA-FtsZ*) concatenados.

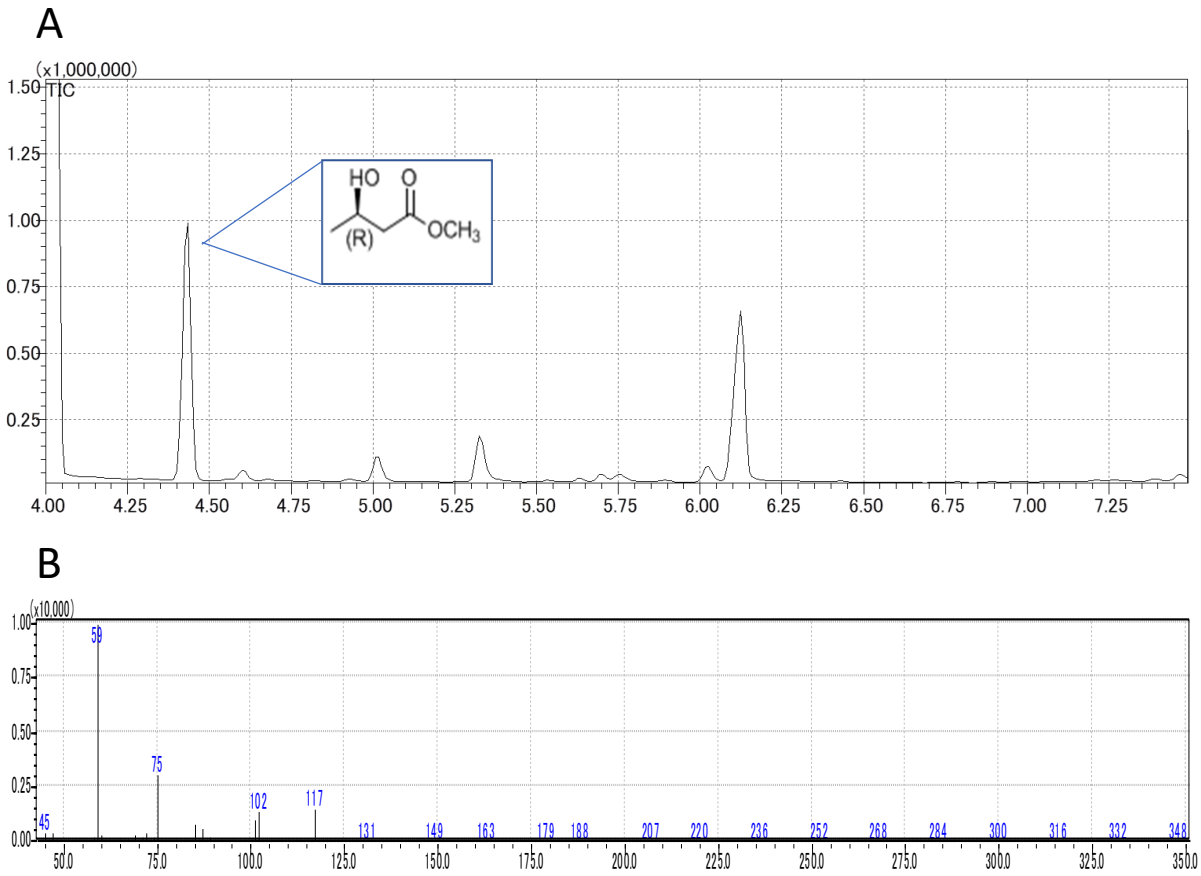
Algumas espécies pertencentes ao grupo *Bacillus cereus*, como *B. cereus* e *B. anthracis*, são conhecidas por serem patógenos humanos (IVANOVA *et al.*, 2003). No entanto, em relação a *B. paramycoides*, até o momento, nenhuma associação com patogenicidade em humanos ou com a síntese de polihidroxialcanoato foi relatada para esta espécie. A aplicação do método MLSA tem crescido continuamente tanto em estudos taxonômicos e filogenéticos, principalmente para gêneros com baixa variabilidade nas sequências 16S rRNA e com espécies que compartilham >99% da similaridade das sequências (DELAMUTA *et al.*, 2012), como é o caso do gênero *Bacillus*.

A análise comparativa da sequência do DNA ribossomal foi crucial na diferenciação das espécies pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus*, principalmente no período que eventos de bioterrorismo com *Bacillus anthracis* foram reportados em 2001 (SACCHI *et al.*, 2002). Porém, LIU *et al.* (2017), ao longo de uma investigação da diversidade genética de bactérias do grupo do *B. cereus*, identificaram nove táxons adicionais, além das doze espécies já descritas, utilizando-se da análise de MLST (Multi-locus Sequence Typing) e hibridização DNA-DNA digital permitiram inferir que, os indivíduos estudados, se tratava de novas espécies pertencentes a este grupo. Em suma, a análise genômica complementada pela abordagem MLSA são técnicas fáceis e robustas que possibilitaram a definição taxonômica da cepa LB_RP2 como alternativa a análise da sequência do gene 16S rRNA.

4.3. Síntese, identificação e quantificação de PHA

4.3.1. Técnicas de análise dos PHAs: Interpretação dos resultados

A análise dos biopolímeros por CG-EM das células liofilizadas submetidas à reação de metanólise é uma das técnicas mais tradicionais utilizadas pois permite monitorar com eficiência a composição e a quantidade do PHA diretamente da biomassa microbiana (BRAUNEGG *et al.*, 1978) sem precisar extrair o polímero previamente. Neste trabalho o conteúdo do PHA e sua composição (Figura 10) foram determinados por meio da construção de uma curva analítica (Figura 11) com diferentes concentrações de ésteres metílicos do ácido (*R*)-3-hidroxibutírico (3HB). A cada bateria de análises, uma nova curva analítica era obtida. As massas celulares secas (MCSs) das células liofilizadas foram determinadas gravimetricamente e o rendimento de PHA no meio de cultivo ($mg.L^{-1}$) foi calculado a partir do conteúdo de PHA determinado por CG-EM.



Tempo de retenção: [4.433] (R)-3-ácido hidroxibutírico, metil éter, metil éster

Figura 10. Perfil cromatográfico da fração clorofórmica da célula bacteriana submetida a reação de metanólise. Identificação do composto através da análise do espectro de massas do tempo de retenção em evidência.

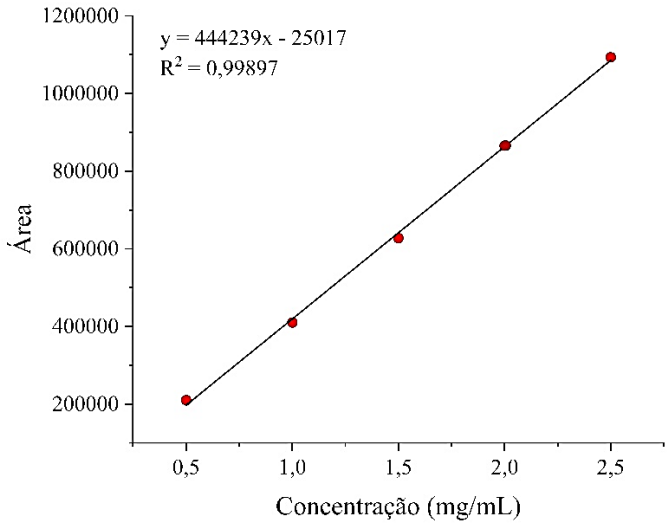


Figura 11. Regressão linear baseada em diferentes concentrações do padrão externo de poli-(*R*)-3-hidroxibutirato versus a área do pico.

Para determinação do peso molecular dos polímeros extraídos por meio da técnica de GPC, uma curva analítica (Figura 12) foi elaborada com padrões de poliestireno de diferentes pesos moleculares. O tempo de retenção dos polímeros purificados foram aplicados na fórmula da curva logarítmica obtida para cálculo da massa molecular de cada polímero.

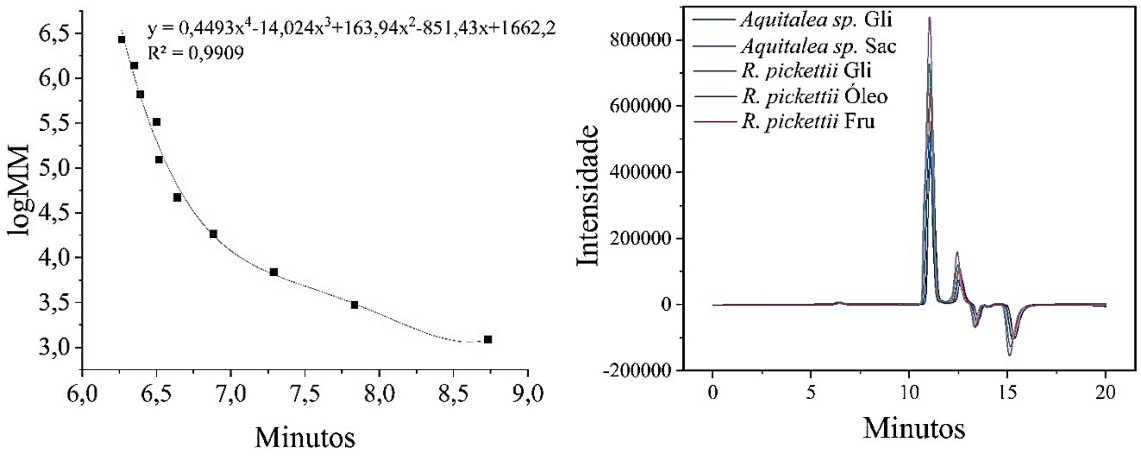


Figura 12. Curva analítica com base no tempo de retenção de padrões de poliestireno e cromatograma GPC dos biopolímeros extraídos.

4.3.2. Perfil de crescimento Tupe A e Tupe E

Para execução dos testes de fermentação foi necessário primeiramente conhecer o perfil de crescimento bacteriano em meio rico nutriente (Figura 13) de forma a se determinar o início da fase estacionária para cada espécie, sendo 14 e 10 horas para as espécies Tupé A e Tupé E, respectivamente.

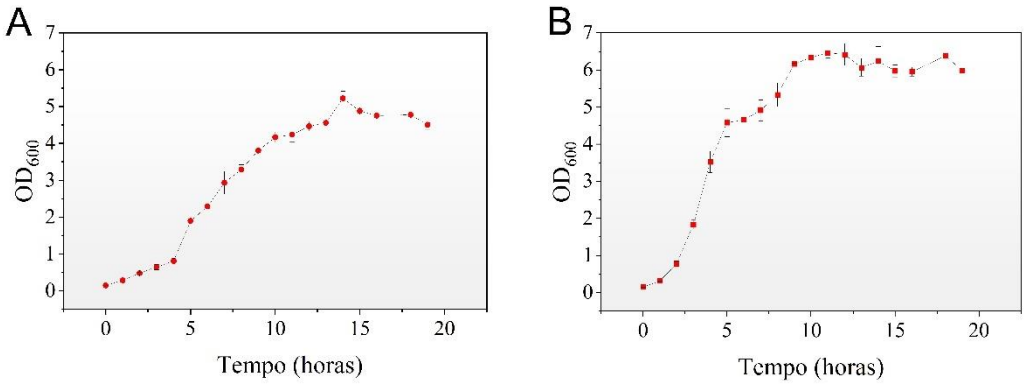


Figura 13. Crescimento bacteriano x Tempo em meio rico nutriente das bactérias *R. pickettii* LB_TupeA (A) e *Aquitalea sp*. LB_TupeE (B).

Dois tipos de cultivos têm sido aplicados em fermentações do tipo batelada (batch): cultivo em um estágio e dois estágios onde, no primeiro, o acúmulo de PHA ocorre durante o crescimento bacteriano e, no segundo, o acúmulo de PHA ocorre somente em condição de escassez de algum nutriente (CIESIELSKI *et al.*, 2015). Para aplicação dos cultivos em uma e duas etapas é necessário conhecer o perfil de crescimento em meio nutriente de forma a se determinar o final da fase de crescimento exponencial (fase log) e início da fase estacionária de cada bactéria no meio selecionado. Estudos como os de DOI *et al.* (1995) que aplicaram o cultivo em duas etapas, a coleta e transferência da massa celular para o meio mineral é feita no início da fase estacionária, de forma que nenhum PHA é acumulado dentro da célula bacteriana. Dado que cada bactéria necessita ser investigada individualmente acerca das condições ideais onde maior rendimento celular e de PHA é alcançado, os próximos itens irão abordar essa investigação para cada cepa isolada e identificada.

4.3.3. *Ralstonia pickettii* LB_TupeA

Ralstonia pickettii tem sido investigada ao longo de 20 anos devido à alta capacidade de degradação enzimática de PHA de sua polihidroxialcanoato depolimerase (ePhaZRpiT1) (NUMATA *et al.*, 2004, 2005 e 2007). Outras habilidades já reportadas para esta espécie são a sua habilidade de sobrevivência em ambientes com poucos nutrientes e capacidade de degradar uma variedade de compostos tóxicos como 2,4,6-triclorofenol, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs), ácido 2,4-diclorofenoxiacético e triterpenóide pentacíclico (BRUINS *et al.*, 2000, HATTA *et al.*, 2002). Porém, poucos estudos têm mostrado que esta espécie possui um potencial pouco explorado para a síntese de PHA (YABANNAVAR e ZYLSTRA 1995, BONATTO *et al.*, 2004).

O conteúdo de PHA foi quantificado por CG e a porcentagem foi determinada a partir da massa celular seca, e a comparação qualitativa do tempo de retenção foi realizada utilizando padrão de P(3HB). Após submeter a massa seca celular a reação de metanólise, foi possível observar, através do perfil cromatográfico e da comparação do tempo de retenção com os dados disponibilizados na biblioteca do software (Figura 9), que o monômero de PHA encontrado em todos os isolados foi do ácido (*R*)-3-hidroxibutírico, característico da degradação do poli-(3-hidroxibutirato) – P(3HB).

A otimização do tempo de fermentação em meio mineral acrescido de glicose como fonte de carbono e sua influência no conteúdo de massa celular seca (MCS) é detalhada na Tabela 6. Verificou-se que, logo após a transferência das células cultivadas em meio rico

nutriente para o meio mineral salino (MMS), a DO_{600} registrada foi de 4.82 ± 0.02 e, após 48 h de cultivo, a DO_{600} quase dobrou, indicando um significativo crescimento celular em meio mineral carente em nitrogênio. Um maior acúmulo registrado ao longo da estabilização da fase estacionária corrobora com os achados de BONATTO *et al.* (2004) que afirmou que *R. pickettii* acumula scl-PHA apenas durante a fase de crescimento estacionária. Pouca diferença pôde ser observada no conteúdo de massa seca de polímero nos tempos de 36 e 48h, sendo que, no intuito de selecionar o menor tempo para a síntese de PHA com maior rendimento, selecionou-se o tempo de 36 h para dar andamento aos demais testes. Quando a bactéria foi cultivada em MMS por 51 h, nenhum conteúdo de PHA foi encontrado.

Tabela 6. Avaliação da influência do tempo para produção do poliéster utilizando glicose 1% como fonte de carbono por *R. pickettii* LB_TupeA. (10 mL/ 30°C/140 rpm).

Fonte de carbono	Tempo de incubação (h)	DO_{600nm}	MCS ($g.L^{-1}$)	P(3HB) % *m/m*[a]
Glicose	12	6.4± 0.17	2.28 ± 0.06	13.1 ± 1.56 (a)
Glicose	24	6.7± 0.18	2.83 ± 0.26	20.2 ± 1.60 (b)
Glicose	36	7.4± 0.18	2.50 ± 0.15	24.8 ± 2.15 (b)
Glicose	48	7.6± 0.04	2.49 ± 0.10	24.4 ± 0.85 (b)

[a] Determinado por CG-EM
(a) Estatisticamente significante ($p < 0.05$)
(b) Estatisticamente não significante

Após otimização do tempo de fermentação para *R. pickettii*, a síntese de PHA foi mensurada utilizando outras fontes de carbono (Tabela 7). *R. pickettii* acumulou PHA em glicose, frutose e óleo de soja, porém em lignina alcalina 0.1%, nenhum PHA foi detectado. O maior rendimento celular de P(3HB) foi utilizando óleo de soja como fonte de carbono. A adição de 5 $g.L^{-1}$ de óleo de soja no meio nutriente foi realizada para induzir a secreção da lipase (KAHAR *et al.*, 2004) antes da transferência da biomassa para o meio mineral. Este é o primeiro estudo que investiga o acúmulo de PHA em *R. pickettii* utilizando óleo de soja e derivados da lignina. Ao comparar os rendimentos obtidos com os resultados publicados por BONATTO *et al.* (2004) verifica-se que um maior rendimento foi obtido no presente estudo. No estudo citado, *R. pickettii* 61A6 foi fermentada utilizando o cultivo em uma etapa onde a cepa foi cultivada em meio nutriente, e uma alíquota das células bacterianas foram transferidas para crescerem

em meio mineral acrescido de sacarose e melado de cana, separadamente. *R. pickettii* 61A6 acumulou 177 mg.L^{-1} em sacarose 10% em 50 h de cultivo e 357 mg.L^{-1} em melado de cana a 5% após 96 h de incubação. O cultivo em duas etapas de *R. pickettii* LB_TupeA teve influência positiva no rendimento de P(3HB), principalmente no crescimento celular, tanto utilizando açúcares simples quanto o óleo vegetal como substrato, o que resultou também na redução do tempo de fermentação.

No experimento de fermentação em duas etapas em menor escala, a fase estacionária foi observada em 48 horas de incubação. No experimento em maior escala constatou-se uma redução de 45% no rendimento do P(3HB) no tempo de 48 horas, sugerindo que a aeração pode influenciar no acúmulo de PHA em *R. pickettii* LB_TupeA, pelo menos quando glicose é utilizada como substrato. Conforme observado por DE ALMEIDA *et al.* (2010), a síntese de P(3HB) em recombinante *E. coli* foi significativamente afetada pela aeração dependendo também do substrato utilizado.

Tabela 7. Síntese de PHA utilizando fontes de carbono tradicionais por *R. pickettii* LB_TupeA (30 ºC/120 rpm/48 h/100 mL).

Fonte de carbono	**Tempo de incubação (h)**	**MCS (g.L^{-1})**	**P(3HB) %[a] *m/m***	**P(3HB) (mg.L^{-1})[a]**	**PM (g.mol^{-1}) (PDI)[b]**
Glicose	36	6.1 ± 0.6	13.5±1.3	299.7 ± 42.2	121×10^3 (1.6)
Frutose	36	3.3 ± 0.1	13.6±1.5	573.4 ± 82.2	271×10^3 (1.5)
Óleo de soja	36	4.0 ± 0.3	15.0±0.9	622.2 ± 91.1	253×10^3 (1.4)
Lignina (alcalina)	48	1.06 ± 0.02	ND	ND	ND

ND: Não detectado

[a] Determinado por CG-EM

[b] Determinado por CPG

No experimento com 10 mL de MSM, os tubos foram mantidos inclinados, aumentando assim o coeficiente volumétrico de transferência de massa pelo aumento da área de superfície, logo, em *R. pickettii* TupeA, uma maior oxigenação favoreceu o crescimento celular e acúmulo de P(3HB) no seu citoplasma.

Na mesma tabela pode-se verificar que o peso molecular dos polímeros extraídos se encontra na faixa dos P(3HB) comumente sintetizados por bactérias ~$0.1–2.0 \times 10^6$ (TSUGE, 2016) além de apresentarem baixos índices de polidispersividade (PDI) com valores que pouco

variaram entre si, indicando assim que a distribuição do tamanho das partículas de P(3HB) é homogêneo. Os polímeros de P(3HB), após extraídos (Figura 14) são rígidos e um pouco quebradiços quando secos.

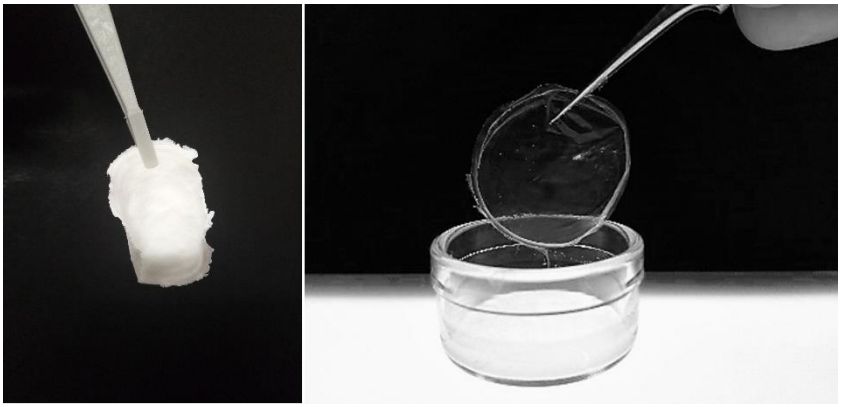


Figura 14. Polímeros de poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)] extraídos e secos

Os compostos lignocelulósicos são considerados uma das maiores reservas de substratos que apresentam potencial para substituir os produtos derivados de petróleo. Além disso, a lignina residual, proveniente principalmente da indústria celulósica, é considerada um dos resíduos industriais mais abundantes que permanece subaproveitado. A descoberta de bactérias capazes de degradar a lignina somada a caracterização de enzimas relacionadas a esse processo trazem benefícios significativos para a valorização da lignina (XU *et al.* 2019). Variantes da lignina comercial (lignina alcalina, lignina dealcalina, lignina solúvel em ácido (LSA), lignina solúvel em base (BSA) e lignina bruta) foram testadas, de forma a verificar se PHA é acumulado em alguma destes substratos na concentração de 0.1%, sendo avaliado também a influência da concentração da solução-traço no crescimento celular e na possível síntese de polímero. A concentração de 0.1%, tanto para as variantes de lignina quanto para os seus derivados foi aplicada, pois, segundo NUMATA e MORISAKI (2015) essa concentração foi considerada apropriada para o crescimento bacteriano sem citotoxicidade significante. Não foi possível detectar PHA em nenhuma das condições aplicadas, porém, verifica-se que maior crescimento bacteriano (Figura 15) ocorreu quando lignina solúvel em ácido foi utilizada como fonte de carbono. Desse teste, ressalta-se a influência visível da concentração de metais no crescimento celular. Quando se adicionou ao meio de cultivo salino 10X de solução-traço e de $MgSO_4$, foi possível ver um melhor desenvolvimento das células para todos as variantes de lignina verificadas.

Lignina alcalina (0.1%) foi adicionada em meios de cultivos onde ocorre a síntese de PHA associadas a outras fontes de carbono como glucose (10 $g.L^{-1}$) para *R. pickettii* e frutose (20 $g.L^{-1}$) para *Cupriavidus necator* (Figura 16).

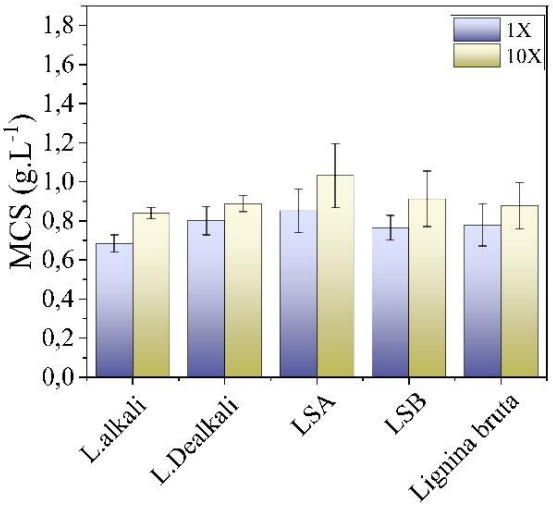


Figura 15. Crescimento celular de *R. pickettii* em meio salino adicionado a variantes da lignina comercial e lignina bruta (0.1%) em diferentes concentrações de metais.

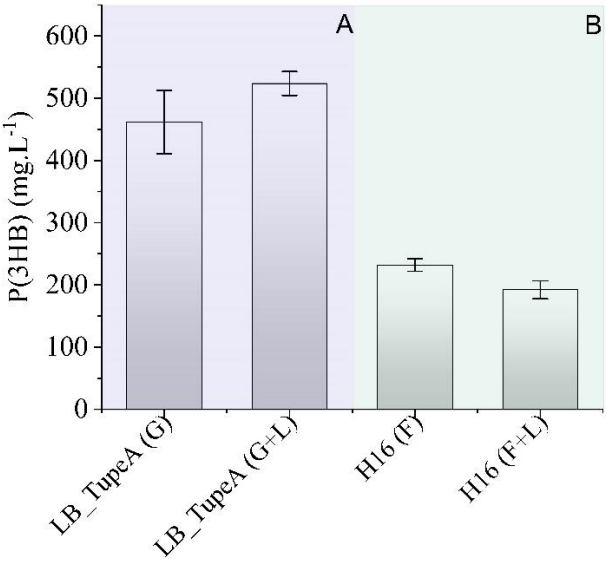


Figura 16. Influência da adição de lignina alcalina (0,1%) no crescimento bacteriano e síntese de PHA. Em *R. pickettii* (30ºC/140 rpm/50mL/A: 36h) e *C. necator H16* (30ºC/140 rpm/50mL/B: 51h) como controle. (G): MMS acrescido de glicose 1%, (G+L): Glicose 1%+ Lignina 0.1%, (F): Frutose 2% e (F+L): Frutose 1%+ Lignina 0.1%.

Para *Ralstonia pickettii* foi possível observar que a adição de lignina (0.1%) teve um efeito levemente positivo no rendimento do polímero sintetizado. Porém, alteração no acúmulo de P(3HB) pôde ser visualizada para a cepa H16 de *C. necator*, sofrendo uma redução quando lignina foi adicionada ao meio.

Lignina alcalina é obtida industrialmente a partir da alcalinização (pH 8-10) da lignina dealcalina e esta é obtida a partir da desulfonação, oxidação, hidrólise e demetilação do lignosulfonato de sódio que é preparado a partir do tratamento com sulfito de sódio de madeira de árvores coníferas, de acordo com especificação do fabricante (TCI Chemicals 2022). Essas variantes da lignina são os representantes comerciais mais próximos da lignina kraft que é obtida através do cozimento kraft convencional com solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio. Através de quebras de grupos aril/alquil, modificação lateral e sucessivas reações de condensação da lignina natural, a lignina kraft é gerada e é o principal resíduo da indústria de papel e celulose resistente a biodegradação (CHAKAR e RAGAUSKAS 2004, CHAI *et al.* 2014). Logo, isolar microrganismos capazes de metabolizar lignina kraft e transformar esse substrato em biopolímeros em escala industrial é uma linha de estudo que merece melhor investigação.

A presença de diversos grupos funcionais na lignina, tem resultado no seu aproveitamento pela indústria como agente quelante para a remoção de metais de efluentes (TOLEDANO *et al.*, 2010). Sob essa perspectiva, levantou-se a hipótese de que a capacidade sequestrante deste composto pudesse levar a uma redução na disponibilidade de metais essenciais para o metabolismo bacteriano e isso poderia ser visualizado através influência da concentração destes no crescimento celular. Estudos como o de GROTHE *et al.* (1999) ressaltam a importância de se testar a influência da concentração de metais-traço na síntese de PHA. Conforme exposto na Figura 15, o aumento da concentração de metais adicionados ao meio teve influência positiva no crescimento bacteriano em *R. pickettii*, corroborando com a hipótese levantada. Ao aumentar a concentração em 10X dos íons metálicos acrescentados no meio salino, pode-se observar um melhor desenvolvimento das células nas variedades de lignina comercial e bruta. Com isso, infere-se que em meios contendo lignina demanda-se acrescentar maior quantidade de íons metálicos de forma que esses sejam biodisponibilizados para as atividades metabólicas essenciais da célula bacteriana. Entretanto, ao avaliar se a adição de lignina em meio mineral contendo glicose (Figura 16) onde, conforme constatado anteriormente, ocorre o acúmulo de PHA, observando a alteração no crescimento bacteriano e na síntese de biopolímeros. Em *R. pickettii*, um ligeiro aumento no rendimento de PHA ocorreu após a adição de lignina ao meio contendo glicose. Essa espécie por ser oriunda de um ambiente com baixo conteúdo salino, como os rios de águas pretas da região, mostrou com isso, possuir uma capacidade de resiliência a pressão imposta ao se adicionar a lignina, podendo indicar que esta, possui capacidade de metabolizar esse substrato. Resultado diferente foi observado para

R. eutropha H16 que foi utilizada como controle, sendo que o rendimento em termos de P(3HB) foi levemente afetado quando lignina alcalina foi adicionada ao meio podendo indicar que fatores como a capacidade complexante da lignina (LIU *et al.*, 2010) podem ter afetado o crescimento e acúmulo de PHA em *C. necator* H16, apesar de que, estudos têm relatado a capacidade de bactérias do gênero *Cupriavidus* sp. em sintetizar PHA a partir de compostos aromáticos (TOMIZAWA *et al.*, 2014; VENKATESWAR *et al.*, 2015).

Ao se analisar a capacidade da cepa *R. pickettii* utilizar derivados de lignina como fonte de carbono para estocar PHA (Tabela 8), foi possível verificar o acúmulo de P(3HB) apenas para alguns derivados como ácido vanílico e gálico quando acrescentados ao meio salino a concentração de 10.0 $g.L^{-1}$. Nenhum acúmulo foi observado utilizando concentrações de 1.0 $g.L^{-1}$. O uso dos derivados de lignina resultou em um menor crescimento celular verificado pelo conteúdo de MCS em comparação com as fontes de carbono tradicionais. Essa mesma influencia foi observada quando as variantes de lignina foram utilizadas, como mostrado anteriormente na Figura 15, sendo que, melhor crescimento celular foi obtido quando derivados da lignina foram utilizados em comparação com as diferentes formas da lignina.

Tabela 8. Resultado do acúmulo de PHA de *R. pickettii* por cultivo em duas etapas com derivados de lignina como única fonte de carbono.

Fonte de carbono*	**Concentração ($g.L^{-1}$)**	**MCS ($g.L^{-1}$)[a]**	**P(3HB) % *m/m*[b]**
Vanílico	10.0	1.747 ± 0.228	0.0596
Siríngico	10.0	1.995 ± 0.207	ND
Gálico	10.0	1.405 ± 0.255	0.0725
Vanílico	1.0	1.495 ± 0.077	ND
Siríngico	1.0	1.423 ± 0.156	ND
Gálico	1.0	1.581 ± 0.067	ND
p-Coumárico	1.0	1.655 ± 0.091	ND
Caféico	1.0	1.658 ± 0.110	ND
Ferúlico	1.0	1.410 ± 0.124	ND
2,5-DHBA	1.0	1.348 ± 0.190	ND
2,4-DHBA	1.0	1.140 ± 0.028	ND
4-HBA	1.0	1.819 ± 0.064	ND

[a]Média ± Desvio padrão das leituras

[b]Determinado por CG-EM

Algumas bactérias têm mostrado capacidade de metabolizar derivados de degradação da lignina como o ácido p-coumárico, caféico, ferúlico, vanílico e sinapínico, sendo estas, por exemplo, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas acidovorans* e *Pandoraea* sp. (KUMAR *et al.*, 2017, LIN *et al.*, 2019, VICUÑA *et al.*, 1987). *R. pickettii* tem sido reportada por possuir a capacidade de degradar compostos aromáticos como 2,4,6-triclorofenol, hidrocarbonetos poliaromáticos (BRUINS *et al.*, 2000, HATTA *et al.*, 2002), benzeno, fenol, catecol, p-nitrobenzoato e 1,2,3-trihidroxi-benzeno (TAO *et al.*, 2004). Para a lignina alcalina e seus derivados, os resultados sugerem uma tolerância limitada de *R. pickettii* LB_TupeA a toxicidade destes compostos aromáticos (WANG *et al.*, 2014). A síntese de P(3HB) por *R. pickettii* LB_TupeA em ácido vanílico e gálico a 10% mostra a habilidade, até então desconhecida, desta cepa em converter derivados de lignina em acetil-CoA, que é o principal precursor da síntese de poli(*R*)-3-hidroxibutirato (REHM *et al.*, 2003). Ácido siríngico e 3,4,5-THBA (ácido gálico) a uma concentração de 10 $g.L^{-1}$ (1%, *m/v*), em outro estudo (TOMIZAWA *et al.*, 2014), além de não favorecer o crescimento celular, ainda resultou em mudanças na leitura da DO_{600} para algumas espécies. Além disso *Delftia acidovorans*, *P. putida* e *P. aeruginosa* foram as únicas espécies em que se observou crescimento celular em ácido vanílico, porém, apenas em *P. aeruginosa* foi detectado o acúmulo de PHA a níveis traço (<1%). Em *R. pickettii* LB_TupeA, em contraste com as espécies mencionadas, apresentou maior crescimento em ácido siríngico (1%) e 4-HBA (0.1%), sem acúmulo de PHA. No estudo de Tomizawa, *R. eutropha* H16 acumulou P(3HB) nos intermediários 3-HBA, 4-HBA, 2,5-DHBA, e 3,4-DHBA, com isso, o maior gargalo no aproveitamento dos derivados de lignina é a conversão destes em seus intermediários (NUMATA e MORISAKI, 2015) o que também foi constatado para *R. pickettii* LB_TupeA.

4.3.4. *Aquitalea* sp. LB_TupeE

O início da fase estacionária de *Aquitalea* sp. em meio rico nutriente (Figura 13.B) ocorreu a partir de ~10h de incubação. Para verificar se houve produção de PHA em meio rico nutriente, as células cultivadas neste meio foram analisadas por CG-EM e constatou-se que nenhum PHA foi acumulado neste meio (Dados não mostrados). A bactéria *Aquitalea* sp. LB_TupeE mostrou capacidade de acumular P(3HB) em meio mineral acrescido de açúcares como glicose, frutose e sacarose (Tabela 9). Nenhum acúmulo de PHA foi detectado quando óleo de soja e lignina alcalina foram adicionados ao meio como única fonte de carbono. A diferença que a aplicação de dois métodos de cultura distintos e a composição do meio mineral fizeram no acúmulo de PHA foi notável. O cultivo em uma etapa, onde as células foram

transferidas para o meio salino após uma única etapa de crescimento em meio nutriente, resultou em um aumento do rendimento do biopolímero em 25x comparado ao cultivo em duas etapas. O acréscimo de ureia como fonte adicional de nitrogênio influenciou no crescimento celular de LB_TupeE, sendo consistente com os resultados obtidos por NG e SUDESH (2016). Ainda com relação aos dados obtidos neste último estudo para *Aquitalea* sp. USM4, o rendimento de P(3HB) obtido quando esta cepa foi cultivada em glicose e sacarose foi de 0.7 e 0.6 $g.L^{-1}$, respectivamente. Quando *Aquitalea* sp. LB_TupeE foi cultivada em meio contendo 0.5 $g.L^{-1}$ de NH_4Cl acrescida da mesma proporção de ureia (0.54 $g.L^{-1}$), verificou-se um rendimento maior praticamente 2x maior em glicose (1.3 $g.L^{-1}$) e sacarose (1.1 $g.L^{-1}$) em comparação com *Aquitalea* sp. USM4. Em suma, *Aquitalea* sp. é uma bactéria que, preferencialmente, acumula PHA enquanto cresce em meio mineral com uma menor razão C/N (CIESIELSKI *et al.*, 2015) e que melhor utiliza ureia como suprimento de nitrogênio.

Tabela 9. Produção de PHA por *Aquitalea* sp. utilizando fontes de carbono não relacionadas entre si sob diferentes condições de cultivo em uma e duas etapas.

Fonte de carbono	**Parâmetros de incubação**	**MCS ($g.L^{-1}$)**	**P(3HB)%[a] *m/m***	**P(3HB) ($mg.L^{-1}$)[c]**	**PM ($g.mol^{-1}$) (PDI)[d]**
Glicose (1%)	Duas etapas[a]	2.22 ± 0.08	2.0±0.18	44.9 ± 4.02	-
Frutose (1%)	Duas etapas[a]	2.33 ± 0.12	2.2±0.32	50.5 ± 10.42	-
Óleo de soja (2%)	Duas etapas[a]	2.28 ± 0.02	ND	ND	-
Lignina (alcalina) (0,1%)	Duas etapas[a]	1.06 ± 0.02	ND	ND	-
Glicose (1%)	Uma etapa[b]	1.97 ± 0.21	53.62 ± 3.32	1324.8 ± 8.19	139×10^3 (1.3)
Sacarose (1%)	Uma etapa[b]	1.90 ± 0.58	47.77 ± 2.93	1060.0 ± 178.0	136×10^3 (1.3)

ND: Não detectado
[a]Meio MS de acordo com TOMIZAWA *et al.* (2014). Volume de amostra: 50 mL/120 rpm/48h
[b]Meio MS de acordo com DOI *et al.* 1995 + elemento-traço de acordo com TOMIZAWA *et al.* (2014)
[c]Determinado por CG-EM
[d]Determinado por CPG

No cultivo em uma etapa, o volume de cultura (250 mL) utilizado mostrou ser um fator que influenciou na aeração e no rendimento de PHA. A manutenção da velocidade de rotação em um volume maior pode resultar em uma menor oxigenação do meio, afetando levemente o

crescimento de massa celular em comparação com o cultivo em duas etapas. A redução do rendimento da biomassa e sua relação com o aumento de PHA acumulado foram observados em estudos como o de GEETHU *et al.* (2019) que mostraram essa relação negativa entre o rendimento do biopolímeros e a aeração quando esta ultrapassa o valor otimizado. Um fator como a inibição do ciclo de Krebs devido à baixa aeração e o redirecionamento do fluxo de acetil-CoA (KESSLER e WITHOLT 2001) para a via metabólica de síntese de PHA pode auxiliar a explicar essa ocorrência. Outro fator a ser ressaltado é o suprimento de fosfato (PO_4^{3-}) que, no processo de fermentação em uma etapa foi reduzido pela metade. Em *Aeromonas* spp. o rendimento na síntese de PHA foi melhorado em condições de deficiência de fósforo em um meio em condições limitantes de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono (MOŻEJKO-CIESIELSKA e POKOJ 2018). Logo, a redução do suprimento de oxigênio e fósforo as células microbianas com consequente aumento do stress nutricional funcionou como estímulo para o acúmulo de PHA em *Aquitalea* sp. LB_TupeE, porém, a influência de todos esses fatores requer maiores investigações.

Quanto ao peso molecular dos P(3HB) extraídos, estes apresentaram valores dentro da faixa para estes polímeros comumente sintetizados pelas bactérias, sendo que, para a cepa LB_TupeE verificou-se que o polímero possui menor peso molecular e PDI ligeiramente menor em comparação com a cepa LB_TupeA.

4.3.5. Composição dos polímeros extraídos – ^{1}H-RMN

A elucidação estrutural de cada um dos polímeros extraídos foi realizada após a extração e purificação deste, seguida da análise por ^{1}H-RMN. Foram extraídos os polímeros dos isolados cultivados em condições com maior acúmulo até então obtidos de *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE. Os espectros são mostrados na Figura 17, junto com as atribuições de deslocamento químico para todas as ressonâncias de prótons. Um dupleto em 1.25 ppm é atribuído ao grupo metil acoplado a um próton, a ressonância do próton metileno a 2.44 a 2.66 ppm foi associada ao próton do metino do carbono assimétrico e um multipleto a 5.25 ppm é atribuído ao metino (DOI *et al.* 1986, JAN *et al.* 1996). Para os dois isolados testados com as fontes de carbono tradicionais, foram identificados no espectro de ^{1}H-RMN o homopolímero poli-(*R*)-3-hidroxibutanoato – P(3HB).

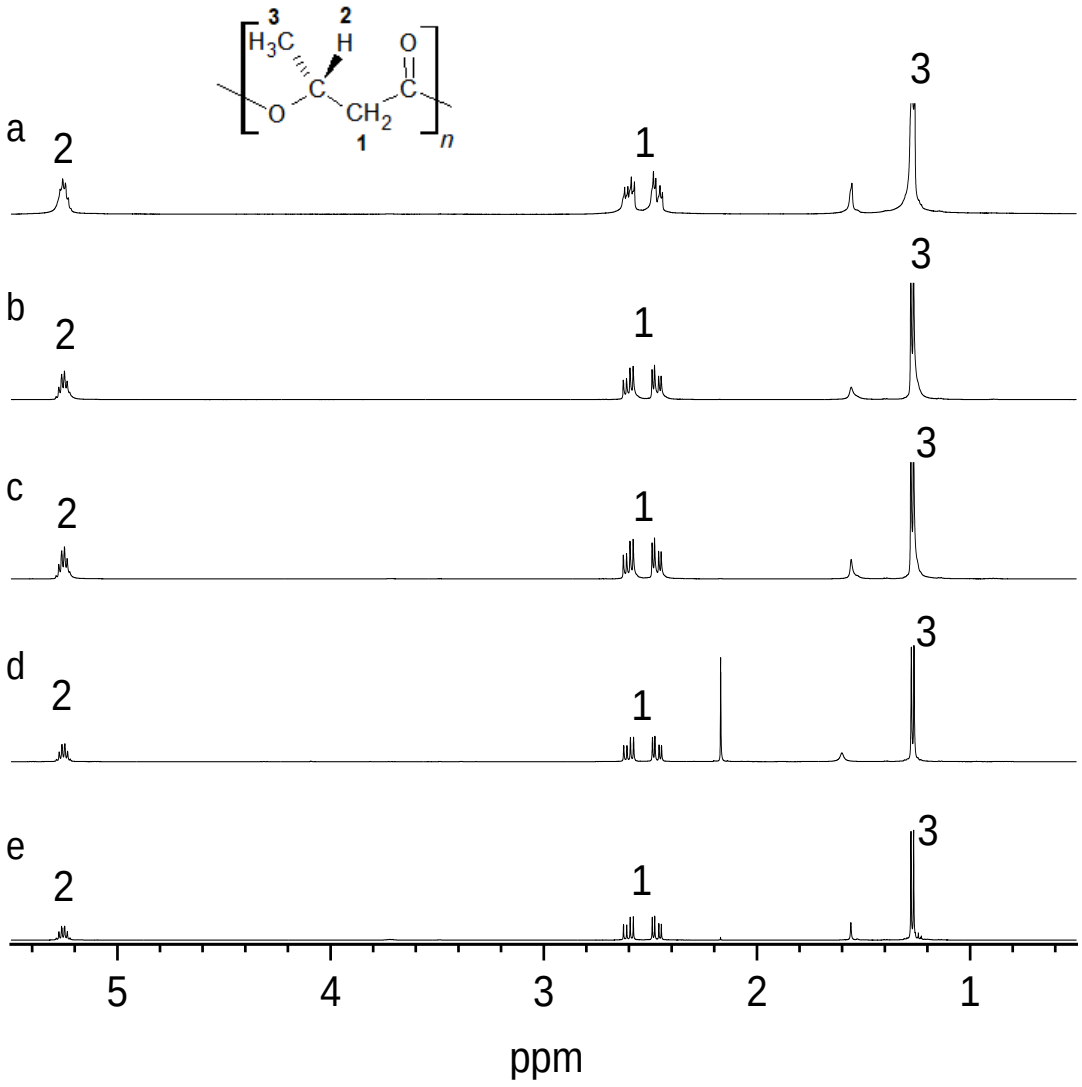


Figura 17. Espectro de ^{1}H-RMN de P(3HB) sintetizado sob condições aeróbicas pelos isolados *R. pickettii*: (a) glicose 1%, (b) frutose 1%, (c) óleo de soja (2%) *Aquitalea* sp.: glicose 1% (d) e sacarose 1% (e). Publicado em (CASTRO *et al.*, 2021).

4.3.6. *Bacillus paramycoides* LB_RP2

4.3.6.1. Perfil de crescimento em meio nutriente

O isolado *B. paramycoides* LB_RP2 foi cultivado em meio rico nutriente e meio LB de forma a comparar o crescimento celular em ambos os meios e determinar o início da fase estacionária em condições aeróbicas (Figura 18). Em meio rico nutriente a DO_{600} a partir de 12 horas de incubação foi o dobro em comparação com o mesmo tempo de cultivo em meio LB. BORAH *et al.* (2002) também observou maior crescimento celular em *B. mycoides* RLJ B-017 quando extrato de carne foi acrescentado ao meio, indicando assim uma maior demanda de fontes de nitrogênio orgânica por parte dessas bactérias pertencentes a este grupo.

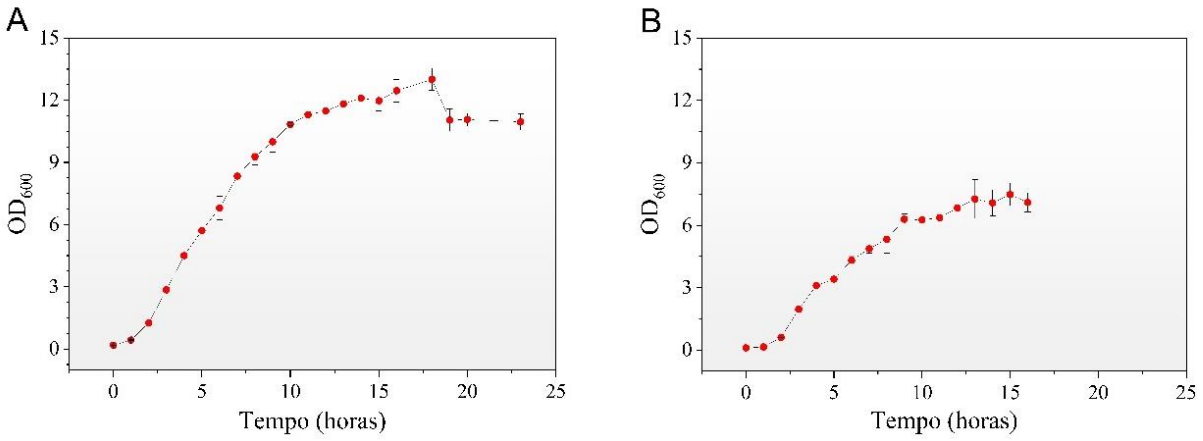


Figura 18. Perfil de crescimento de *B. paramycoides* LB_RP2 em meio rico nutriente (A) e meio LB (B) em condições aeróbicas

4.3.6.2. Síntese de PHA

Primeiramente, *B. paramycoides* LB_RP2 foi cultivada em meio mineral acrescido de glicose 1%, lignina 1% e glicose + lignina 1%, separadamente com o objetivo de verificar se essa cepa acumula o biopoliéster em meio deficiente de nitrogênio (Tabela 10). Ao se constatar um leve maior acúmulo de P(3HB) no meio com lignina em comparação ao meio com glicose, aventou-se a possibilidade de ocorrer acúmulo de PHA durante o cultivo em meio nutriente. A cepa LB_RP$_2$ foi cultivada em meio rico nutriente (NR) e LB (Figura 19) em condições aeróbicas e anaeróbicas por meio da coloração com o corante BODIPY^{TM}. Verificou-se que em ambas as condições aplicadas ocorre a produção de grânulos de PHA, visualizada pela fluorescência característica para esse tipo de acúmulo.

Em condições aeróbicas, *B. paramycoides* LB_RP2 acumulou P(3HB) em meio NR e LB conforme determinado por CG-EM. Após 72 horas de incubação em meio mineral acrescido de glicose 0.1%, lignina alcalina 0.1% e da mistura glicose+lignina 0.1%, esse polímero foi utilizado como reserva de carbono. Isso foi constatado pela diferença observada entre o rendimento de PHA em meio nutriente e em meio mineral (Tabela 10). O rendimento de PHA foi maior em meio rico nutriente (100.1 mg.L^{-1}). Quando o isolado foi transferido para o meio mineral salino, ainda ocorreu o desenvolvimento celular, que é observado pelos valores de MCS após 7 dias de incubação. Logo, quantidades adicionais de carbono e nitrogênio são demandadas por *B. paramycoides* LB_RP2 para crescimento celular associada a síntese de PHA, com o fim de se obter maiores rendimentos deste biopolímero.

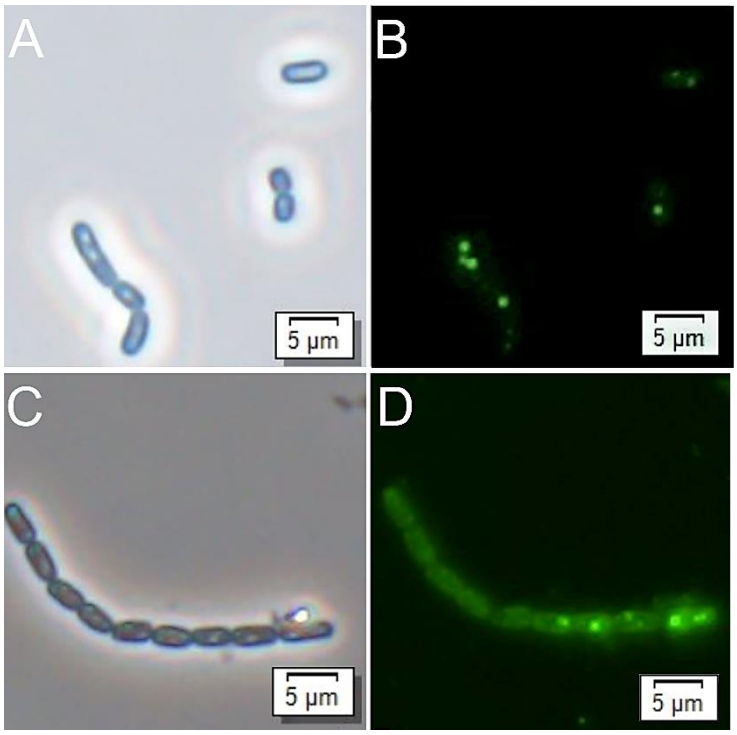


Figura 19. Visualização de *B. paramycoides* cepa LB_RP$_2$ usando o método com corante BODIPY^{TM}. As células foram crescidas em caldo de meio rico nutriente em condições aeróbicas – A e B (16 h/30 °C/120 rpm) e anaeróbicas - C e D (7 dias/30 °C). A esquerda, visualização em microscópio no modo de contraste de fase. À direita em modo de fluorescência com tempo de exposição de 500 ms.

Tabela 10. Conteúdo de P(3HB) (%) em *Bacillus paramycoides* LB_RP2 por massa celular seca (MCS) em diferentes meios nutriente.

Meio de cultura[a]	**MCS (g.L^{-1})**	**% P(3HB)[b]**
NR	1.3 ± 0.0	7.7 ± 2.8
LB	1.1 ± 0.1	6.2 ± 0.8
$MS_{Gli\ 0.1\%}$	2.80	1.2
$MS_{Gli + Lig\ 0.1\%}$	2.90	2.9
$MS_{Lig\ 0.1\%}$	2.89	1.7

[a]NR: Meio rico nutriente; LB: Luria Bertani; MS: Meio mineral salino (TOMIZAWA *et al.* 2014).

[b]Determinado por CG-EM

Biopolímeros produzidos por bactérias Gram positivas possuem a vantagem de, ao ser extraídos da biomassa, não possuírem endotoxinas como os lipossacarídeos (LPS) que precisam ser co-purificadas juntamente com o polímero. Esses componentes da membrana celular bacteriana podem ser eliminados do polímero tratando as células com surfactantes aniônicos e solventes apolares como éter dietílico antes do processo de extração (VALLAPIL *et al.*, 2007),

o que acrescenta etapas no processo de purificação e agrega mais valor ao produto obtido. Uma gama de linhagens de *B. cereus* e outras pertencentes a este grupo têm sido identificadas como acumuladoras de PHA utilizando diversos substratos como fonte de carbono. Este é o primeiro relato de acúmulo de PHA em *B. paramycoides* publicado (CASTRO *et al.*, 2021). O crescimento celular atingiu seu máximo após 18 horas de incubação e começou a reduzir gradativamente. Estudos mostraram que a síntese de PHA em *B. cereus* (KOMINEK e HALVORSON, 1965) inicia no final da fase logarítmica e, em *B. mycoides* (BORAH *et al.*, 2002) começa no início do crescimento e continua até a fase exponencial tardia, logo, a determinação do conteúdo de P(3HB) na cepa LB_RP2 foi feita nas células cultivadas por 16 horas, final da fase logarítmica em meio NR.

Em meio mineral acrescido de NH_4Cl pode ter influenciado positivamente o crescimento celular em LB_RP2, afetando, porém, a síntese de PHA, conforme observado também por BORAH *et al.* (2002). A adição de uma fonte de nitrogênio orgânica como extrato de carne e de levedura também tem sido mostrado influenciar positivamente o desenvolvimento bacteriano e o acúmulo de PHA (LEE e CHANG 1995, PILLAI *et al.*, 2017). Logo, ressalta-se a importância de se fazer a otimização do processo de fermentação para cada espécie produtora de PHA com o objetivo de se determinar as condições que irão favorecer, em conjunto, o crescimento da biomassa e acúmulo de biopoliéster, o que se propõe para estudos futuros com *B. paramycoides*.

4.4. Análise genômica: Vias metabólicas canônicas para a síntese de PHA

4.4.1. *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE

Todos os genes das principais vias metabólicas de síntese de PHAs foram identificados nos genomas anotados de *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE e vias metabólicas putativas para a produção de scl-mcl-PHAs nestes isolados estão ilustradas nas Figuras 20 e 21/ Tabela 11. A síntese de P(3HB) a partir de glicose ocorre, primeiramente, com a degradação desse substrato através da via metabólica Entner-Doudoroff (ED) ou glicólise (Embden–Meyerhof–Parnas (EMP)) resultando na formação de piruvato (VALLAPIL *et al.*, 2007), que é posteriormente convertido em acetil-CoA. A via de degradação de ácidos graxos (β-Oxidação) *fad*ABDE também é responsável pela liberação de acetil-CoA, que é o principal substrato para a síntese de (*R*)-3-hidroxibutanoil-CoA via a atuação das enzimas expressas pelos genes que residem no operon *phaABC*. Este operon expressa as enzimas β-cetotiolase (PhaA) que converte duas unidades de acetil-CoA em acetoacetil-CoA, acetoacetil-coenzima A (CoA) redutase

(PhaB) que reduz este último a (*R*)-3-hidroxibutanoil-CoA que é polimerizado em poli-(*R*)-3-hidroxibutirato pela PHA sintase (PhaC) (CHEN 2010a, POHLMANN *et al.*, 2006).

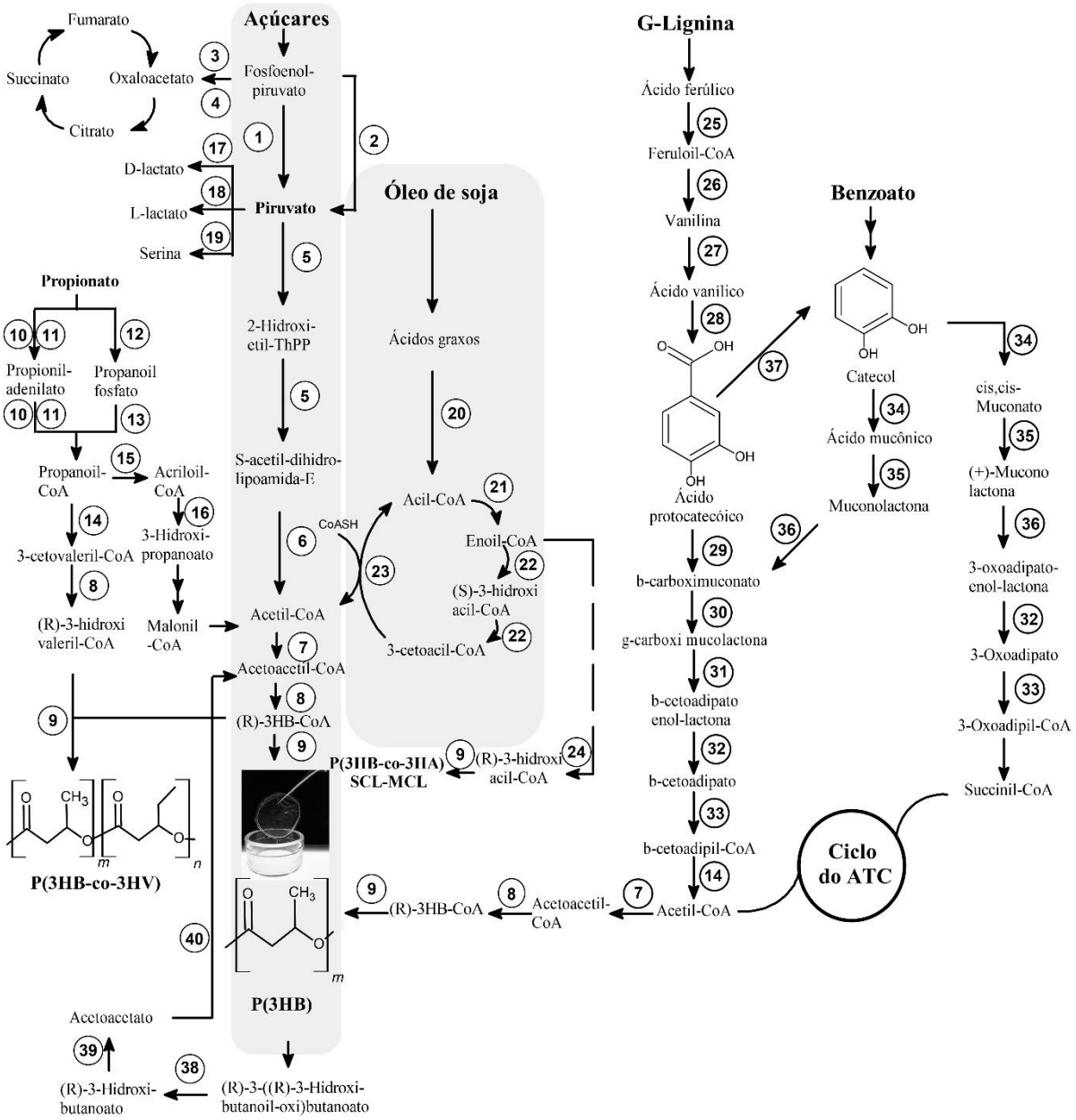


Figura 20. Mapeamento das vias metabólicas de *R. pickettii* LB_TupeA relacionadas a síntese de PHA montado a partir dos genes anotados no genoma. Em cinza estão destacadas as vias metabólicas que foram testadas que efetivamente produziram PHA. Os números indicam a posição relativa das enzimas na via metabólica e estão detalhadas na Tabela 11. As setas indicam a direção que os intermediários devem seguir para produzir PHA.

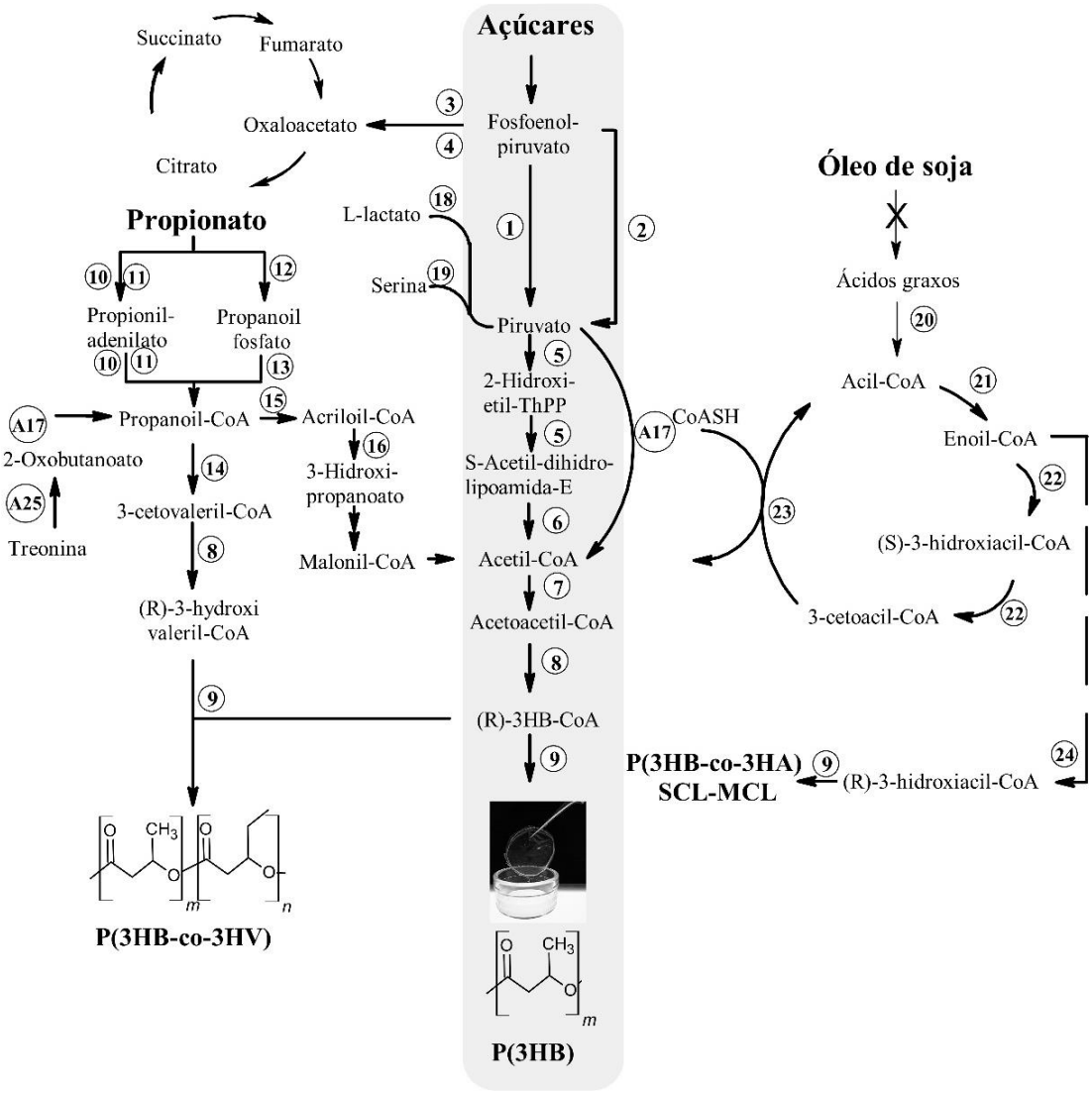


Figura 21. Mapeamento das vias metabólicas de *Aquitalea* LB_TupeE relacionadas a síntese de PHA montado a partir dos genes anotados no genoma. Em cinza estão destacadas as vias metabólicas que foram testadas que efetivamente produziram PHA. Os números indicam a posição relativa das enzimas na via metabólica e estão detalhadas na Tabela 11. As setas indicam a direção que os intermediários devem seguir para produzir PHA.

Tabela 11. Anotação do genoma para enzimas relacionadas à biossíntese de PHA por *Ralstonia pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE

Nº	Enzima	Espécie	Código KEGG	Referências
1	Fosfoenolpiruvato sintase	(R)/(A)	EC 2.7.9.2	BECKERS *et al.*, 2016
2	Piruvato kinase	(R)/(A)	EC 2.7.1.40	
3	Fosfoenolpiruvato carboxilase	(R)/(A)	EC 4.1.1.31	
4	Fosfoenolpiruvato carboxikinase [GTP]	(R)/(A)	EC 4.1.1.32	
5	Componente E1 de piruvato desidrogenase	(R)/(A)	EC 1.2.4.1	
6	Diidrolipoamida acetiltransferase, componente do complexo piruvato desidrogenase	(R)/(A)	EC 2.3.1.12	
7	Acetil-CoA acetiltransferase, PhaA	(R)/(A)	EC 2.3.1.9	CHEN 2010a
8	Acetoacetil-CoA redutase, PhaB	(R)/(A)	EC 1.1.1.36	
9	Ácido polihidroxialcanóico sintase, PhaC	(R)/(A)	EC:2.3.1.-	
10	Acetil-CoA sintetase / acetato - CoA ligase	(R)/(A)	EC 6.2.1.1	HAN *et al.*, 2013
11	Propionato - CoA ligase	(R)/(A)	EC 6.2.1.17	

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 11

12	Acetato quinase	(R)/(A)	EC 2.7.2.1	HAN *et al.*, 2013
13	Fosfato acetiltransferase	(R)/(A)	EC 2.3.1.8	
14	Beta-cetotiolase, BktB	(R)/(A)	EC 2.3.1.16	
15	Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia curta, FadE	(R)/(A)	EC 1.3.8.1	
16	Enoil-CoA hidratase, FadB	(R)/(A)	EC 4.2.1.17	
17	D-Lactato desidrogenase, dependente do citocromo c	(R)	EC 1.1.2.4	TAGUCHI *et al.*, 2008
A17	Piruvato formato-liase	(A)	EC 2.3.1.54	LI *et al.*, 2017
18	Complexo previsto de L-lactato desidrogenase, LutAB	(R)/(A)	EC 1.1.2.3 / 1.1.1.27	TAGUCHI *et al.*, 2008
19	Serina desaminase	(R)/(A)	EC 4.3.1.19	ZHANG *et al.*, 2014
20	Acil-CoA sintetase, FadD	(R)/(A)	EC 6.2.1.3	LU *et al.*, 2009; POBLETE-CASTRO *et al.*, 2012
21	Acil-CoA desidrogenase, específica de cadeia curta, FadE	(R)/(A)	EC 1.3.8.1	
22	Enoil-CoA hidratase, FadB, Pha J	(R)/(A)	EC 4.2.1.17	
23	Acetil-CoA C-aciltransferase, FadA	(R)/(A)	EC 2.3.1.16/ EC 2.3.1.9	
24	Enoil-CoA hidratase 2 (MaoC)	(R)/(A)	EC 4.2.1.119	
25	Transferuloil-CoA sintase, FCS	(R)	EC 6.2.1.34	TOMIZAWA *et al.*, 2014; NUMATA e MORISAKI 2015; ZHOU *et al.*, 2020;
A25	Treonina desidratase biossintética	(A)	EC 4.3.1.19	
26	Enoil-CoA hidratase / aldolase, ECH / A	(R)	EC 4.1.2.61	
27	Provável proteína vanilina desidrogenase oxidoredutase, VDH	(R)	EC 1.2.1.67	
28	Subunidade de vanilato O-desmetilase oxigenase, VanA	(R)	EC 1.14.13.82	
29	Cadeia alfa da protocatecuato de 3,4-dioxigenase, PcaHG	(R)	EC 1.13.11.3	
30	3-carboxi-cis, cis-muconato cicloisomerase, PcaB	(R)	EC 5.5.1.2	
31	4-carboximuconolactona descarboxilase, PcaC	(R)	EC 4.1.1.44	
32	Beta-cetoadipato enol-lactona hidrolase, PcaD	(R)	EC 3.1.1.24	
33	3-oxoadipato CoA-transferase subunidade A, PcaI	(R)	EC 2.8.3.6	
34	Catecol 1,2-dioxigenase, CatA	(R)	EC 1.13.11.1	
35	Muconato cicloisomerase, CatB	(R)	EC 5.5.1.1	
36	Muconolactona isomerase, CatC	(R)	EC 5.3.3.4	
37	4-hidroxi-3-poliprenilbenzoato descarboxilase, AroY	(R)	EC 4.1.1.98	
38	Poli (3-hidroxibutirato) depolimerase, PhaZ	(R)	EC 3.1.1.75	POHLMANN *et al.*, 2006
39	D (-) - 3-hidroxibutirato oligômero hidrolase	(R)	EC 3.1.1.22	
40	3-hidroxibutirato desidrogenase	(R)	EC 1.1.1.30	

(R)/(A) Enzimas anotadas no genoma de *R. pickettii* LB_TupeA (R) e *Aquitalea* sp. LB_TupeE (A)

Em condições de cultivo rico em nutrientes, os níveis de coenzima A (CoA) aumentam, pois ocorre o aumento da demanda por grupos acetil pelo ciclo de Krebs, resultando em um efeito inibitório da enzima β-cetotiolase (OEDING e SCHLEGEL 1973). Porém, em condições

de escassez de nutriente e alta razão C:N, a qual foi submetida *R. pickettii* LB_TupeA, duas enzimas do ciclo de Krebs, citrato sintase e isocitrato desidrogenase são inibidas, levando ao bloqueio deste ciclo e resultando no acúmulo de acetil-CoA. Com isso, ocorre a ativação da β-cetotiolase e a via é encaminhada na direção da biossíntese de P(3HB) (CAI *et al.*, 2009)

Quanto a síntese de P(3HB) por *R. pickettii* LB_TupeA, quando óleo de soja foi utilizado como fonte de carbono, é iniciada pela conversão dos triacilgliceróis em ácidos graxos. HEMACHANDER e PUVANAKRISHNAN (2000) relataram uma lipase expressa por *Ralstonia pickettii* com alta eficiência na hidrólise de triacilgliceróis. Como esperado, uma ORF com uma sequência idêntica à lipase de triacilglicerol EstA (WP_012761525.1) foi anotada no genoma da cepa LB_TupeA. Uma vez hidrolisado por lipases, os triglicerídeos de óleo de soja liberam ácidos graxos C16 e C18, que são posteriormente metabolizados pela via de β-oxidação dentro das células (KAHAR *et al.*, 2004). Assim, os resultados obtidos para a produção de PHA por esta cepa, ao crescer na presença de óleo de soja como única fonte de carbono (Tabela 7), é corroborada pelos dados genéticos. O metabolismo de suporte de *R. pickettii* LB_TupeA para a síntese de PHA apresenta duas diferenças significativas em relação a *Aquitalea* sp. LB_TupeE. Não há fortes evidências que dão suporte a existência de um open reading frame (ORF) de piruvato formato-liase (PFL) e da enzima de ativação da piruvato formato-liase (PFL-AE) no genoma da cepa LB_TupeA. A análise consistiu em três anotações do genoma, configurando como "consulta" as sequências disponíveis para as duas enzimas no banco de dados de proteínas do NCBI (para *Ralstonia* spp., *Pseudomonas* spp. e *Burkholderia* spp.). Uma pesquisa baseada em homologia foi realizada usando um banco de dados gerado com sequências de proteínas previstas, mapeamento para o genoma de LB_TupeA e emprego do software BLAST de proteínas (dados não mostrados) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Apesar da existência de vias que catalisam a conversão de ácidos graxos em scl-PHA, a (*R*)-3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase (PhaG), uma enzima chave na ligação entre a via de biossíntese de ácidos graxos *de Novo* e a de síntese de PHA (SUDESH *et al.*, 2000), não foi encontrada nos dois genomas estudados (LB_TupeA e LB_TupeE), utilizando a mesma abordagem aplicada na busca por PFL e PFL-AE.

Polihidroxialcanoatos não foram detectados quando, na fermentação em duas fases, óleo de soja e lignina foram utilizados como fonte de carbono para *Aquitalea* sp. LB_TupeE. Por meio da análise genômica, nenhuma evidência foi encontrada da presença de genes que expressam lipase extracelular nesta cepa e essa evidência também foi confirmada para outra cepa de *Aquitalea* sp. USM4 (NG e SUDESH 2016). No entanto, constatou-se na via metabólica de *Aquitalea* sp. LB_TupeE a presença de genes que metabolizam ácidos graxos e sintetizam

PHA, sendo isto confirmado experimentalmente por *Aquitalea* sp. USM4 que sintetizou P(3HB-co-3HV) a partir de sais de ácidos graxos com número de cadeia ímpar como valerato de sódio e heptanoato de sódio como fonte de carbono.

A conversão de ácidos graxos em PHA não só pode ocorrer pela liberação de acetil-CoA no ciclo da β-Oxidação, como também (*R*)-3-hidroxiacil-CoA podem ser gerados pela ação das enzimas enoil-CoA-hidratase (fadB) e (*R*)-3-hidroxiacil-CoA hidrolase (MaoC). A atuação da acetil-CoA C-aciltransferase (FadA) na 3-cetoacil-CoA libera acetil-CoA que é incorporada na via PhaABC formando P(3HB) (LU *et al.* 2009). Para a produção de PHA contendo monômeros que não seja o 3-hidroxibutirato, outros substratos precisam ser adicionados ao meio, já que a maioria dos ácidos graxos serão beta-oxidados a acetil-CoA que será aproveitado em outras vias metabólicas biossintéticas que não a de síntese de PHA (CHEN e JIANG 2017).

Duas potenciais vias metabólicas de *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE que fornecem monômeros para síntese de PHA devem ser destacadas. Entre elas estão as vias metabólicas que geram propionil-CoA, como o catabolismo da treonina e do propanoato. A via de degradação do propionil-CoA libera os monômeros (*R*)-3-hidroxivaleril-CoA (3HV-CoA) e permite que as bactérias produzam poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) P(3HB-co-3HV) (LU *et al.*, 2009). No genoma da cepa LB_TupeE, destaca-se a presença da enzima piruvato formato-liase (EC 2.3.1.54), uma importante enzima presente no metabolismo de bactérias anaeróbias facultativas quando expostas a condições limitantes de oxigênio (BUIS *et al.* 2005). A piruvato formato-liase é ativada na fase pós-traducional através da enzima de ativação de piruvato formato-liase (EC 1.97.1.4) e ambas as enzimas foram mapeadas no genoma de *Aquitalea* sp. LB_TupeE (Figura 21). Este achado ajuda a explicar o desempenho desta cepa durante o processo de fermentação em uma fase com suprimento de oxigênio reduzido.

Ambos os isolados possuem arsenal genético para metabolizar compostos aromáticos. *Aquitalea* sp. possui potencial para degradar tirosina e compostos aromáticos pela via do homogentisato ou pequenos compostos aromáticos derivados da lignina através da via dependente de protocatecuato 4,5-dioxigenase para catabolismo do ácido protocatecuico. *Ralstonia pickettii* LB_TupeA tem um arsenal genético para metabolizar a lignina e alguns de seus derivados. Pelo menos três vias completas foram encontradas em seu genoma. A primeira é a via não-dependente de β-oxidação de CoA de ácido ferúlico para ácido vanílico. O caminho do ácido vanílico ao ácido protocatecuico é catalisada pela subunidade da vanilato O-demetilase oxigenase VanA (EC 1.14.13.82). Segundo TOMIZAWA *et al.* (2014), o 3,4,5-THBA (ácido

gálico), derivado do ácido sinapínico, é incorporado na via metabólica que lisa o anel aromático, a mesma que processa o 3,4-DHBA (ácido protocatecuico). A degradação do protocatecuato segue duas vias metabólicas diferentes. O protocatecuato é catabolizado a β-cetoadipil-CoA na via do β-cetoadipato através de enzimas do operon pca (PcaHGBCDIJ) ou operon cat (CatABC) (KUKOR *et al.*, 1988; GUO *et al.*, 1999). A ligação entre o β-cetoadipato e a síntese de PHA pode ser realizada através da acetil-CoA C-aciltransferase BktB (EC 2.1.1.16). Esta enzima cataboliza β-cetoadipil-CoA, liberando succinil-CoA e acetil-CoA (XU *et al.*, 2019) que é o principal precursor para a síntese de P(3HB), que foi sintetizado por *R. pickettii* LB_TupeA quando cultivada em meio mineral contendo ácido gálico e ácido vanílico 10 $g.L^{-1}$.

4.4.2. *B. paramycoides* LB_RP2

Genes associados as vias metabólicas Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), também conhecida como glicólise e da via pentose-fosfato, que também pode ser utilizada para o metabolismo da glicose (ALVES *et al.* 2017), foram encontrados no genoma anotado de *B. paramycoides* LB_RP2. A via da pentose-fosfato possibilita também que a espécie efetue o metabolismo de substratos como a xilose e outras pentoses (SIRACUSA e BLANCO 2020). Cluster de genes da via de biossíntese de poli-(*R*)-3-hidroxibutirato [P(3HB)] e poli-(*R*)-3-hidroxibutirato-3-hidroxivalerato [P(3HB-co-3HV)], PhaA, PhaP, PhaQ, PhaR, PhaB, e PhaC, foram identificados no genoma. A enzima PhaC, com sua subunidade PhaR, é classificada como uma PHA sintase de classe IV e possui especificidade de substrato para unidades de 3-hidroxiacil-CoA, o que leva a uma síntese de PHAs de cadeia curta, conforme foi identificado nesta cepa quando cultivada em meio nutriente (TOMIZAWA *et al.*, 2011). A montagem da via de síntese de PHA (Figura 22) para *B. paramycoides* LB_RP2 com base nos genes anotados, comparação com o banco de dados da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) em conjunto com referências adicionais permitiu inferir sobre o potencial desta cepa para acumular polihidroxialcanoatos usando fontes de carbono relacionadas e não relacionadas como açúcares, ácidos carboxílicos e graxos. Tanto a formação de piruvato pela via de glicosilação quanto a atividade da acetil-CoA C-aciltransferase (FadA) na síntese de um acil-CoA graxo liberam acetil-CoA, que é um precursor de 3-hidroxibutanoil-CoA. Além disso, o monômero (*R*) -3-hidroxi pode ser fornecido por meio da hidratação de crotonil-CoA pela atividade da enoil coenzima A hidrase.

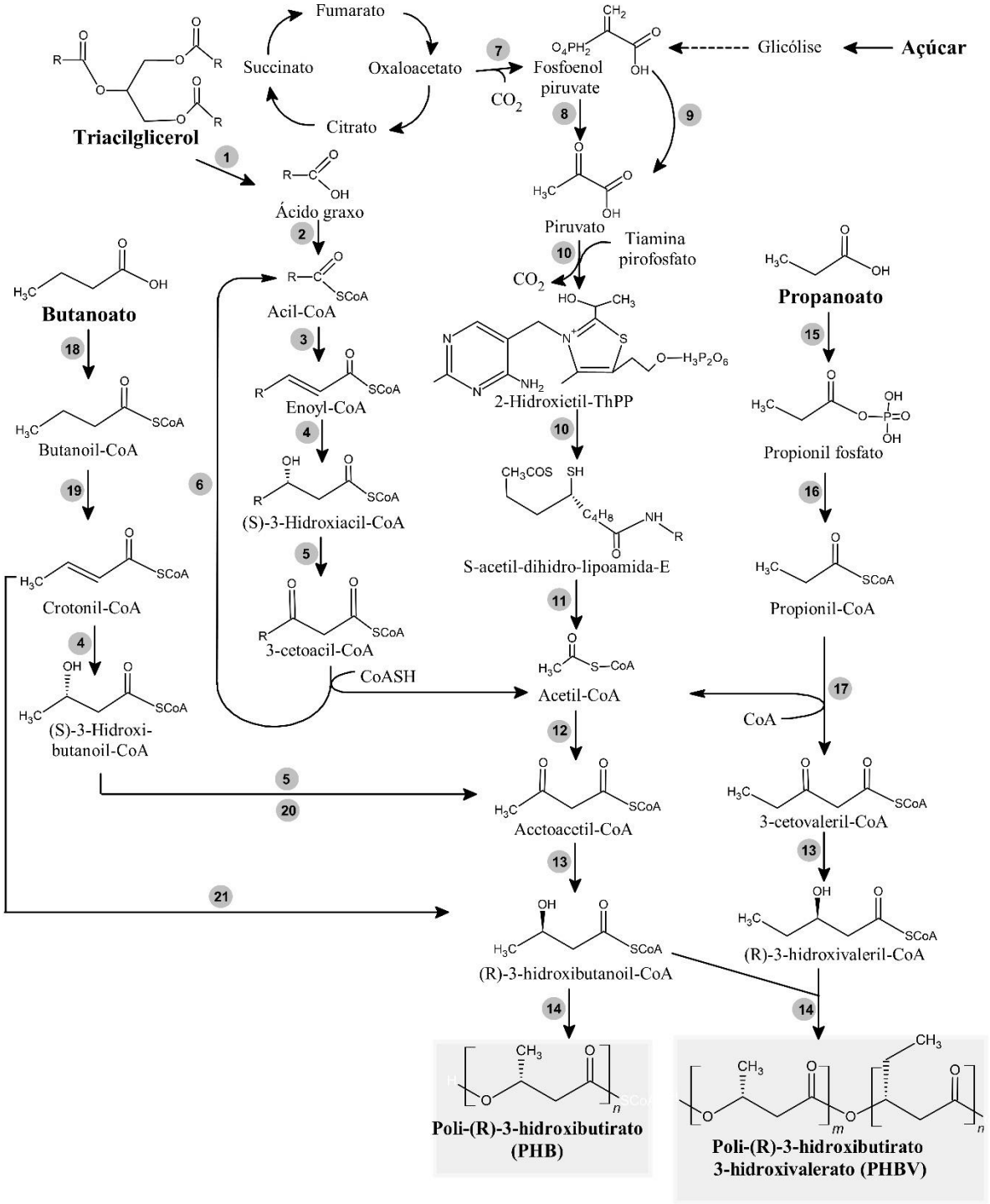


Figura 22. Vias metabólicas para a síntese de PHA propostas a partir dos genes anotados no genoma de *B. paramycoides* LB_RP2 e baseado no banco de dados do KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Os números indicam a posição relativa das enzimas na via metabólica e estão detalhadas na Tabela 12.

Tabela 12. Enzimas relacionadas a biossíntese de PHA pertencentes ao genoma anotado de *B. paramycoides* LB_RP2

No.	Enzima	KEGG	Referências
1	Triacilglicerol lipase	EC 3.1.1.3	
2	Ácido graxo de cadeia longa---CoA ligase, FadD	EC 6.2.1.3	
3	Acil-CoA de cadeia longa dehidrogenase [fadN-fadA-fadE operon]	EC 1.3.8.8	
4	Enoil-CoA hidratase, FadB	EC 4.2.1.17	LU *et al.*, (2009)
5	3-hidroxiacil-CoA dehidrogenase [fadN-fadA-fadE operon]	EC 1.1.1.35	
6	Acetil-CoA C-aciltransferase, FadA	EC 2.3.1.16 EC 2.3.1.9	
7	Fosfoenolpiruvato carboxicinase [ATP]	EC 4.1.1.49	
8	Piruvato cinase	EC 2.7.1.40	
9	Fosfoenolpiruvato sintase	EC 2.7.9.2	BUIS e BRODERICK 2005
10	Piruvato dehidrogenase E1 subunidade da componente alfa e beta	EC 1.2.4.1	
11	Dihidrolipoamida acetiltransferase componente do complexo piruvato dehidrogenase	EC 2.3.1.12	
12	Acetoacetil-CoA tiolase, PhaA	EC 2.3.1.9	CHEN 2010a; MCCOOL e CANNON 2001
13	Acetoacetil-CoA redutase, PhaB	EC 1.1.1.36	
14	Polihidroxialcanoato sintase, PhaC + Repressor da síntese de polihidroxialcanoato, PhaR	EC:2.3.1.-	
15	Acetato quinase	EC 2.7.2.1	HAN *et al.*, 2013
16	Fosfato acetiltransferase	EC 2.3.1.8	
17	Betacetotiolase, BktB	EC 2.3.1.16	
18	Acil-CoA:acetato CoA-transferase, subunidade alfa e beta	EC 2.8.3.8	
19	Acil-CoA dehidrogenase, específico para cadeia curta	EC 1.3.8.1	LU *et al.*, 2009
20	3-hidroxibutiril-CoA dehidrogenase	EC 1.1.1.157	
21	Enoil coenzima A hidratase	EC 4.2.1.55	

Por meio da atuação das enzimas acil-CoA:acetato CoA-transferase e acil-CoA dehidrogenase sais de butanoato são convertidos em crotonil-CoA que, por meio da ação da enoil-CoA hidratase (MADISON *et al.*, 1999), monômeros de (*R*)-3-hidroxibutanoil-CoA são formados. Enzimas putativas, como a acetato quinase e fosfato acetiltransferase, permitem a conversão de propanoato em propionil-CoA, que é o precursor do substrato (*R*)-3-hidroxivaleril-CoA e pode ser polimerizado em um P(3HB-co-3HV) copolímero quando esta bactéria é alimentada com uma mistura de açúcar e propionato (TOMIZAWA *et al.*, 2011). Propanoato e butirato são os principais componentes dos ácidos graxos voláteis (AGV), e são considerados substratos preferíveis para a síntese de PHA, uma vez que podem ser fornecidos

ao sistema por fermentação anaeróbia e posteriormente usados em condições aeróbias (BENGTSSON *et al.*, 2008). Todos esses fatores tornam o *B. paramycoides* um candidato promissor para a produção de PHA a partir de resíduos, como lodo ativado de estações de tratamento de águas residuais.

Genes que expressam enzimas de importância industrial (SCHALLMEY *et al.*, 2004) foram anotados em *B. paramycoides* LB_RP2. Entre eles estão: superóxido dismutase, alfa & beta glucosidase, β-galactosidase, lipase, chaperoninas de secreção de proteínas (CsaA), peptidases de sinal, pullulanase e amilases, confirmando assim a versatilidade biotecnológica desse organismo com potencial aplicação industrial.

4.5. Polihidroxialcanoato sintases: PCR e categorização

Polihidroxialcanoato sintase (PhaC) é a enzima-chave para a síntese dos biopoliésteres pois catalisa a conversão de unidades (*R*)-3-hidroxiacil-CoA em PHA liberando unidades CoA (TAI *et al.*, 2016). A amplificação de um fragmento do gene *phaC* é uma alternativa que permite selecionar potenciais bactérias produtoras de PHA e também conhecer a especificidade de substrato de cada bactéria selecionada com antecipação. Os primers degenerados G-D e G-1R que amplificam fragmentos de genes de phaC classe I e II foram desenhados e validados em amostras ambientais (ROMO *et al.*, 2007) e as sequências determinadas foram comparadas com as sequências de aminoácidos depositadas no GenBank (NCBI) por meio do software BLASTx®.

Estes primers possibilitaram a amplificação (Figura 23) de um fragmento de 552 pb e 546 pb presentes nos genomas de *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE, respectivamente. A cepa IT6, referente a *G. polyisoprenivorans*, não possui genes relacionados as vias metabólicas de síntese de PHA, como o *phaA*, *phaB* e *phaC* (ANDLER *et al.* 2019), logo, confirmou-se essa ausência através deste experimento. A cepa *B. paramycoides* LB_RP2, conforme foi comprovado, é uma bactéria acumuladora de P(3HB), porém, não amplificou utilizando os primers selecionados, indicando que o gene *phaC* desta cepa é de outra classe, o que será confirmado posteriormente com a análise genômica. A sequência de LB_TupeA exibiu uma similaridade de 99.41% com sequência de poli-ácido-(*R*)-hidroxialcanóico sintase de classe I de *R. pickettii* (Número de acesso WP_154206885.1) e a de LB_TupeE apresentou uma similaridade de 97.60% com alfa/beta hidrolase de *Aquitalea sp* .USM4 (WP_131359719.1).

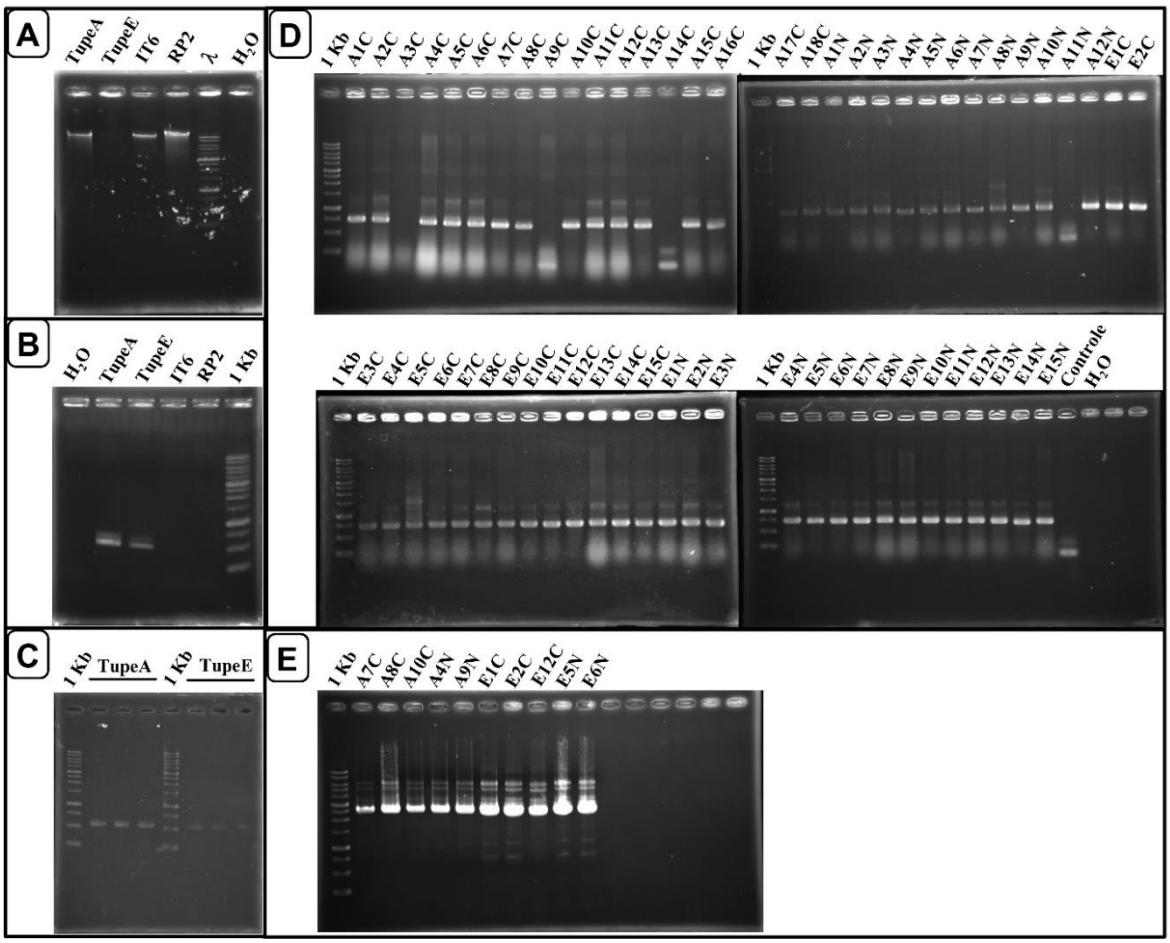


Figura 23. Amplificação e clonagem do fragmento do gene *phaC* para posterior sequenciamento. A) DNA genômico dos isolados a serem testados, B) Amplificação do gene por PCR utilizando os primers degenerados G-D e G-1R, C) Amplificação do gene em maior volume para posterior amplificação por clonagem, D) PCR das colônias transformantes de *E. coli* DH5α contendo o vetor pGEM-T Easy ligado ao fragmento amplificado e, E) Extração do DNA plasmidial das colônias selecionadas.

A identificação da presença de genes que codificam PHA sintases por meio da amplificação de uma sequência destes genes é uma alternativa, além dos métodos tradicionais que envolvem o uso de corantes, que possibilita selecionar bactérias com potencial para acumular PHA.

As polihidroxialcanoatos sintases são divididas em quatro classes com base na sua estrutura primária, especificidade dos substratos e identificação de suas subunidades (REHM 2003, TEH *et al.* 2018). As PhaCs de *R. pickettii* LB_TupeA e *Aquitalea* sp. LB_TupeE foram mapeadas no seu genoma. Para categorizar a classe à qual cada PhaC pertence foi realizada a análise filogenética das suas sequências de aminoácidos (Figura 24). Ambos os isolados possuem duas PhaCs mapeadas em seu genoma. Uma forte diversidade existe entre as PhaCs de classe I e II, sendo que os ramos para as classes II, III e IV são bem definidos na reconstrução da história filogenética (FENG e DOOLITTLE 1987). As duas sequências de *R. pickettii*

LB_TupeA e a sequência 1 de *Aquitalea* sp. LB_TupeE foram alocadas no grupo da PhaCs de classe I e uma sequência de *Aquitalea* sp. foi agrupada com *Aquitalea* sp. USM4 (WP_131359710.1) em um ramo separado dentro da classificação das PhaCs de classe II, sendo necessário investir futuramente o quanto essa diferenciação impacta na função desta enzima (CASTRO *et al.*, 2021).

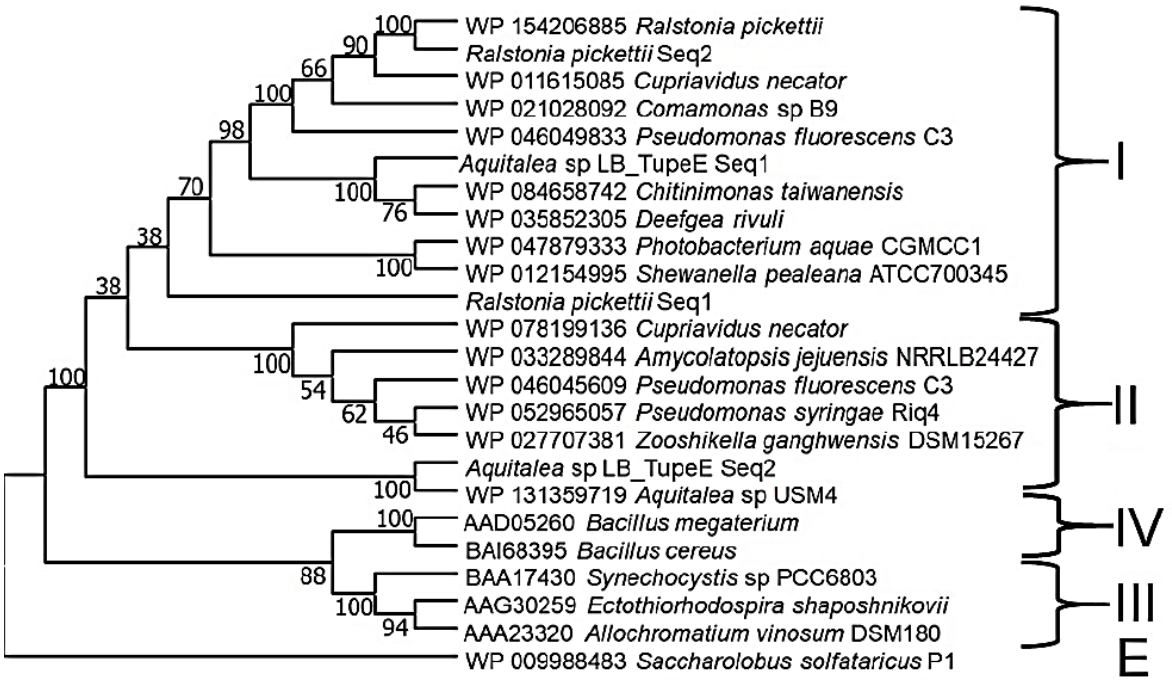


Figura 24. Árvore filogenética da sequência do gene da PHA sintase (*phaC*) de *R. pickettii* e *Aquitalea* sp. e dos táxons relacionados elaborada a partir das sequências de aminoácidos depositadas no GenBank. Os números organizados perto dos nós de ancestralidade comum representam a porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste de bootstrap. As classes PhaC foram destacadas por chaves e os números de cada classe. E - grupo externo. Publicado em (CASTRO *et al.*, 2021).

PhaCs de classe I são geralmente reportadas por suas especificidades por substratos de cadeia curta (C_3-C_5 scl-3HA-CoA), como é o caso da PhaC de *R. eutropha*, porém, exceções a essa regra tem sido reportadas, como é o caso, por exemplo, da PhaC de *Aeromonas caviae* FA440 que é categorizada como sendo de classe I que possui especificidade de substratos de cadeia curta e média (scl-mcl P(3HA)-CoA) (NOMURA e TAGUCHI 2007).

Rios que se originam na planície florestal possuem entre as suas características baixa concentração de sedimentos e alto teor de matéria orgânica, como o rio Negro e alguns de seus tributários (BERNARDES *et al.*, 2004). Esta matéria orgânica é derivada da degradação química, física e biológica da cobertura vegetal resultando em produtos que percolam o solo e/ou são lixiviados para dentro dos cursos d'água. Entre os produtos de degradação distribuídos nas frações finas e grossas do material particulado e na fração dissolvida das águas destes rios,

derivados da degradação da lignina provenientes de plantas vasculares podem ser encontrados e mensurados por meio de indicadores como os fenóis cinamil (C), siringil (S) e vanilil (V), por exemplo (BERNARDES *et al.*, 2004). Baseado nessas características dos rios e lagos de águas negras é que esse estudo propôs um método de seleção de bactérias com potencial para sintetizar PHA em um meio de cultivo mais seletivo que permitisse selecionar espécies com potencial para metabolizar lignina e seus derivados, além das demais fontes de carbono mais utilizadas nestes estudos. Das bactérias selecionadas e identificadas, confirmou-se que *R. pickettii* LB_TupeA possui arsenal metabólico para utilizar derivados de lignina e convertê-los posteriormente em polihidroxialcanoatos.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foram isoladas bactérias capazes de sintetizar polihidroxialcanoatos utilizando diferentes fontes de carbono. Com isso, mostrou-se que a amostragem de bactérias de águas superficiais ricas em matéria orgânica e carente de nutrientes, como o Rio Negro e seus tributários, possibilita a prospecção de microrganismos com o metabolismo adaptado a substratos oxidáveis associado a capacidade de acumular PHA.

- *R. pickettii* LB_TupeA sintetiza P(3HB) utilizando fontes de carbono tradicionais como açúcares e óleos e apresenta potencial a ser explorado para sintetizar PHA a partir de derivados da lignina. Entretanto, confirmou-se que a maior limitação para o aproveitamento da lignina na sua forma residual (lignina kraft) é a conversão desta em seus derivados e seus intermediários;
- *Aquitalea* sp. é uma espécie promissora como biofábrica de biopolímeros, principalmente por acumular estes utilizando diferentes substratos com bons rendimentos em termos de massa celular seca. Soma-se a esses fatores, o cultivo em uma etapa proporcionou significativos maiores rendimentos de acúmulo de P(3HB), demandando assim menos quantidades de nutrientes. Quanto a PHA sintase (PhaC) de *Aquitalea* sp. LB_TupeE foi reportado que esta apresenta uma divergência evolucionária das já conhecidas PhaCs de classe 1 e 2, sendo que, estudos futuros podem ajudar a elucidar suas características catalíticas na síntese de PHAs.
- A análise genômica de espécies pertencentes ao grupo do *Bacillus cereus* foi fundamental para definição taxonômica do *Bacillus paramycoides* LB_RP2 e esse estudo é o primeiro a reportar a síntese de PHA para essa espécie. Perspectivas futuras propostas para *B. paramycoides* incluem a otimização das condições de cultura e adaptação para produção em larga escala desta classe de polímeros.

REFERÊNCIAS

ABID, S.; RAZA, Z.A.; HUSSAIN, T. Production kinetics of polyhydroxyalkanoates by using *Pseudomonas aeruginosa* gamma ray mutant strain EBN-8 cultured on soybean oil. *3 Biotech*, v. 6, n. 142, 2016. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0452-4.

AGNEW, D.E.; PFLEGER, B.F. Synthetic biology strategies for synthesizing polyhydroxyalkanoates from unrelated carbon sources. *Chemical Engineering Science*, v. 103, p. 58–67, 2013. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2012.12.023.

AKIYAMA, M.; TSUGE, T.; DOI, Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, v. 80, n. 1, p. 183–194, 2003. https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00400-7.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

ALVES, M.I.; MACAGNAN, K.L.; RODRIGUES, A.A.; DE ASSIS, D.A.; TORRES, M.M.; DE OLIVEIRA, P.D.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, A.D.S. Poly(3-hydroxybutyrate)-P(3HB): Review of Production Process Technology. *Industrial Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 192–208, 2017. https://doi.org/10.1089/ind.2017.0013.

ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiology Reviews*, v. 54, n. 4, p. 450–472, 1990. https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90313-D.

ANDLER, R.; VIVOD, R.; STEINBÜCHEL, A. Synthesis of polyhydroxyalkanoates through the biodegradation of poly(cis-1,4-isoprene) rubber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 127, n. 3, p. 360–5, 2019. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.08.015.

ANJALI, M.; SUKUMAR, C.; KANAKALAKSHMI, A.; SHANTHI, K. Enhancement of growth and production of polyhydroxyalkanoates by *Bacillus subtilis* from agro-industrial waste as carbon substrates. *Composite Interfaces*, v. 21, n. 2, p. 111–119, 2014. https://doi.org/10.1080/15685543.2013.834200.

AZIZ, R.K.; BARTELS, D.; BEST, A.A.; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R.A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G.J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A.L.; OVERBEEK, R.A.; MCNEIL, L.K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B. … ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, v. 9, n. 75, 2008. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75.

BECKERS, V.; POBLETE-CASTRO, I.; TOMASCH, J.; WITTMANN, C. Integrated analysis of gene expression and metabolic fluxes in PHA-producing *Pseudomonas putida* grown on glycerol. *Microbial Cell Factories*, v. 15, n. 73, 2016. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0470-2.

BENGTSSON, S.; WERKER, A.; CHRISTENSSON, M.; WELANDER, T. Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 3, p. 509–516, 2008. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020.

BERNARDES, M.C.; MARTINELLI, L.A.; KRUSCHE, A.V.; GUDEMAN, J.; MOREIRA, M.; VICTORIA, R.L.; OMETTO, J.P.H.B.; BALLESTER, M.V.R.; AUFDENKAMPE, A.K.; RICHEY, J.E.; HEDGES, J.I. Riverine organic matter composition as a function of land use changes, southwest Amazon. *Ecological Applications*, v. 14, n. 4, 2004. https://doi.org/10.1890/01-6028.

BHALLA, T.C.; KUMAR, V.; BHATIA, S.K. Hydroxy Acids: Production and Applications. *In:* SINGH, R.S.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. (Eds.), *Advances in Industrial Biotechnology*. Issue January, IK International Publishing House Pvt. Ltd., 2011. pp. 56–76.

BOLGER, A.M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170.

BONATTO, D.; MATIAS, F.; LISBÔA, M.P.; BOGDAWA, H.M.; HENRIQUES, J.A.P. Production of short side chain-poly[hydroxyalkanoate] by a newly isolated *Ralstonia pickettii* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 4, p. 395–403, 2004. https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000033063.55133.e1.

BORAH, B.; THAKUR, P.S.; NIGAM, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 4, p. 776–783, 2002. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01590.x.

BORRERO-DE ACUÑA, J.M.; BIELECKA, A.; HÄUSSLER, S.; SCHOBERT, M.; JAHN, M.; WITTMANN, C.; JAHN, D.; POBLETE-CASTRO, I. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial Cell Factories*, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2014. https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-88.

BRAUNEGG, B.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European Journal Of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 6, p. 29–37, 1978. https://doi.org/10.1007/BF00500854.

British Petroleum (BP) Statistical review of world energy, 2020. https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf, Acesso em: 20/12/2021.

BRUINS, M.R.; KAPIL, S.; OEHME, F.W. *Pseudomonas pickettii*: A common soil and groundwater aerobic bacteria with pathogenic and biodegradation properties. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 47, n. 2, p. 105–111, 2000. https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1951.

BUGNICOURT, E.; CINELLI, P.; LAZZERI, A.; ALVAREZ, V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing, and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, v. 8, n. 11, p. 791–808, 2014. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82.

BUIS, J.V.M.; BRODERICK, J.B. Pyruvate formate-lyase activating enzyme: elucidation of a novel mechanism for glycyl radical formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 433, n. 1, p. 288–296, 2005. https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.09.028.

CABALLERO, K.P.; KAREL, S.F.; REGISTER, R.A. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*, v. 17, p. 86–92, 1995. https://doi.org/10.1016/0141-8130(95)93522-y.

CASTRO, L.M.; FOONG, C.P.; HIGUCHI-TAKEUCHI, M.; MORISAKI, K.; LOPES, E.F.; NUMATA, K.; MOTA, A. J. Microbial prospection of an Amazonian blackwater lake and whole-genome sequencing of bacteria capable of polyhydroxyalkanoate synthesis. *Polymer Journal*, v. 53, p. 191-202, 2021. https://doi.org/10.1038/s41428-020-00424-4.

CASTRO, L.M.; FOONG, C.P.; HIGUCHI-TAKEUCHI, M.; LOPES, E.F.; NUMATA, K.; DIAS DA SILVA, S.; NONATO, L.S.; MOTA, A.J.; PEREIRA, J.O. Draft Whole-Genome Sequence of *Bacillus paramycoides* LB_RP2, a Putative Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium Isolated from an Amazonian Blackwater River. *Microbiology Resource Announcements*, v. 10, n. 30, p. 2–4, 2021. https://doi.org/10.1128/mra.00438-21.

CESÁRIO, M.T.; RAPOSO, R.S.; DE ALMEIDA, M.C.M.D.; VAN KEULEN, F.; FERREIRA, B.S.; DA FONSECA, M.M.R. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. *New Biotechnology*, v. 31, n. 1, p. 104–113, 2014. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.10.004.

CHAI, L.Y.; CHEN, Y.H.; TANG, C.J.; YANG, Z.H.; ZHENG, Y.; SHI, Y. Depolymerization and decolorization of kraft lignin by bacterium *Comamonas* sp. B-9. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 4, p. 1907–1912, 2014. https://doi.org/10.1007/s00253-013-5166-5.

CHAIKLIN, M. Ivory in World History – Early Modern Trade in Context. *History Compass*, v. 8, n. 6, p. 530–542, 2010. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1478-0542.2010.00680.x.

CHAKAR, F.S., RAGAUSKAS, A.J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products*, v. 20, n. 2, p. 131–141, 2004. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.016.

CHANPRATEEP, S. *Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates*. *In*: Journal of Bioscience and Bioengineering, The Society for Biotechnology, Japan, v. 110, n. 6, pp. 621–632, 2010. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.07.014.

CHANPRATEEP, S.; KATAKURA, Y.; VISETKOOP, S.; SHIMIZU, H.; KULPREECHA, S.; SHIOYA, S. Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 11, p. 1205–1215, 2008. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0427-5.

CHEE, J.; YOGA, S.; LAU, N.; LING, S.; ABED, R.M.M. Bacterially produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *In*: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex research center, pp. 1395–1404. 2010.

CHEK, M.F.; KIM, S.Y.; MORI, T.; ARSAD, H.; SAMIAN, M.R.; SUDESH, K.; HAKOSHIMA, T. Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2017. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05509-4.

CHEN, G.Q. Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. *In:* Chen, G.Q. *Plastics from bacteria*. Microbiology Monographs: Springer. p. 17–37. 2010a. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_2.

CHEN, G.Q. *Industrial Production of PHA*. vol 14. Springer, Berlin, pp 121-32, 2010b. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_6.

CHEN, G.Q.; KÖNIG, K.H.; LAFFERTY, R.M. Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus Bacillus. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 84, n. 2, p. 173–176, 1991. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04592.x.

CHEN, G.Q.; JIANG, X.R. Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 192–197, 2017. https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.09.001.

CHEN, Y.; CHOU, I.N.; TSAI, Y.H.; WU, H.S. Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in drying treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 130, n. 5, p. 3659–67, 2013. https://doi.org/10.1002/app.39616.

CHOI, J.E.; NA, H.Y.; YANG, T.H.; RHEE, S.K.; SONG, J.K. A lipophilic fluorescent LipidGreen1-based quantification method for high-throughput screening analysis of intracellular poly-3-hydroxybutyrate. *AMB Express*, v. 5, n. 1, 2015. https://doi.org/10.1186/s13568-015-0131-6.

CHUAH, J.A.; TOMIZAWA, S.; YAMADA, M.; TSUGE, T.; DOI, Y.; SUDESH, K.; NUMATA, K. Characterization of site-specific mutations in a short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase: In vivo and in vitro studies of enzymatic activity and substrate specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 12, p. 3813–3821, 2013. https://doi.org/10.1128/AEM.00564-13.

CIESIELSKI, S.; MOZEJKO, J.; PISUTPAISAL, N. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Cleaner Production*, v. 106, p. 408–421, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.09.040.

CORRE, Y.M.; BRUZAUD, S.; AUDIC, J.L.; GROHENS, Y. Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: A comprehensive and comparative study. *Polymer Testing*, v. 31, n. 2, p. 226–235, 2012. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.11.002.

CRUZ, M.V.; ARAÚJO, D.; ALVES, V.D.; FREITAS, F.; REIS, M.A.M. Characterization of medium chain length polyhydroxyalkanoate produced from olive oil deodorizer distillate. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p. 243–248, 2016. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.043.

DE ALMEIDA, A.; GIORDANO, A.M.; NIKEL, P.I.; PETTINARI, M.J. Effects of aeration on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 6, p. 2036–2040, 2010. https://doi.org/10.1128/AEM.02706-09.

DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of Bradyrhizobium strains: Revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 698–710, 2012. https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000200035.

DIGREGORIO, B.E. Biobased Performance Bioplastic: Mirel. *Chemistry and Biology*, v. 16, n. 1, p. 1–2, 2009. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.01.001.

DE PAULA, F.C.; KAKAZU, S.; DE PAULA, C.B.C.; GOMEZ, J. G. C.; CONTIERO, J. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol by newly isolated *Pandoraea* sp. Polyhydroxyalkanoate production from crude glycerol. *Journal of King Saud University - Science*, v. 29, n. 2, p. 166–173, 2017. https://doi.org/10.1016/j.jksus.2016.07.002.

DE PAULA, C.B.C.; DE PAULA-ELIAS, F.C.; RODRIGUES, M.N.; COELHO, L.F.; DE OLIVEIRA, N.M.L.; DE ALMEIDA, A.F.; CONTIERO, J. Polyhydroxyalkanoate synthesis by *Burkholderia glumae* into a sustainable sugarcane biorefinery concept. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 1–14, 2021. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.631284.

DOI, Y. *Microbial Polyesters*. New York, USA: VCH Publishers. 1990, p. 156.

DOI, Y. Unnatural biopolymers. *Nature Materials*, v. 1, n. 4, p. 207–208, 2002. https://doi.org/10.1038/nmat783.

DOI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, Y.; SOGA, K. Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly(β-hydroxybutyrate) and a Copolyester of β-Hydroxybutyrate and β-Hydroxyvalerate Isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Macromolecules*, v. 19, n. 11, p. 2860–2864, 1986. https://doi.org/10.1021/ma00165a033.

ELBAHLOUL, Y.; STEINBÜCHEL, A. Large-scale production of poly(3-hydroxyoctanoic acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a simplified downstream process. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 3, p. 643–651, 2009. https://doi.org/10.1128/AEM.01869-08.

ERIKSEN, M.; LEBRETON, L.C.M.; CARSON, H.S.; THIEL, M.; MOORE, C.J.; BORERRO, J.C.; GALGANI, F.; RYAN, P.G.; REISSER, J. Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111913.

ERTEL, J.R.; HEDGES, J.I.; DEVOL, A.H.; RICHEY, J.E.; RIBEIRO, M.N.G. Dissolved humic substances of the Amazon River system. *Limnology and Oceanography*, v. 31, n. 4, p. 739–754, 1986. https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.4.0739.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985. https://doi.org/10.2307/2408678.

FENG, D.F.; DOOLITTLE, R. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution*, v. 25, p. 351–360, 1987.

FERREIRA, E.M.; PROCÓPIO, A.R.L.; PEREIRA JUNIOR, R.C.; ZANOTTO, S.P.; PROCÓPIO, R.E.L. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Lynisibacillus* sp. strain UEA-20.171. *African Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 34, p. 1827–1834, 2016. https://doi.org/10.5897/ajb2016.15329.

FUJITA, Y.; MATSUOKA, H.; HIROOKA, K. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 829–839, 2007. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x.

GROTHE, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, n. 1–2, p. 132–141, 1999. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00023-X.

GEETHU, M.; VRUNDHA, R.; RAJA, S.; RAGHU CHANDRASHEKAR, H.; DIVYASHREE, M.S. Improvement of the Production and Characterisation of Polyhydroxyalkanoate by *Bacillus endophyticus* Using Inexpensive Carbon Feedstock. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 27, n. 5, p. 917–928, 2019. https://doi.org/10.1007/s10924-019-01397-z.

GEYER, R.; JAMBECK, J.R.; LAW, K.L. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, v. 3, n. 7, p. 3–8, 2017. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782.

GOMAA, E.Z. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and Escherichia coli grown on cane molasses fortified with ethanol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 1, p. 145–154, 2014. https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100020.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F.A.; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA, M.S.; DA SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, p. 785–791, 1996. https://doi.org/10.1007/s002530050763.

GOWDA, V.; SHIVAKUMAR, S. Agrowaste-based Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using hydrolytic potential of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 1, p. 55–61, 2014. https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100009

GUO, Z.; HOUGHTON, J.E. PcaR-mediated activation and repression of pca genes from *Pseudomonas putida* are propagated by its binding to both the -35 and the -10 promoter elements. *Molecular Microbiology*, v. 32, p. 253-63, 1999. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01342.x.

HAFT, D.H.; DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A.; *et al.* RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Research*, v. 4, n. 46, p. 851-860, 2018. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1068.

HAMMEL, K.E. Fungal degradation of lignin. *In*: Cadish, G.; Giller, K.E.; Wallingford, U.K. Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. CAB International; p. 33–45, 1997.

HAN, J.; HOU, J.; ZHANG, F.; AI, G.; LI, M.; CAI, S.; LIU, H.; WANG, L.; WANG, Z.; ZHANG, S.; CAI, L.; ZHAO, D.; ZHOU, J.; XIANG, H. Multiple propionyl coenzyme a-supplying pathways for production of the bioplastic poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 9, p. 2922–2931, 2013. https://doi.org/10.1128/AEM.03915-12.

HATTA, T.; FUJII, E.; TAKIZAWA, N. Analysis of two gene clusters involved in 2,4,6-trichlorophenol degradation by *Ralstonia pickettii* DTP0602. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 76, n. 5, p. 892–899, 2012. https://doi.org/10.1271/bbb.110843.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. *Biotechnology Letters*, v. 11, n. 7, p. 471–476, 1989. https://doi.org/10.1007/BF01026644.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 1, p. 1–12, 2007. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0732-8.

HEMACHANDER, C.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 809–814, 2000. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00140-5.

HIGUCHI-TAKEUCHI, M.; MORISAKI, K.; NUMATA, K. A screening method for the isolation of polyhydroxyalkanoate-producing purple non-sulfur photosynthetic bacteria from natural seawater. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1–7, 2016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01509.

HIRAISHI, T.; HIRAHARA, Y.; DOI, Y.; MAEDA, M.; TAGUCHI, S. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from *Ralstonia pickettii* T1 on PHB degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 11, p. 7331–7338, 2006. https://doi.org/10.1128/AEM.01187-06.

HOFFMANN, N.; REHM, B.H.A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 1, p. 1–7, 2004. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.029.

HOHN, S.; ACEVEDOS-TREJOS, E.; ABRAMS, J.F.; DE MOURA, J.F.; SPRANZ, R.; MERICO, A. The long-term legacy of plastic mass production. *Science of The Total Environment*, v. 746, p. 141115, 2020. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141115.

HUANG, X., MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*, v. 9, n.9, p. 868–877, 1999. https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868.

HUONG, K.H.; KANNUSAMY, S.; LIM, S.Y.H.; AMIRUL, A.A. Biosynthetic enhancement of single-stage Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by manipulating the substrate mixtures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 42, n. 9, p. 1291–1297, 2015. https://doi.org/10.1007/s10295-015-1657-y.

INSOMPHUN, C.; MIFUNE, J.; ORITA, I.; NUMATA, K.; NAKAMURA, S.; FUKUI, T. Modification of β-oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-

hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 117, n. 2, p. 184–190, 2014. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.016.

IVANOVA, N.; SOROKIN, A.; ANDERSON, I.; *et al.* Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, v. 423, n. 6935, p. 87–91, 2003. https://doi.org/10.1038/nature01582.

IWATA, T.; AOYAGI, Y.; FUJITA, M.; YAMANE, H.; DOI, Y.; SUZUKI, Y.; TAKEUCHI, A.; UESUGI, K. Processing of a strong biodegradable poly[(R)-3-hydroxybutyrate] fiber and a new fiber structure revealed by micro-beam x-ray diffraction with synchrotron radiation. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 25, n. 11, p. 1100–1104, 2004. https://doi.org/10.1002/marc.200400110.

IWATA, T. Strong fibers and films of microbial polyesters. Macromolecular Bioscience, v. 5, n. 8, p. 689–701, 2005. https://doi.org/10.1002/mabi.200500066.

JACKMAN, S.D.; VANDERVALK, B.P.; MOHAMADI, H.; CHU, J.; YEO, S.; HAMMOND, S.A.; JAHESH, G.; KHAN, H.; COOMBE, L.; WARREN, R.L.; BIROL, I. ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome Research*, v. 27, n. 5, p. 768–777, 2017. https://doi.org/10.1101/gr.214346.116.Freely.

JAEGER, K.E.; STEINBUCHEL, A.; JENDROSSEK, D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly(ω-hydroxyalkanoates). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 8, p. 3113–3118, 1995. https://doi.org/10.1128/aem.61.8.3113-3118.1995.

JAMBECK, J.R.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T.R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A.; NARAYAN, R.; LAW, K.L.; Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, v. 347, n. 6223, 2015. https://doi.org/ 10.1126/science.1260352.

JAN, S.; ROBLOT, C.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J.N.; SÉGUIN, J.P. ^{1}H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, n. 3, p. 195–201, 1996. https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00096-8.

JIANG, G.; HILL, D.J.; KOWALCZUK, M.; JOHNSTON, B.; ADAMUS, G.; IRORERE, V.; RADECKA, I. Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n. 7, 2016. https://doi.org/ 10.3390/ijms17071157.

JIANG, Y.; SONG, X.; GONG, L.; LI, P.; DAI, C.; SHAO, W. High poly(β-hydroxybutyrate) production by *Pseudomonas fluorescens* A2a5 from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 42, n. 2, p. 167–172, 2008. https://doi.org/10.1016/ j.enzmictec.2007.09.003.

KAHAR, P.; TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability*, v. 83, n. 1, p. 79–86, 2004. https://doi.org/10.1016/S0141-3910(03)00227-1.

KAJIWARA, N.; NOMA, Y.; TAMIYA, M.; TERANISHI, T.; KATO, Y.; ITO, Y.; SAKAI, S. Destruction of decabromodiphenyl ether during incineration of plastic television housing waste at commercial-scale industrial waste incineration plants. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 9, n. 2, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105172.

KATO, M.; BAO, H.J.; KANG, C.K.; FUKUI, T.; DOI, Y. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3 from sugars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, n. 3, p. 363–370, 1996. https://doi.org/10.1007/s002530050697.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology*, v. 86, n. 2, p. 97–104, 2001. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00404-1.

KIM, H.; PARK, J.; SHIN, H.D.; LEE, Y.H. Isolation of Glucose Utilizing Mutant of *Alcaligenes eutrophus* , its Substrate Selectivity , Accumulation of Poly-b-hydroxybutyrate. *Journal of Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 51–58, 1995.

KIMURA, H.; YAMAMOTO, T.; IWAKURA, K. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from 1,3-propanediol by *Chromobacterium* sp. *Polymer Journal*, v. 34, n. 9, p. 659–665, 2002. https://doi.org/10.1295/polymj.34.659.

KOLLER, M. Poly(hydroxyalkanoates) for food packaging: Application and attempts towards implementation. *Applied Food Biotechnology*, v. 1, n. 1, p. 3–15, 2014. https://doi.org/10.22037/afb.v1i1.7127.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA, P. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 2, p. 561–565, 2005. https://doi.org/10.1021/bm049478b.

KOLLER, M., MUKHERJEE, A. Polyhydroxyalkanoates - Linking properties, applications, and end-of-life options. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v. 34, n. 3, p. 115–129, 2020. https://doi.org/10.15255/CABEQ.2020.1819.

KOLLER, M.; SALERNO, A.; REITERER, A.; MALLI, H.; MALLI, K.; KETTL, K.H.; NARODOSLAWSKY, M.; SCHNITZER, H.; CHIELLINI, E.; BRAUNEGG, G. Sugarcane as feedstock for biomediated polymer production. *Sugarcane: Production, Cultivation and Uses, May 2014*, p. 105–136, 2012.

KOMINEK, L.A.; HALVORSON, H.O. Metabolism of poly-b-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, v. 90, p. 1251–1259, 1965. https://doi.org/10.1128/jb.90.5.1251-1259.1965.

KUKOR, J.J.; OLSEN, R.H.; BALLOU, D.P. Cloning and expression of the catA and catBC gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of Bacteriology*, v. 170, p. 4458–4465, 1988. https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4458-4465.1988.

KUMAR, M.; SINGHAL, A.; VERMA, P.K.; Thakur, I.S. Production and characterization of polyhydroxyalkanoate from lignin derivatives by *Pandoraea* sp. ISTKB. *ACS OMEGA*, v. 2, n. 12, p. 9156–9163, 2017. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01615.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X. Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096.

KUMARI, A. Chapter 1 - Glycolysis. *In:* KUMARI A., *Sweet Biochemistry*, pp. 1–5, 2018. Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814453-4.00001-7.

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, v. 5, n.7, p. 620–634, 2011. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60

KURTZ, S.; SHUMWAY, M.; ANTONESCU, C.; SALZBERG, S. L.; PHILLIPPY, A.; SMOOT, M.; DELCHER, A. L.; DELCHER, A. L. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biology*, v. 5, n. 2, 12 p., 2004. http://www.tigr.org/software/mummer.

KUSAKA, S.; ABE, H.; LEE, S.Y.; DOI, Y. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, n. 2, p. 140–143, 1997. https://doi.org/10.1007/s002530050902

KWIECIEŃ, I.; RADECKA, I.; KOWALCZUK, M.; ADAMUS, G. Transesterification of PHA to oligomers covalently bonded with (bio)active compounds containing either carboxyl or hydroxyl functionalities. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1–20, 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120149.

LABUZEK, S.; RADECKA, I. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *Journal Applied Microbiology*, v. 90, n. 3, p. 353–357, 2001. https://doi.org/ 10.1046/j.1365-2672.2001.01253.x.

LAU, H.T.; FARYNA, J.; TRIPLETT, E.W. *Aquitalea magnusonii* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from a humic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 867–871, 2006. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64089-0.

LE, S.Q.; GASCUEL, O. An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 2008. https://doi.org/10.1093/molbev/msn067.

LEE, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. In *Trends in Biotechnology*, v. 14, n. 11, pp. 431–438, 1996. https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5.

LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* strains: genetic and fermentation studies, *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 13, p. 207–215, 1995. https://doi.org/10.1139/m95-189.

LEE, C.M.; WEON, H.Y.; KIM, Y.J.; SON, J.A.; YOON, S.H.; KOO, B.S.; KWON, S.W. *Aquitalea denitrificans* sp. nov., isolated from a Korean wetland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 1045–1048, 2009. https://doi.org/10.1099/ijs.0.002840-0.

LIN, C.L.; SHEN, F.T.; TAN, C.C.; HUANG, C.C.; CHEN, B.Y.; ARUN, A.B.; YOUNG, C.C. Characterization of *Gordonia* sp. strain CC-NAPH129-6 capable of naphthalene degradation. *Microbiological Research*, v. 167, n. 7, p. 395–404, 2012. https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.12.002.

LIN, L.; WANG, X.; CAO, L.; XU, M. Lignin catabolic pathways reveal unique characteristics of Dye-decolorizing peroxidases in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, v. 21, n. 5, 2019. doi:10.1111/1462-2920.14593.

LIU, Y.; DU, J.; LAI, Q.; ZENG, R.; YE, D.; XU, J.; SHAO, Z. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 67, n. 8, p. 2499–2508, 2017. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821.

LIU, Q.; LUO, G.; ZHOU, X.R.; CHEN, G.Q. Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β-oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metabolic Engineering*, v. 13, n. 1, p.11–17, 2011. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.004.

LIU, D.; YAN, X.; SI, M.; DENG, X.; MIN, X.; SHI, Y.; CHAI, L. Bioconversion of lignin into bioplastics by *Pandoraea* sp. B-6: molecular mechanism. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 3, p. 2761–2770, 2019. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3785-1.

LIU, H.; ZHU, J.Y.; FU, S.Y. Effects of lignin-metal complexation on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 12, p. 7233–7238, 2010. https://doi.org/10.1021/jf1001588.

LOBO, H.; BONILLA, J.V. Handbook of Plastics Analysis. CRC Press, Nova Iorque, 656 p., 2003. https://books.google.com.br/books?id=R879DwAAQBAJ.

LOPES, M.S.G.; ROCHA, R.C.S.; ZANOTTO, S.P.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 10, p. 1751–1756, 2009. https://doi.org/10.1007/s11274-009-0072-9.

LU, J.; TAPPEL, R.C.; NOMURA, C.T. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, v. 49, n. 3, p. 226–248, 2009. https://doi.org/10.1080/15583720903048243.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999. https://doi.org/10.1128/mmbr.63.1.21-53.1999.

MALIK, M.R.; YANG, W.; PATTERSON, N.; TANG, J.; WELLINGHOFF, R.L.; PREUSS, M.L.; BURKITT, C.; SHARMA, N.; JI, Y.; JEZ, J.M.; PEOPLES, O.P.; JAWORSKI, J.G.; CAHOON, E.B.; SNELL, K.D. Production of high levels of poly-3-hydroxybutyrate in plastids of *Camelina sativa* seeds. *Plant Biotechnology Journal*, v. 13, n. 5, p. 675–688, 2015. https://doi.org/10.1111/pbi.12290.

MASOOD, F.; ABDUL-SALAM, M.; YASIN, T.; HAMEED, A. Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by Bacillus cereus FA11. *3 Biotech*, v. 7, n. 1, 2017. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0712-y.

MCCOOL, G.J.; CANNON, M.C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*; v. 183, p. 4235–4243, 2001. https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4235-4243.2001.

MIZUNO, S.; HIROE, A.; FUKUI, T.; ABE, H.; TSUGE, T. Fractionation and thermal characteristics of biosynthesized polyhydroxyalkanoates bearing aromatic groups as side chains. *Polymer Journal*, v. 49, n. 7, p. 557–565, 2017. https://doi.org/10.1038/pj.2017.20.

MOHAPATRA, S.; MAITY, S.; DASH, H.R.; DAS, S.; PATTNAIK, S.; RATH, C.C.; SAMANTARAY, D. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, v. 12, p. 206–213, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001.

MORIUCHI, R.; DOHRA, H.; KANESAKI, Y.; OGAWA, N. Complete genome sequence of 3-chlorobenzoate-degrading bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and reclassification of the strains of the genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* based on phylogenetic and whole-genome sequence analyses. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 133, p. 1–21, 2019. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00133.

MORYA, R.; KUMAR, M.; THAKUR, I.S. Utilization of glycerol by *Bacillus* sp. ISTVK1 for production and characterization of Polyhydroxyvalerate. *Bioresource Technology Reports*, v. 2, p. 1–6, 2018. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.03.002

MOURÃO, M.M.; GRADÍSSIMO, D.G.; SANTOS, A.V.; SCHNEIDER, M.P.C.; FAUSTINO, S.M.M.; VASCONCELOS, V.; XAVIER, L.P. Optimization of polyhydroxybutyrate production by Amazonian microalga *Stigeoclonium* sp. B23. *Biomolecules*, v. 10, n. 12, p. 1–15, 2020. https://doi.org/10.3390/biom10121628.

MOUSAVIOUN, P.; GEORGE, G.A.; DOHERTY, W.O.S. Environmental degradation of lignin/poly(hydroxybutyrate) blends. *Polymer Degradation and Stability*, v. 97, n. 7, p. 1114–1122, 2012. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.04.004.

MOZEJKO, J.; CIESIELSKI, S. Saponified waste palm oil as an attractive renewable resource for mcl-polyhydroxyalkanoate synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 4, p. 485–492, 2013. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.04.014.

MOŻEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, v. 192, p. 271–282, 2016. https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010.

MOŻEJKO-CIESIELSKA, J.; POKOJ, T. Exploring nutrient limitation for polyhydroxyalkanoates synthesis by newly isolated strains of *Aeromonas* sp. using biodiesel-derived glycerol as a substrate. *PeerJ*, n. 6, e5838, 2018. https://doi.org/10.7717/peerj.5838.

MULLEN, C.A.; BOATENG, A.A.; SCHWEITZER, D.; SPARKS, K.; SNELL, K.D. Mild pyrolysis of P3HB/switchgrass blends for the production of bio-oil enriched with crotonic acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 107, p. 40–45, 2014. https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.01.022.

NG, L.M., SUDESH, K. Identification of a new polyhydroxyalkanoate (PHA) producer *Aquitalea* sp. USM4 (JCM 19919) and characterization of its PHA synthase. *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, v. 122, n. 5, p. 550–557, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.024.

NODA, I. *Films and absorbent articles comprising a biodegradable polyhydroxyalkanoate comprising 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate comonomer units*, 1999. Disponível em: https://patents.google.com/patent/US5990271A/en. Acessado em: 08/10/2021.

NOMURA, C.T.; TAGUCHI, S. PHA synthase engineering toward superbiocatalysts for custom-made biopolymers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, n. 5, p. 969–979, 2007. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0566-4.

NONATO, R.V.; MANTELATTO, P.E.; ROSSELL, C.E.V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 57, p. 1–5, 2001. https://doi.org/10.1007/s002530100732.

NORTH, E.J., HALDEN, R.U. Plastics and environmental health: The road ahead. *Reviews on Environmental Health*, v. 28, n.1, p. 1–8, 2013. https://doi.org/10.1515/reveh-2012-0030.

NUMATA, K.; HIROTA, T.; KIKKAWA, Y.; TSUGE, T.; IWATA, T.; ABE, H.; DOI, Y. Enzymatic degradation processes of lamellar crystals in thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers revealed by real-time atomic force microscopy. *Biomacromolecules*, v. 5, n. 6, p. 2186–2194, 2004. https://doi.org/10.1021/bm0497670.

NUMATA, K.; KIKKAWA, Y.; TSUGE, T.; IWATA, T.; DOI, Y.; ABE, H. Enzymatic degradation processes of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and poly[(R)-3-hydroxybutyric acid-co-(R)-3-hydroxyvaleric acid] single crystals revealed by atomic force microscopy: Effects of molecular weight and second-monomer composition on erosion. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 4, p. 2008–2016, 2005. https://doi.org/10.1021/bm0501151.

NUMATA, K.; MORISAKI, K. Screening of marine bacteria to synthesize polyhydroxyalkanoate from lignin: Contribution of lignin derivatives to biosynthesis by *Oceanimonas doudoroffii*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 3, n. 4, p. 569–573, 2015a. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00031.

NUMATA, K.; MORISAKI, K. Screening of marine bacteria to synthesize polyhydroxyalkanoate from lignin: Contribution of lignin derivatives to biosynthesis by *Oceanimonas doudoroffii*. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v.3, n. 4, p. 569–573, 2015b. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00031

NUMATA, K.; MORISAKI, K.; TOMIZAWA, S.; OHTANI, M.; DEMURA, T.; MIYAZAKI, M.; NOGI, Y.; DEGUCHI, S.; DOI, Y. Synthesis of poly- and oligo(hydroxyalkanoate)s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polymer Journal*, v. 45, n. 10, p. 1094–1100, 2013. https://doi.org/10.1038/pj.2013.25.

NUMATA, K.; YAMASHITA, K.; FUJITA, M.; TSUGE, T.; KASUYA, K.I.; IWATA, T.; DOI, Y.; ABE, H. Adsorption and hydrolysis reactions of poly(hydroxybutyric acid) depolymerases secreted from *Ralstonia pickettii* T1 and *Penicillium funiculosum* onto poly[(R)-3-hydroxybutyric acid]. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 7, p. 2276–2281, 2007. https://doi.org/10.1021/bm070231z.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; KOLLER, M. The underexplored role of diverse stress factors in microbial biopolymer synthesis. Bioresource Technology, v. 326, p. 124767, 2021. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124767.

OBRUCA, S.; SEDLACEK, P.; KOLLER, M.; KUCERA, D.; PERNICOVA, I. Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 3, p. 856–870, 2018. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.006.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G. β Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly β hydroxybutyrate metabolism. *Biochemical Journal*, v. 134, n. 1, p. 239–248, 1973. https://doi.org/10.1042/bj1340239.

OKUWAKI, A. Feedstock recycling of plastics in Japan. *Polymer Degradation and Stability*, v. 85, n. 3, p. 981–988, 2004. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.01.023.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOß, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters*, vol. 23, n. 14, p. 1119–1123, 2001. https://doi.org/10.1023/A:1010559800535.

OWEN, A.J.; HEINZEL, J.; SKRBIC, Z.; DIVJAKOVIC, V. Crystallization and melting behaviour of PHB and PHB/HV copolymer. *Polymer*, v. 33, n. 7, p. 1563–1567, 1992. https://doi.org/10.1016/0032-3861(92)90139-N.

PAKALAPATI, H.; CHANG, C.K.; SHOW, P.L.; ARUMUGASAMY, S. K.; LAN, J.C.W. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 126, n. 3, p. 282–292, 2018. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.016.

PAN, W.; PERROTTA, J.A.; STIPANOVIC, A.J.; NOMURA, C.T.; NAKAS, J.P. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 3, p. 459–469, 2012. https://doi.org/10.1007/s10295-011-1040-6.

PANDEY, N. Chapter 10 - Exiguobacterium. *In*: AMARESAN, N.; SENTHIL KUMAR, M.; ANNAPURNA, K.; KUMAR, K. Sankaranarayanan, A. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, Academic Press. pp. 169–183, 2020. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00010-1

PEREIRA, J.O.; DE SOUZA, A.Q.L.; DE SOUZA, A.D.L.; DE CASTRO FRANÇA, S.; DE OLIVEIRA, L.A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. *In*: AZEVEDO, J.L.; QUECINE, M.C. *Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*, Springer International Publishing, pp. 71–103, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_5.

PILLAI, A.B.; KUMAR, A.J.; THULASI, K.; KUMARAPILLAI, H. Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhattai*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 451–460, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.005.

POBLETE-CASTRO, I.; BECKER, J.; DOHNT, K.; DOS SANTOS, V.M.; WITTMANN, C. Industrial biotechnology of Pseudomonas putida and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 93, p. 2279–90, 2012. https://doi.org/10.1007/s00253-012-3928-0.

POHLMANN, A.; FRICKE, W.F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; PÖTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOß, I.; GOTTSCHALK, G.; STEINBÜCHEL, A.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, v. 24, n. 10, p. 1257–1262, 2006. https://doi.org/10.1038/nbt1244.

PRIETO, A.; ESCAPA, I.F.; MARTÍNEZ, V.; DINJASKI, N.; HERENCIAS, C.; DE LA PEÑA, F.; TARAZONA, N.; REVELLES, O. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, v. 18, n. 2, p. 341–357, 2016. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12760.

RABERG, M.; VOIGT, B.; HECKER, M.; STEINBÜCHEL, A. A closer look on the polyhydroxybutyrate- (PHB-) negative phenotype of *Ralstonia eutropha* PHB-4. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. 1–11, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095907.

RAMACHANDRAN, H.; SHAFIE, N.A.H.; SUDESH, K.; AZIZAN, M.N.; MAJID, M.I.A.; AMIRUL, A.A.A. *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 111, n. 3, p. 361–372, 2018. https://doi.org/10.1007/s10482-017-0958-8.

RASMUSSEN, S.C. Revisiting the early history of synthetic polymers: Critiques and new insights. *Ambix*, v. 65, n. 4, p. 356–372, 2018. https://doi.org/10.1080/00026980.2018.1512775

RAZA, Z.A.; ABID, S.; BANAT, I.M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 126, p. 45–56, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001.

REINECKE, F.; STEINBÜCHEL, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 1–2, p. 91–108, 2008. https://doi.org/10.1159/000142897.

REHM, B.H.A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, v. 376, n. 1, p. 15–33, 2003. https://doi.org/10.1042/bj20031254.

REHM, B.H.A.; MITSKY, T.A.; STEINBÜCHEL, A. Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by Pseudomonads: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 7, p. 3102–3109, 2001. https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3102.

REUSCH, R.N. Biological complexes of poly-β-hydroxybutyrate. *FEMS Microbiology Letters*, v. 103, p. 119-129, 1992. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05829.x.

REUSCH, R.N. Transmembrane Ion Transport by Polyphosphate/ Poly-(R)-3-hydroxybutyrate Complexes. In *Biochemistry Moscow*, v. 65, n. 3, pp. 280–295, 2000.

RISSMAN, A.I.; MAU, B.; BIEHL, B.S.; DARLING, A.E.; GLASNER, J.D., PERNA, N.T. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics*, v. 25, n. 16, p. 2071–2073, 2009. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp356.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; OLIVER GLÖCKNER, F.; PEPLIES, J. JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, v. 32, n. 6, p. 929–931, 2016. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681.

RITCHIE H.; ROSER, M. *Plastic Pollution*, 2018. Disponível em: https://ourworldindata.org/plastic-pollution', Acesso em: 03/12/2021.

ROCHA, D.G.; KAEFER, I.L. What has become of the refugia hypothesis to explain biological diversity in Amazonia? *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 7, p. 4302-4309, 2019. https://doi.org/10.1002/ece3.5051.

ROMO, D.M.R.; GROSSO, M.V.; SOLANO, N.C.M.; CASTAÑO, D.M. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 3, p. 348–357, 2007. https://doi.org/10.2225/vol10-issue3-fulltext-13.

RUDIN, A.; CHOI, P. (2013). Chapter 13 – Biopolymers. *In:* RUDIN, A.; CHOI, P. *The elements of Polymer Science and Engineering*, Academic Press. pp. 521–535, 2013. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382178-2.00013-4

SACCHI, C.T.; WHITNEY, A.M.; MAYER, L.W.; MOREY, R.; STEIGERWALT, A.; BORAS, A.; WEYANT, R. S.; POPOVIC, T. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 10, p. 1117–1123, 2002. https://doi.org/10.3201/eid0810.020391.

SANGKHARAK, K.; PRASERTSAN, P. The production of polyhydroxyalkanoate by *Bacillus licheniformis* using sequential mutagenesis and optimization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 18, n. 2, p. 272–279, 2013. https://doi.org/10.1007/s12257-012-0615-z.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. In *Canadian Journal of Microbiology* v. 50, n. 1, pp. 1–17, 2004. https://doi.org/10.1139/w03-076.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153.

SEYMOUR, R.B.; KAUFFMAN, G.B. The rise and fall of celluloid. *Journal of Chemical Education*, v. 69, n. 4, p. 311, 1992. https://doi.org/10.1021/ed069p311.

SHI, Y.; CHAI, L.; TANG, C.; YANG, Z.; ZHANG, H.; CHEN, R.; CHEN, Y.; ZHENG, Y. Characterization and genomic analysis of kraft lignin biodegradation by the beta-

proteobacterium Cupriavidus basilensis B-8. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2013. https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-1.

SHI, Y.; YAN, X.; LI, Q.; WANG, X.; LIU, M.; XIE, S.; CHAI, L.; YUAN, J. Directed bioconversion of Kraft lignin to polyhydroxyalkanoate by *Cupriavidus basilensis* B-8 without any pretreatment. *Process Biochemistry*, v. 52, p. 238–242, 2017. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.10.004.

SINGH, A. K., MALLICK, N. Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL-LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 3, p. 347–354. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0503-x.

SIRACUSA, V.; BLANCO, I. Bio-Polyethylene (Bio-PE), Bio-Polypropylene (Bio-PP) and Bio-Poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent Developments in Bio-Based Polymers Analogous to Petroleum-Derived Ones for Packaging and Engineering Applications. *Polymers*, v. 12, n. 8, p. 1641, 2020. https://doi.org/10.3390/polym12081641.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B.H.A.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives Microbiology*, v. 171, p. 73–80, 1999. https://doi.org/10.1007/s002030050681

SRUAMSIRI, D.; THAYANUKUL, P.; SUWANNASILP, B.B. In situ identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60727-7.

STEINBUCHEL, A.; FRUND, C.; JENDROSSEK, D.; SCHLEGEL, H.G. Isolation of mutants of *Alcaligenes eutrophus* unable to derepress the fermentative alcohol - dehydrogenase. *Archives of Microbiology*, v. 148, p.178–186, 1987. https://doi.org/10.1007/BF00414809.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, n. 2, p. 81–96, 2003. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00036-6.

SURENDRAN, A.; LAKSHMANAN, M.; CHEE, J.Y.; SULAIMAN, A.M.; THUOC, D.V., SUDESH, K. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. 169, p. 1–15, 2020. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00169.

TADINI, A.M.; NICOLODELLI, G.; SENESI, G.S.; ISHIDA, D.A.; MONTES, C.R.; LUCAS, Y.; MOUNIER, S.; GUIMARÃES, F.E.G.; MILORI, D.M.B.P. Soil organic matter in podzol horizons of the Amazon region: Humification, recalcitrance, and dating. *Science of the Total Environment*, v. 613–614, p. 160–167, 2018. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.068.

TAGUCHI, S.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, K.; TAJIMA, K.; SATOH, Y.; MUNEKATA M, OHNO, K.; KOHDA, K.; SHIMAMURA, T.; KAMBE, H.; OBATA, S. A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of USA, v. 105, n. 45, p. 17323–7, 2008. https://doi.org/10.1073/pnas.0805653105.

TAI, Y.T.; FOONG, C.P.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Discovery of a new polyhydroxyalkanoate synthase from limestone soil through metagenomic approach. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 121, n. 4, p. 355–364, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.08.008.

TAO, Y.; FISHMAN, A.; BENTLEY, W.E.; WOOD, T.K. Oxidation of benzene to phenol, catechol, and 1,2,3-Trihydroxybenzene by Toluene 4-Monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and Toluene 3-Monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. *Applied Environmental Microbiology*, v. 70, n. 7, p. 3814–20, 2004. https://doi.org/10.1128AEM.70.7.3814-3820.2004.

TATUSOVA, T., DICUCCIO, M.; BADRETDIN, A. *et al.* NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 44, p. 6614-6624, 2016. https://doi.org/10.1093/nar/gkw569.

TCI Chemicals. Lignin (Alcalinane), 2022. Disponível em https://www.tcichemicals.com/GB/en/p/L0082, Acesso em: 11/12/2021.

TEH, A.H.; CHIAM, N.C.; FURUSAWA, G.; SUDESH, K. Modelling of polyhydroxyalkanoate synthase from *Aquitalea* sp. USM4 suggests a novel mechanism for polymer elongation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 119, p. 438–445, 2018. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.147.

TEH, A.H.; CHIAM, N.C.; FURUSAWA, G.; SUDESH, K. Modelling of polyhydroxyalkanoate synthase from *Aquitalea* sp. USM4 suggests a novel mechanism for polymer elongation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 119, p. 438–445, 2018. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.147.

TOLEDANO, A.; GARCÍA, A.; MONDRAGON, I.; LABIDI, J. Lignin separation and fractionation by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v. 71, n. 1, p. 38–43, 2010. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.10.024.

TOMIZAWA, S.; CHUAH, J.A.; MATSUMOTO, K.; DOI, Y.; NUMATA, K. Understanding the limitations in the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from lignin derivatives. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 2, n. 5, p. 1106–1113, 2014. https://doi.org/10.1021/sc500066f.

TOMIZAWA, S.; HYAKUTAKE, M.; SAITO, Y.; *et al.* Molecular weight change of polyhydroxyalkanoate (PHA) caused by the PhaC subunit of PHA synthase from *Bacillus cereus* YB-4 in recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 7, p. 2660–2666, 2011. https://doi.org/10.1021/bm2004687.

TRIPATHI, L.; WU, L.P.; CHEN, J.; CHEN, G.Q. Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate -block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a β-oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. *Microbial Cell Factories*, v. 11, p. 1–11, 2012. https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-44.

TRIPATHI, L.; WU, L.P.; DECHUAN, M.; CHEN, J.; WU, Q.; CHEN, G.Q. *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions. *Bioresource Technology*, v. 142, p. 225–231, 2013. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.027.

TSUGE, T. Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis. *Polymer Journal*, v. 48, n. 11, p. 1051–1057, 2016. https://doi.org/10.1038/pj.2016.78.

TUFAIL, S.; MUNIR, S.; JAMIL, N. Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 629–636, 2017. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.008.

USHIMARU, K.; MOTODA, Y.; NUMATA, K.; TSUGE, T. Phasin proteins activate *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase but not *Ralstonia eutropha* PHA synthase. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 9, p. 2867–2873, 2014. https://doi.org/10.1128/AEM.04179-13.

VALLAPIL, S.P.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 1–17, 2007. https://doi.org/10.1007/s10482-006-9095-5.

VENKATESWAR, R.M.; YAJIMA, Y.; MAWATARI, Y.; HOSHINO, T.; CHANG, Y.C. Degradation and conversion of toxic compounds into useful bioplastics by *Cupriavidus* sp. CY-1: relative expression of the PhaC gene under phenol and nitrogen stress. *Green Chemistry*, v. 17, n. 9, p. 4560–4569, 2015. https://doi.org/10.1039/c5gc01156f.

VICENTE, M.; GOMEZ, M.J.; AYALA, J.A.; Regulation of transcription of cell division genes in the *Escherichia coli* dcw cluster. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 54, n. 4, p.317-24, 1998. https://doi.org/10.1007/s000180050158.

VICUÑA, R.; GONZÁLEZ, B.; MOZUCH, M.D.; KIRK, T.K. Metabolism of lignin model compounds of the arylglycerol-ß-aryl ether type by *Pseudomonas acidovorans* D3. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 11, p. 2605−2609, 1987. https://doi.org/10.1128/aem.53.11.2605-2609.1987.

WANG, H.H.; ZHOU, X.R.; LIU, Q.; CHEN, G.Q. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 89, p. 1497–1507, 2011. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2964-x.

WANG, X.; LIN, L.; DONG, J.; LING, J.; WANG, W.; WANG, H.; ZHANG, Z.; YU, X. Simultaneous improvements of Pseudomonas cell growth and polyhydroxyalkanoate production from a lignin derivative for lignin-consolidated bioprocessing. *Applied and Environmental and Microbiology*, v. 84, n. 18, p. 1–15, 2018. https://doi.org/10.1128/AEM.01469-18.

WANG, W.; SHIHUI, Y.; HUNSINGER, G.B.; PIENKOS, P.T.; JOHNSON, D.K. Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*. *Frontiers in Microbiology*. v. 247, 2014. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00247.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G.Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 30, p. 59–65, 2014. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.06.001.

WARD, N.D.; KRUSCHE, A.V.; SAWAKUCHI, H.O.; BRITO, D.C.; CUNHA, A.C.; MOURA, J.M.S. DA SILVA, R.; YAGER, P.L.; KEIL, R.G.; RICHEY, J.E. The compositional evolution of dissolved and particulate organic matter along the lower Amazon River-Óbidos to the ocean. *Marine Chemistry*, v. 177, p. 244–256, 2015. https://doi.org/10.1016/j.marchem.2015.06.013.

XU, Z.; LEI, P.; ZHAI, R.; WEN, Z.; JIN, M. Recent advances in lignin valorization with bacterial cultures: Microorganisms, metabolic pathways, and bio-products. *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2019. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1376-0.

YABANNAVAR, A.V.; ZYLSTRA, G.J. Cloning and characterization of the genes for p-nitrobenzoate degradation from *Pseudomonas pickettii* YH105. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 12, p. 4284–4290, 1995. https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4284-4290.1995.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two Burkholderia and an Alcaligenes species to Ralstonia gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiology and immunology*, v. 39, n. 11, p. 897–904, 1995. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb03275.x.

YAMADA, K.; MUKAI, K.; DOI, Y. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas pickettii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 15, n. 4, p. 215–220, 1993. https://doi.org/10.1016/0141-8130(93)90040-S.

YAMASHITA, K.; FUNATO, T.; SUZUKI, Y.; TERAMACHI, S.; DOI, Y. Characteristic Interactions between Poly(hydroxybutyrate) Depolymerase and Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Film Studied by a Quartz Crystal Microbalance. *Macromolecular Bioscience*, v. 3, n. 11, p. 694–702, 2003. https://doi.org/10.1002/mabi.200300004.

YU, J. Chapter 23 - Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. *In:* YANG, S.T. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, pp. 585–610, 2007. https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50024-4.

YU, H.; SHI, Y.; YIN, J.; SHEN, Z.; YANG, S. Genetic strategy for solving chemical engineering problems in biochemical engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 78, n. 2–3, p. 283–286, 2003. https://doi.org/10.1002/jctb.770.

ZHENG, J.; SUH, S. Strategies to reduce the global carbon footprint of plastics. *Nature Climate Change*, v. 9, n. 5, p. 374–378, 2019. https://doi.org/10.1038/s41558-019-0459-z.

ZHOU, Y.; LIN, L.; WANG, H.; ZHANG, Z.; ZHOU, J.; JIAO, N. Development of a CRISPR/Cas9n-based tool for metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for ferulic acid-to-polyhydroxyalkanoate bioconversion. *Communications Biology*. v. 3, n. 98, 2020. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0824-5.

ZRIBI-MAALOUL, E.; TRABELSI, I.; ELLEUCH, L.; CHOUAYEKH, H.; BEN SALAH, R. Purification and characterization of two polyhydroxyalkanoates from *Bacillus cereus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 61, p. 82–88, 2013. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.043.

ANEXOS

- **Publicações como produto desta pesquisa:**

Castro, L. M., Foong, C. P., Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Lopes, E. F., Numata, K., & Mota, A. J. (2021). Microbial prospection of an Amazonian blackwater lake and whole-genome sequencing of bacteria capable of polyhydroxyalkanoate synthesis. *Polymer Journal*, *53*(1), 191–202. https://doi.org/10.1038/s41428-020-00424-4

Castro, L. M., Foong, C. P., Higuchi-Takeuchi, M., Lopes, E. F., Numata, K., Dias da Silva, S., da Silva Nonato, L., da Mota, A. J., & Odair Pereira, J. (2021). Draft Whole-Genome Sequence of *Bacillus paramycoides* LB_RP2, a Putative Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium Isolated from an Amazonian Blackwater River. *Microbiology Resource Announcements*, *10*(30), 2–4. https://doi.org/10.1128/mra.00438-21

- **Publicações como produto de parcerias estabelecidas durante o período:**

Teles, Y. V., de Castro, L. M., Sargentini Junior, É., do Nascimento, A. P., da Silva, H. A., Costa, R. S., do Nascimento Souza, R. D., da Mota, A. J., & Pereira, J. O. (2018). Potential of Bacterial Isolates from a Stream in Manaus-Amazon to Bioremediate Chromium-Contaminated Environments. *Water, Air, and Soil Pollution*, *229*(8), 1–10. https://doi.org/10.1007/s11270-018-3903-1

Tribuzy de Oliveira, R., Soares dos Santos Rolim, C., do Nascimento Rolim, L., Letícia de Sousa Gomes, M., Alexandre Silva Martins, G., Mota de Castro, L., Mesquita do Nascimento, W., Cristianne Saraiva-Bonatto, E., de Cássia Saraiva Nunomura, R., Victor Lamarão, C., & Patrícia Zanotto, S. (2020). Endopleura uchi – a review about its nutritional compounds, biological activities and production market. *Food Research International*, 109884. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109884

ANEXOS

Cronograma de execução

	Trimestre																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Cumprimento das disciplinas oferecidas pelo PPG-BIONORTE	C	C	C	C	C	C												
Revisão bibliográfica	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C				
Coleta das amostras					C													
Seleção das cepas mais promissoras para produção de PHA					C	C	C											
Identificação molecular das bactérias selecionadas							C											
Sequenciamento do genoma								C										
Elaboração do relatório parcial								C										
Elucidação estrutural dos polímeros a serem obtidos								C										
Exame de qualificação											C							
Análise dos dados obtidos							C	C	C	C	C	C						
Publicação dos resultados									C						C			
Elaboração da tese													C	C	C	C	C	
Defesa da tese																		C

LEGENDA: C = Concluído;