

Mariana Galvan Salim

Perspectivas sobre polihidroxialcanoatos em microrganismos extremófilos: busca de genes relacionados a PHA e acúmulo de PHA em microrganismos halófilos recuperados de uma salina interior



Faculdade de Ciências e Tecnologia

2023-2024



Mariana Galvan Salim

Perspectivas sobre polihidroxicanoatos em microrganismos extremófilos: busca de genes relacionados a PHA e acúmulo de PHA em microrganismos halófilos recuperados de uma salina interior

**Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana**

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Conceição Egas

Prof. Doutora Helena Galvão



Faculdade de Ciências e Tecnologia

2023-2024



Mariana Galvan Salim

Insights into Polyhydroxyalkanoates in Extremophile Microorganisms: search for  
PHA-related genes and PHA accumulation in halophilic microorganisms recovered from an  
inland saltern



Faculty of Science and Technology

2023-2024



Declaração de autoria de trabalho

Perspectivas sobre polihidroxicanoatos em microrganismos extremófilos: busca de genes relacionados a PHA e acúmulo de PHA em microrganismos halofílicos recuperados de uma salina interior

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

(Mariana Galvan Salim)

*Copyright © Mariana Galvan Salim*

*A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos.*

*“O jovem pode construir, plantar ou navegar, basta que não seja impedido de fazer o que ele me diz que gostaria de fazer. Se somos sábios é apenas graças a um ponto matemático, como o marinheiro ou o escravo fugido que se orienta pela estrela polar; mas é um guia suficiente para toda nossa vida. Podemos não chegar a nosso porto num período calculável, mas manteremos o curso certo.”*

(Thoreau, Walden)



## Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>I</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>II</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>V</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1 A problemática do plástico .....	1
1.2 Bioplásticos e o mercado .....	2
1.3 Os polihidroxialcanoatos e suas propriedades .....	3
1.4 As principais vias de biossíntese dos PHAs .....	6
1.5 As proteínas relacionadas aos grânulos de PHA e demais proteínas.....	9
1.6 Extremófilos e seus bioprodutos.....	13
1.7 Halófilos .....	15
1.8 Os PHAs e os halófilos.....	16
1.9 Extração e detecção de PHA.....	18
2.0 Metagenômica.....	19
2.1 Salina de Rio Maior, Portugal.....	20
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>22</b>
2.1 Objetivo geral: .....	22
2.2 Objetivos específicos:.....	22
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	<b>24</b>
3.1 Microrganismos.....	24
3.2 Recuperação das estirpes criopreservadas.....	24
3.3 Crescimento microbiano.....	25
3.4 Acúmulo potencializado de PHA .....	26
3.5 Coloração de grânulos de PHB por Sudan Black B.....	27
3.6 Visualização de grânulos de PHB por microscopia óptica .....	28
3.7 Fixação das células para a microscopia eletrônica.....	28
3.8 Otimização da extração de PHA a partir da estirpe RMP-17 .....	29
3.9 Extração de PHA das demais estirpes .....	32
3.10 Ensaio do ácido crotônico .....	32
3.11 Amostras do metagenoma .....	32
3.12 Busca por genes relacionados ao metabolismo de PHA no metagenoma .....	33
3.13 Investigação e confirmação de genes relacionados ao metabolismo de PHA .....	33
<b>4. Resultados</b> .....	<b>35</b>
4.1 Crescimento de estirpes em meio de cultura sólido.....	35
4.2 Crescimento de estirpes em meio de cultura líquido (SW20) .....	35
4.3 Acúmulo potencializado de PHA .....	36
4.4 Visualização de grânulos de PHB por Sudan Black via microscopia óptica.....	37
4.5 Visualização de grânulos de PHA por microscopia eletrônica .....	39
4.6 Otimização da extração de PHA e detecção de PHB em RMP-17.....	40
4.7 Extração de PHA e detecção de PHB das estirpes .....	43

4.8 Busca por genes relacionados ao metabolismo de PHA no metagenoma .....	45
4.8.1 PhaA .....	45
4.8.2 PhaB .....	46
4.8.3 Pha-sintases (PhaC).....	46
4.8.4 PhaJ .....	46
4.9 Investigação e confirmação de genes relacionados ao metabolismo de PHA .....	47
<b>5. Discussão .....</b>	<b>53</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>59</b>
<b>7. Perspectivas futuras .....</b>	<b>61</b>
<b>Referências: .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>I</b>

## **Agradecimentos**

O meu mais sincero agradecimento a todos os colegas do grupo de pesquisa Microbiomas, Metabolitos e Omicas do Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, pela oportunidade e conhecimento compartilhado.

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Estrutura molecular geral dos PHAs. R: radical da cadeia lateral etila. (n) = número de unidades de repetição do monômero constituinte do polímero. .... 5
- Figura 2.** Estrutura dos polihidroxicanoatos de cadeia curta (à esquerda) e de cadeia média (à direita). .... 5
- Figura 3.** Fórmula molecular dos polihidroxibutirato (PHB) à esquerda, com o radical metil ligado. (CH<sub>3</sub>) Fórmula molecular de polihidroxivalerato (PHV), com o radical etila ligado (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>). .... 5
- Figura 4.** Vias metabólicas de PHBV e PHB. Adaptado de: Policastro *et al.*, 2021. .... 7
- Figura 5.** As principais vias metabólicas da síntese de PHA. Adaptado de: Obruča *et al.*, 2022. .... 9
- Figura 6.** Crescimento das estirpes em meio SW20 modificado após 7 dias de crescimento em estufa a 37 °C. Da esquerda para a direita: RMP-1, RMP-16, RMP-135, RMP-111a e RMP-17. Todas as estirpes apresentaram crescimento e coloração rosada ou avermelhada. .... 34
- Figura 7.** Células da estirpe RMP-111<sup>T</sup> crescidas em meio mineral (MG) suplementado com 2% de glicose e retiradas para a coloração durante a fase estacionária de crescimento. Visualização das células a partir da técnica de coloração com Sudan Black B em um microscópio óptico (Carl Zeiss Axio Imager A2) com uma objetiva de imersão em óleo de 100x. Os grânulos de PHB são apresentados como inclusões celulares escuras. .... 37
- Figura 8.** Células da estirpe RMP-111a crescidas em meio mineral (MG) suplementado com 2% de glicose e analisadas durante a fase estacionária de crescimento. Visualização das células a partir da técnica de coloração com Sudan Black B em um microscópio óptico (Carl Zeiss Axio Imager A2) com uma objetiva de imersão em óleo de 100x. Os grânulos de PHB são apresentados como inclusões celulares escuras. .... 38
- Figura 9.** Morfologia de uma das células da estirpe RMP-111<sup>T</sup>. As células foram cultivadas em meio MG contendo 2% (p/v) de glicose e foram coletadas na fase estacionária de crescimento. O conteúdo de PHA da célula foi identificado a partir de finas secções celulares e a micrografia eletrônica foi tirada como descrito nos Materiais e Métodos. Bar 0,5 µm. .... 39
- Figura 10:** Medida dos valores da absorvância resultantes da conversão de PHB a ácido crotônico entre 200 nm e 280 nm. Os gráficos estão plotados a partir das seis metodologias de extração de PHA da estirpe RMP-17 e de *Escherichia coli*, sendo a última utilizada como

controle negativo. De cima para baixo e da esquerda para a direita: (A) Extração realizada a partir de água destilada. (B) Extração realizada a partir de água destilada e NaClO durante 30 minutos. (C) Extração realizada a partir de água destilada e NaClO durante 2 horas. (D) Extração realizada a partir de solução de SDS 0.1%. (E) Extração realizada a partir de solução de SDS 0.1% e NaClO durante 30 minutos. (F) Extração realizada a partir de solução de SDS 0.1% e NaClO durante 2 horas. As células da estirpe RMP-17 foram crescidas em meio MG + 2% de glicose. Os traços em azul representam os valores das células crescidas em 100 mL de meio de cultura. Os traços em azul representam os valores da extração das células crescidas em 50 mL de meio de cultura o. Os traços em amarelo representam os valores da extração realizada a partir das células de *E. coli* crescidas em 100 mL de meio de cultura Luria Bertani. .... 41

**Figura 11.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorvância entre 200 nm e 280 nm a partir da extração da biomassa da estirpe RMP-17. O traço em azul representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento da estirpe realizado em meio mineral (MG) suplementado por 2% de glicose. O traço em vermelho representa a extração realizada a partir da solução de SDS 0.1% e o crescimento em 2% de glicose. Em amarelo, o traço representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento em meio MG suplementado com 2% de glicerol. Em verde, o traço representa a extração realizada por solução de SDS 0.1% e o crescimento em MG + 2% de glicerol. .... 43

**Figura 12.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorvância entre 200 nm e 280 nm a partir da extração da biomassa da estirpe estirpe RMP-11. O traço em azul representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento da estirpe realizado em meio mineral (MG) suplementado com 2% de glicose. O traço em vermelho representa a extração realizada a partir da solução de SDS 0.1% e o crescimento em 2% de glicose. Em amarelo, o traço representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento em meio MG suplementado com 2% de glicerol. Em verde, o traço representa a extração realizada por solução de SDS 0.1% e o crescimento em MG + 2% de glicerol. .... 44

**Figura 13.** Valores de absorvância obtidos a partir da leitura dos resultados do ensaio de ácido crotônico da estirpe RMP-11<sup>T</sup>. .... I

**Figura 14.** Valores de absorvância obtidos a partir da leitura dos resultados do Ensaio de ácido crotônico da estirpe RMP-17. .... I

**Figura 15.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorvância entre 200 nm e 260 nm a partir da extração da biomassa da estirpes RMP-1, RMP-11<sup>T</sup>, RMP-16, RMP-17, RMP-111a e RMP-135 e de *Escherichia coli*, sendo a última utilizada como controle negativo. O meio de cultura com a biomassa crescida foi inicialmente disposto em tubos Falcon (50 mL) e centrifugados por 45 min a 4000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em 45 mL de TRIS-HCl 10 mM, pH 7.5, para a lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas sob as mesmas condições, o sobrenadante majoritariamente descartado e o *pellet* foi ressuspenso e transferido para uma caixa de Petri e incubada em estufa de laboratório (EHRET) a 100 °C por 24 horas. Com a biomassa seca, a remoção desta foi realizada a partir da dissolução através da adição de 40 mL de hipoclorito de sódio (lixívia para uso comercial entre 5% até 13%) e então incubada em estufa a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas sob as mesmas condições e o sobrenadante removido. Foram adicionados à amostra 40 mL de água destilada previamente esterilizada, a

amostra foi submetida a centrifugação sob as mesmas condições e o sobrenadante descartado. Ao *pellet*, foi adicionado uma mistura de 10 mL de acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3 \geq 99\%$ , MERCK) e 10 mL e etanol absoluto (Fischer Chemical), sendo este submetido à vortex até homogeneização e centrifugado. Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado com 10 mL de clorofórmio (Chloroform, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. for analysis) disposto em balão de vidro e incubado em banho-maria (a 60 °C) até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco..... II

**Figura 16.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorbância entre 200 nm e 260 nm a partir da extração da biomassa das estirpes RMP-1, RMP-11<sup>T</sup>, RMP-16, RMP-17, RMP-111a e RMP-135 e de *Escherichia coli*, sendo a última utilizada como controle negativo. .... III

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Taxonomia das estirpes isoladas da Salina de Rio Maior, Portugal. ....	23
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio SW20 modificado (Rodriguez-Valera <i>et al.</i> , 1980). ....	25
<b>Tabela 3.</b> Composição do meio mineral (MG) (Han <i>et al.</i> , 2007).....	26
<b>Tabela 4.</b> Numeração das BINS e suas referêntes categorias taxonômicas. As taxonomias foram verificadas através do programa CheckM, versão 1.0.018. (Parks <i>et al.</i> , 2015), onde k_ é referente ao reino, c_ é referente à classe, f_ é referente à família e s_ é referente à espécie.....	33
<b>Tabela 5.</b> Proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA dentro do domínio <i>Bacteria</i> detectadas nos agrupamentos do metagenoma da Salina de Rio Maior, Portugal. ....	47
<b>Tabela 6.</b> Proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA dentro do domínio <i>Archaea</i> detectadas nos agrupamentos do metagenoma da Salina de Rio Maior, Portugal. ....	48
<b>Tabela 7.</b> Lista dos genes relacionados ao metabolismo de PHA encontrados no metagenoma. Os asteriscos são referentes às anotações das proteínas que não foram anotadas pelo programa Prokka e foram identificadas através do GenBank. ....	49

## Resumo

O uso de plásticos derivados de petróleo é uma problemática global para o meio ambiente, com esforços crescentes para mitigar seus efeitos. Estudos sobre bioplásticos, como os polihidroxialcanoatos (PHA), têm ganhado destaque. Estes poliésteres são similares aos plásticos convencionais, todavia são biocompatíveis, biodegradáveis e renováveis. Microrganismos halófilos dentro dos domínios *Archaea* e *Bacteria* já foram identificados como sintetizadores destes biopolímeros e enzimas participantes de vias metabólicas de PHA também. O presente trabalho teve como objetivo identificar em 7 estirpes de haloarquéias isoladas de uma amostra de um cristalizador da Salina de Rio Maior, Portugal, o acúmulo de PHA e a busca por genes relacionados ao metabolismo de PHA a partir do metagenoma da mesma amostra. A potencialização do acúmulo de PHA foi testada a partir de glicose ou glicerol, sendo esta detectada a partir de glicose. A detecção de grânulos de PHA nos isolados próximos de *Halobacterium salinarum* e uma nova espécie a ser descrita, "*Halorubrum miltondacostae*", foi possível através de micrografias de TEM e da coloração por Sudan Black B. A detecção de PHB nas estirpes de *Haloarcula marismortui* e "*Halorubrum miltondacostae*" foi confirmada a partir do ensaio do ácido crotónico. A extração de PHA foi realizada a partir de 6 metodologias distintas, destacando-se a extração de PHB utilizando SDS 0.1% ou água destilada como as mais eficazes. A detecção dos genes foi realizada a partir da busca destes no metagenoma e a comparação contra o Genbank corroborou a identificação da função dos genes. Foram detectados genes associados a vias metabólicas em representantes dos domínios *Bacteria* e *Archaea*. Genes codificantes para PhaA, PhaB, PhaC, PGAPs e de proteínas relacionadas a mobilização de PHA (PhaJ e PhaZ) foram detectados em *Gammaproteobacteria* e *Rhodobacteraceae*. Esses resultados destacam o potencial dos halófilos como produtores de PHA e a diversidade genética envolvida nesse processo.

Palavras-chave: polihidroxialcanoatos (PHAs); extremófilos; *Archaea*; metagenoma; biossíntese; proteínas associadas aos grânulos (PGAPs)

## Abstract

The use of petroleum-derived plastics is a global environmental issue, with increasing efforts to mitigate its effects. Studies on bioplastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHA), have gained prominence. These polyesters are similar to conventional plastics; however, they are biocompatible, biodegradable, and renewable. Halophilic microorganisms within the *Archaea* and *Bacteria* domains have been identified as synthesizers of these biopolymers, along with enzymes participating in PHA metabolic pathways. The current study aimed to detect PHA accumulation in seven haloarchaeal strains isolated from a crystallizer sample obtained from the Rio Maior Saltern, Portugal, and to investigate genes associated with PHA metabolism in the metagenome of the same sample. Enhancement of PHA accumulation was tested using glucose or glycerol, with glucose being detected as the preferred carbon source. Detection of PHA granules in isolates closely related to *Halobacterium salinarum* and a new species to be described, "*Halorubrum miltondacostae*," was possible through TEM micrographs and Sudan Black B staining. PHB detection in *Haloarcula marismortui* and "*Halorubrum miltondacostae*" strains was confirmed using the crotonic acid assay. The PHA extraction was performed using six different methodologies and the SDS 0.1% or distilled water extraction being the most effective for PHB extraction. Gene detection was conducted by searching for them in the metagenome, and comparison against GenBank corroborated gene function identification. Genes associated with metabolic pathways in representatives of *Bacteria* and *Archaea* domains were detected. Genes encoding PhaA, PhaB, PhaC, PGAPs, and proteins related to PHA mobilization (PhaJ and PhaZ) were detected in *Gammaproteobacteria* and *Rhodobacteraceae*. These results highlight the potential of halophiles as PHA producers, and the genetic diversity involved in this process.

Keywords: polyhydroxyalkanoates (PHAs); extremophiles; Archaea; metagenome; biosynthesis; granule-associated proteins (PGAPs)



## 1. Introdução

---

### 1.1 A problemática do plástico

A utilização de plástico derivado de petróleo é uma problemática ambiental mundial. Diversos esforços têm sido realizados para conter ou minimizar seus impactos. A proibição do uso de plástico de uso único acoplado ao crescente discernimento da população sobre os efeitos nocivos dos resíduos de plástico tem incentivado a busca por alternativas sustentáveis (Chambon *et al.*, 2023). Em Janeiro de 2018, o Parlamento da União Europeia apresentou medidas a serem tomadas até 2030 com intuito de inserir o plástico em uma economia circular, priorizando materiais sustentáveis não descartáveis e não tóxicos. A diretriz tem como alvo principal a redução de lixo, uma vez que 80 - 85% do material antropogênico identificado no ambiente marinho é composto por plástico derivado de petróleo e uma grande parcela deste é resultante de uso único (EUPPD, 2019). Um carácter que tange esta problemática são as incontáveis aplicabilidades dos artigos feitos de plástico no mercado contrariada por sua reduzida capacidade de degradação e reciclagem. Tais artigos podem ser fragmentados em partículas denominadas de microplásticos e nano plásticos, sendo estas notoriamente conhecidas por seu reduzido tamanho (> 5mm e 1 µm de diâmetro, respectivamente), fácil dispersão nos ambientes aquáticos e toxicidade inversamente proporcional ao tamanho destas (Kühn *et al.*, 2015; Conkle *et al.*, 2017; Primpke *et al.*, 2020). Em somatório a isto, a matriz destes polímeros, os produtos derivados de sua degradação, corantes e aditivos podem apresentar danos e toxicidade aos tecidos animais (Li *et al.*, 2020; Jin *et al.*, 2021). Durante o processo de produção, uso e descarte dos plásticos, alguns monômeros que não permanecem fortemente ligados aos polímeros do composto podem ligar-se a outras moléculas e difundir-se no ambiente, espalhando-se por exemplo através da água e ar. Alguns destes monômeros, como o bisfenol A, acrilamida, acrilonitrila, cloreto de vinil (PVC), formaldeído, estão presentes em diversos tipos de plásticos e, até o momento do estudo, são determinados como resíduos perigosos pelo Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), podendo apresentar efeitos como carcinogênese e mutações em células germinativas (European Parliament and Council, 2008; Lithner *et al.*, 2011). Outro efeito direto decorrente das partículas de plástico nos ecossistemas está relacionado com

desequilíbrio do crescimento de algumas comunidades de organismos, mais especificamente com o zooplâncton, uma vez que estes organismos são base alimentar dos ecossistemas marinhos e alterações no crescimento destes podem futuramente ter um impacto em níveis tróficos superiores (Ziajahromi *et al.*, 2017; Botterell *et al.*, 2018).

Ainda que todas as questões ambientais negativas sejam discutidas diariamente dentro da comunidade científica e grande mídia, devido a sua versatilidade, baixo custo de produção e durabilidade, os produtos derivados de plástico provenientes de origem fóssil ainda são de uso cotidiano e estão dispersos em diversas áreas, como no setor clínico, de embalagens, automotivo, agrícola e de construção civil.

## **1.2 Bioplásticos e o mercado**

Com a crescente demanda por alternativas que possam frear o uso de plástico derivado de petróleo e que sejam sustentáveis, os bioplásticos têm ganhado importância no mercado por serem derivados de fontes renováveis e/ou biodegradáveis e apresentam uma potencial alternativa para o problema. A definição de bioplástico é válida para plásticos biodegradáveis, os quais são digeridos por microrganismos em condições apropriadas, e para plásticos de origem biológica, sendo os últimos baseados em biomassa ou materiais de origem sustentável (Kjeldsen *et al.*, 2018; Fredi & Dorigato, 2021). Estima-se que a taxa de crescimento anual do mercado de bioplásticos seja de 18,8% entre os anos de 2023 até 2030, potencialmente atingindo US\$ 444.772,3 até no último ano da projeção (Biodegradable Plastic Market, 2020). Todavia, menos de 2.3 milhões de toneladas (Mt) de bioplástico foram produzidas em 2022, o que representa menos de 1% das 400.3 Mt de toneladas de plásticos totais neste mesmo ano (European Bioplastics, 2023). Ainda sim, a capacidade dos bioplásticos de cumprirem as mesmas e até mais funções do que de plásticos convencionais, baseados em fontes de carbono não renováveis tem impulsionado o crescimento deste mercado. Dentro deste mercado estão incluídos plásticos que são biodegradáveis mas não são de origem biológica, como o policaprolactona (PCL), e plásticos com base biológica, como polietileno (PE), polietileno furanoato (PEF), politereftalato de etileno (PET) e politereftalato de trimetileno (PTT). Entretanto, alguns tipos de bioplásticos são biodegradáveis e de origem biológica, como é o caso dos polihidroxialcanoatos (PHAs). Estes bioplásticos que possuem ambas as características são fortes candidatos a contribuir para um desenvolvimento sustentável. Atualmente, estes polímeros já são utilizados para a produção de embalagens, aplicações médicas, como próteses ósseas e cápsulas de entrega de droga, com potencial para serem

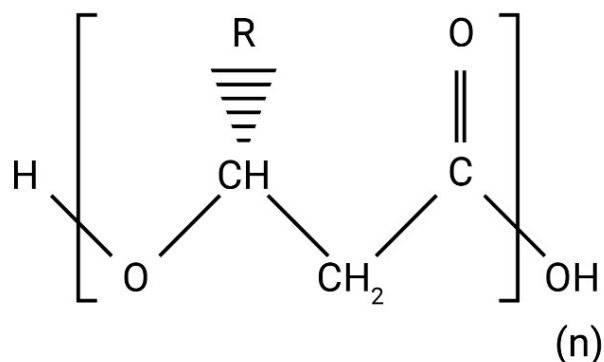
aplicados em terapia gênica. Devido a isto, os PHAs têm se mostrado bastante promissores para diversas aplicações e estudos científicos e são atrativos para economia circular (Kaniuk & Stachewicz, 2021).

### 1.3 Os polihidroxicanoatos e suas propriedades

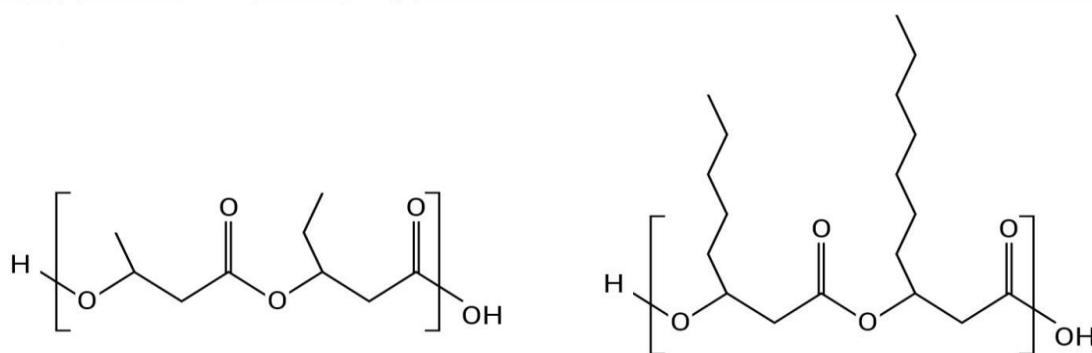
Os PHAs apresentam estrutura química de poliésteres alifáticos de origem natural e são classificados a partir do comprimento da cadeia e da quantidade de átomos de carbono por unidade de 3-hidroxicanoato, monômero base da cadeia dos polímeros (Figura 1). Monômeros constituídos por 3-5 átomos de carbono são considerados PHAs de comprimento de cadeia curta (do inglês, *short-chain-length*), sendo classificados como (*scl*)-PHA (Mitomo *et al.*, 1987; Steinbüchel & Valentin, 1995). A constituição monomérica variando entre 6-14 átomos de carbono classifica-os como PHAs de cadeia de comprimento médio (do inglês *medium-chain-length*) e cadeia de comprimento grande quando compostos por mais de 14 átomos (do inglês, *large-chain-length*) (Figura 2) (Steinbüchel & Valentin, 1995). As propriedades físico-químicas destes poliésteres variam de acordo com a fonte de carbono utilizada para a sua biossíntese a sua composição monomérica, sendo a variação do radical que está ligado ao monômero o principal fator que confere as características do polímero (Kumar & Kim, 2018). Monômeros ligados à molécula de metano (CH<sub>3</sub>) são denominados 3-hidroxi butirato e quando ligados ao radical etila (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), 3-hidroxi valerato. Uma vez polimerizados, os monômeros contendo a molécula de metano ou etila são denominados como polihidroxi butirato e polihidroxi valerato, respectivamente, sendo ambos considerados de (*scl*)-PHA (Figura 3). O arranjo de ambos em uma mesma conformação do polímero tem como resultado o copolímero poli-(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato) (PHBV) (Steinbüchel & Valentin, 1995). Para além da característica de serem biologicamente sintetizados, estes têm propriedades semelhantes às de plásticos compostos por polietileno ou polipropileno, sendo rígidos e maleáveis. Além disso, possuem a insolubilidade em água e termoplasticidade como propriedades químico-físicas atraindo a atenção para aplicações de moldes de injeção e extrusão de folhas plásticas. Todavia, ao contrário de plásticos derivados de fósseis, estes são biodegradáveis, renováveis e biocompatíveis. Estes são os casos da marca brasileira Biocycle e também da marca norte-americana Mirel, a qual também desenvolveram revestimentos para papel e cartão, *pellets* para o consumo de bactérias desnitrificantes durante o tratamento de água e embalagens (<https://www.metabolix.com>). Em alguns casos, a adição de outros (*scl*)-PHA podem modificar as características de um determinado PHA. Isso acontece com a relativa

baixa resistência ao impacto de PHB e que, quando misturados com monômeros de HV, resultam em um aumento desta resistência (Luzier, 1992; Braunegg *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2014).

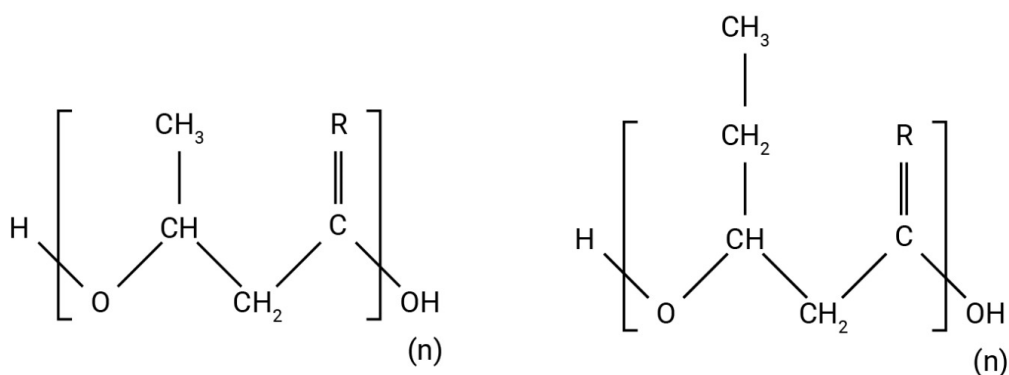
Dentro dos diversos tipos de bioplásticos, o PHB é um dos únicos, para além de amido termoplástico (TPS), a apresentar total biodegradação em todos os ambientes de acordo com os padrões internacionais de biodegradação, sendo eles ambiente marinho, de água de rio ou água doce, compostagem industrial e doméstica, solo, aterros sanitários, digestão anaeróbica aquática e não aquática. Embora alguns bioplásticos como o polihidroxiocetanoato (PHO) e polibutilenosuccinato (PBS) não apresentem total biodegradação em testes de compostagem caseira, quando misturados apenas com PHB, ambos apresentam resultado positivo na degradação. Além disso, a mistura de PHB com PHO resulta em total degradação de digestão anaeróbica e digestão anaeróbica caseira (Narancic *et al.*, 2018). Como em qualquer processo de degradação, os fatores físicos e químicos influenciam na taxa de decomposição dos materiais, tornando este processo não-linear. Entretanto, o fato do PHB ser degradado nos diversos ambientes ainda sim é um fator promissor se comparado aos artigos de plástico convencionais. Em relação à utilização destes biopolímeros em aplicações médicas, isto se deve ao fato de serem biologicamente compatíveis e a sua degradação ter como produto um constituinte natural da via de oxidação dos ácidos graxos em animais, o 3-hidroxi-butarato (Dedkova & Blatter, 2014; Mierziak *et al.*, 2021). Assim como a mistura de PHB com outras tipagens de plásticos biodegradáveis, o uma maior porcentagem de hidroxivalerato (HV) copolímero PHBV se mostrou mais efetivo para o uso em aplicações médicas devido a sua ótima compatibilidade celular e sanguínea (Bauer & Owen, 1988; Choi *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estrutura molecular geral dos PHAs. R: radical da cadeia lateral etila. (n) = número de unidades de repetição do monômero constituinte do polímero.



**Figura 2.** Estrutura dos polihidroxicanoatos de cadeia curta (à esquerda) e de cadeia média (à direita).



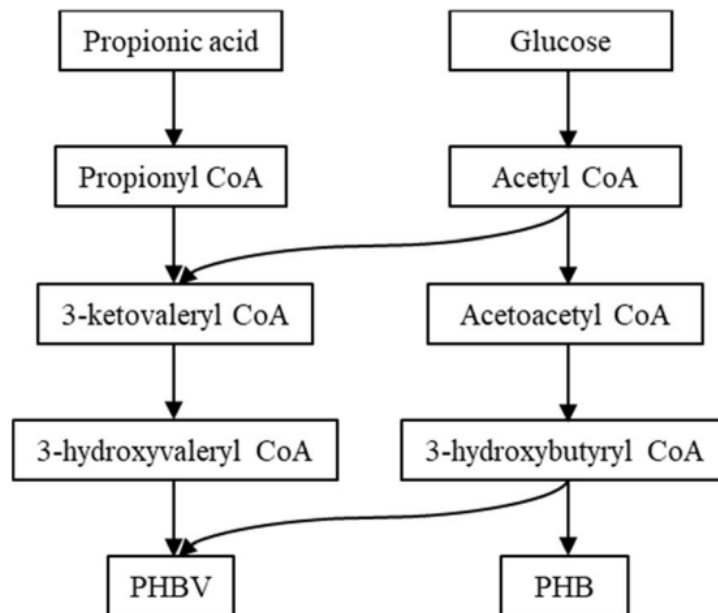
**Figura 3.** Fórmula molecular dos polihidroxitirato (PHB) à esquerda, com o radical metil ligado. (CH<sub>3</sub>) Fórmula molecular de polihidroxicanoato (PHV), com o radical etila ligado (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>).

#### 1.4 As principais vias de biossíntese dos PHAs

A síntese dos PHAs é de base biológica, derivada do metabolismo de organismos pertencente aos domínios *Bacteria* e *Archaea* e a exploração dentro destes procariontes tem se mostrado bastante promissora (Lin *et al.*, 2021). Essas vias metabólicas estão conectadas ao metabolismo celular primário, mas a biossíntese de PHA é derivada do metabolismo secundário (Alcântara *et al.*, 2020). Quando em condições de estresse celular e disponibilidade em excesso de fontes de carbono, estes biopolímeros são sintetizados pelos microrganismos em forma de grânulos insolúveis em água e armazenados no citoplasma como reserva energética, também chamados por carbonossomas (do inglês: *carbonosomes*) (Anderson & Dawes, 1990; Jendrossek, 2009).

As vias metabólicas e enzimas de produção destes tipos de PHAs produzidos por espécies de ambos os domínios têm sido amplamente estudadas mas maioritariamente no domínio *Bacteria*. Até o momento, foram identificadas ao todo 14 vias de produção de PHA, entretanto, apenas 5 destas vias estão relacionadas ao metabolismo natural das células e não são sintéticas ou foram geneticamente modificadas (Meng *et al.*, 2014). A via mais bem descrita da biossíntese é a de produção de PHB, relacionada à glicólise, uma vez que a quebra de um açúcar gera moléculas de acetil-CoA, precursor da via dos PHAs. Entretanto, em depleção de nutrientes em condições de estresse, a acetil-CoA pode não ser direcionada para o metabolismo central de carbono da célula, podendo ser então direcionada à síntese dos PHAs (Lin *et al.*, 2021). A partir desse processo, a síntese de PHB ocorre devido à condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA, sendo esta reação inicialmente catalisada pela enzima acetil-CoA acetiltransferase (PhaA), também conhecida por  $\beta$ -cetotiolase (Hong *et al.*, 2020). A partir do primeiro passo, o último produto resultante, a acetoacetil-CoA, é reduzida a (R)-3-hidroxiacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA reductase (PhaB) (Oeding & Schlegel, 1973; Haywood *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1990). O último passo da via é denominado polimerização, uma vez que uma enzima PHA-sintase (PhaC) utiliza (R)-3-hidroxiacetil-CoA como substrato e polimeriza polihidroxiacetilato (PHB), tendo como produto final um polímero de hidroxialcanoato (HA) e a liberação consecutiva de coenzima A (Figura 4) (Rehm & Steinbüchel, 2002). Em contrapartida, a biossíntese do copolímero PHBV necessita, para além de (R)-3-hidroxiacetil-CoA, da molécula de 3-hidroxiisovaleril-CoA. Por sua vez, a via tem o ácido propiônico como precursor da biossíntese, uma vez que este é utilizado para a produção de uma molécula de propionil-CoA, sendo esta condensada a 3-

cetovaleril-CoA pela enzima  $\beta$ -cetotiolase (*BktB*). Este último produto é então reduzido pela enzima acetoacetyl-CoA reductase (*phaB*) a 3-hidroxiacetyl-CoA e utilizado ao fim da via durante o processo de polimerização pela enzima *phaC* para produção de PHBV (Figura 4) (Steinbüchel *et al.*, 2003).

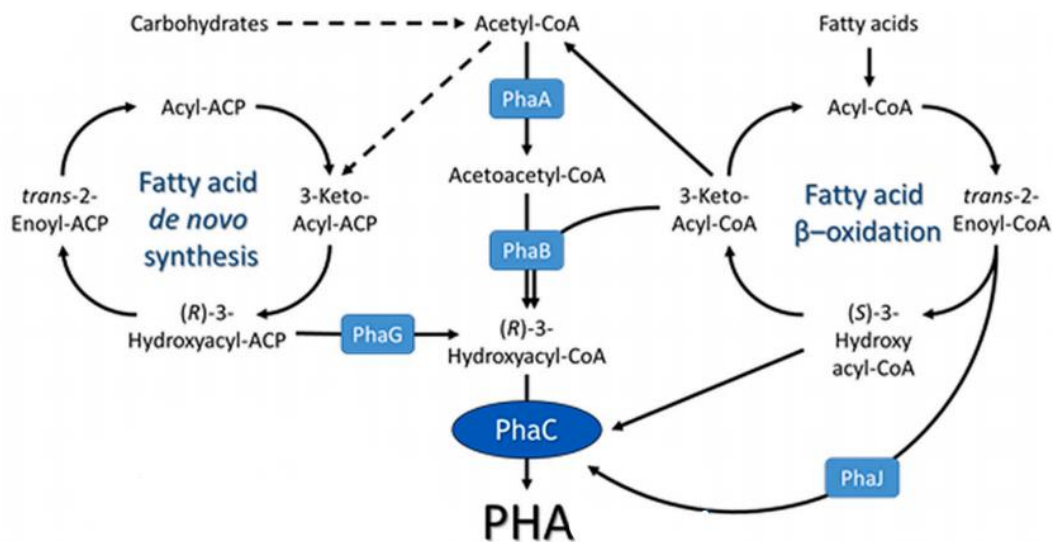


**Figura 4.** Vias metabólicas de PHBV e PHB. Adaptado de: Policastro *et al.*, 2021.

Para além da síntese de PHB, outras duas outras vias de produção natural de PHA já foram caracterizadas e estão indiretamente relacionadas com a via da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e da síntese *de novo* de ácidos graxos, devido ao fornecimento de intermediários destas vias à produção de PHAs (Meng *et al.*, 2014). A utilização de ácido graxo para a produção de acil-CoA inicia a via da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. A molécula de acil-CoA é então convertida em  $2\Delta$ -enoil-CoA e, esta última, é convertida a (S)-3-hidroxiacil-CoA. O último passo da via é realizado através da conversão de (S)-3-hidroxiacil-CoA a 3-cetoacil-CoA (Prieto *et al.*, 2015). Durante este processo, foram identificadas 3 conversões alternativas para a síntese de PHAs, sendo (R)-3-hidroxiacil o produto final como substrato utilizado por uma PHA-sintase. A conversão de  $2\Delta$ -enoil-CoA à (R)-3-hidroxiacil-CoA pode ocorrer através de catálise pela enzima (R)-Enoil-CoA hidratase, que quando relacionada a via de PHA, já foi nomeada de PhaJ (Figura 5) (Fukui & Doi, 1997; Tsuge *et al.*, 2003, Liu *et al.*, 2016). Caso (S)-3-hidroxiacil-CoA seja formada, esta pode ser convertida a (R)-3-hidroxiacil-CoA ao invés de 3-cetoacil-CoA, possibilitando a polimerização de PHA. Em contrapartida, se o ciclo é

contínuo até 3-cetoacil-CoA, 3-cetoacil (ACP) redutase, também denominada por FabG, pode catalisar a conversão do intermediário para o monômero precursor de PHA (Fiedler *et al.*, 2002). A formação de (R)-3-hidroxiacil-CoA é principalmente utilizada para a polimerização de (*mcl*)-PHA (Ren *et al.*, 2000). Assim como a via de PHB, a síntese de ácidos graxos *de novo* têm acetil-CoA como precursora do metabolismo, que é então convertida a malonil-CoA. O último intermediário é então convertido a malonil-ACP pela enzima FabD. Após a conversão, FabB e FabF convertem a molécula a 3-cetoacil-ACP que, através da catálise realizada por FabG, é convertida a (R)-3-hidroxiacil-ACP. A enzima FabA catalisa a reação de conversão de (R)-3-hidroxiacil-ACP para enoil-ACP. Enoil-ACP é convertida pela ação enzimática de FabI à acil-ACP. Estudos em *Pseudomonas sp.* indicaram a ação da enzima PhaG como catalisadora da reação de (R)-3-hidroxiacil-ACP à 3-hidroxiacil-CoA (Ren *et al.*, 2000).

A regulação desses processos metabólicos é complexa e depende das necessidades energéticas e de carbono da célula. Em resumo, enquanto as enzimas da  $\beta$ -oxidação estão envolvidas na degradação de ácidos graxos para produzir acetil-CoA, este último pode ser indiretamente um precursor chave para a síntese de monômeros de hidroxialcanoato usados na biossíntese de PHA. A síntese *de novo* de ácidos graxos está relacionada aos polihidroxialcanoatos em termos de fornecimento de precursores metabólicos. Ambos os processos ocorrem no contexto do metabolismo de lipídios e a síntese *de novo* de ácidos graxos também pode fornecer os precursores necessários para a produção de polímeros PHA. No entanto, é importante salientar que as vias específicas e as enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos e na biossíntese de PHA são distintas.



**Figura 5.** As principais vias metabólicas da síntese de PHA. Adaptado de: Obruča *et al.*, 2022.

### 1.5 As proteínas relacionadas aos grânulos de PHA e demais proteínas

O metabolismo dos PHAs é decorrente da atividade de diversas enzimas e outras proteínas. Segundo a classificação proposta por Pötter & Steinbuchel (2005) até o momento existem 4 classes de proteínas associadas aos grânulos (do inglês, *granule-associated proteins* (PGAPs) de PHA já detectadas: PHA-sintases (i), PHA-depolimerases (ii), Fasinas (iii) e o regulador da expressão da fasina PhaR (iv).

As enzimas PHA-sintases têm sido amplamente estudadas há mais de 30 anos e são as enzimas mais bem descritas dentro do metabolismo dos PHAs. Estas enzimas são fundamentais para a formação do polímero a partir dos monômeros e durante a formação dos grânulos estas estão ligadas aos PHAs (Chek *et al.*, 2017; Check *et al.*, 2020). Como resultado do esforço dos cientistas, foram detectadas diversas sintases entre diferentes espécies em ambos os domínios. Até o momento estas enzimas são separadas em quatro classes, sendo agrupadas a partir da especificidade do substrato, composição das subunidades e com base na estrutura primária (Rehm, 2003). A especificidade da enzima pelo substrato define a composição do poliéster (Meng *et al.*, 2014). As duas primeiras classes possuem apenas uma subunidade, denominada PhaC, e seu peso molecular foi determinado entre 60-77 kDa. Todavia, a diferença entre elas se dá ao fato do produto final da polimerização ser distinto. O substrato da classe I é (R)-hidroxiacil-CoA, resultando em um (*scl*)-PHA. Descritas em espécies de *Pseudomonas*, as

enzimas da classe II polimerizam o (*mcl*)-PHA, uma vez que a molécula de (R) - hidroxiaxil-CoA, seu substrato específico, é composta por 6 a 14 carbonos (Wang *et al.*, 2007). As enzimas de classe III e IV possuem duas subunidades e, semelhante às classes I e II, também são compostas de uma subunidade PhaC (de aproximadamente 40 kDa) mas, diferente das enzimas de classe II, estas polimerizam (*scl*)-PHA. Em adição, a classe III das enzimas é composta por uma subunidade PhaC e outra PhaE (40 kDa) e a classe IV por PhaC e PhaR (20 kDa) (McCool & Cannon, 2001). Todavia, ao contrário das espécies bacterianas, pouco é sabido sobre enzimas de arqueas que têm como função o metabolismo de PHAs. Para além da identificação *in vivo*, estas ainda não estão bem descritas molecularmente e geneticamente no domínio *Archaea*. Por sua vez, em algumas das poucas espécies já estudadas, estas apresentaram similaridade com sintases bacterianas, principalmente com a classe III, onde duas subunidades são necessárias para a polimerização de PHA (Han *et al.*, 2007). Estas subunidades são nomeadas phaC e phaE, e embora sejam semelhantes funcionalmente às bacterianas, o nível de identidade, peso molecular e sequência de aminoácidos entre elas diferem substancialmente. Desta maneira, os autores propõem estas enzimas, amplamente difundidas em haloarquéias, como um subtipo de PhaC de classe III (Han *et al.*, 2010; Quillaguamán *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2019) identificaram não somente os genes *phaE* e *phaC* que codificam para as enzimas PhaE e PhaC na espécie *Haloarcula hispanica* mas também *phaB*, codificador da enzima acetoacetyl-CoA reductase. Apesar disso, ainda não há extensa clareza sobre a produção de PHAs e de todas as enzimas envolvidas em seu metabolismo nos diferentes géneros de arqueias. Além disso, estudos demonstraram o acúmulo de (*scl*)-PHA em diversas espécies de procariontes, mas até o momento foram identificadas poucas espécies produtoras de (*mcl*)-PHA. Todavia, nenhum organismo foi identificado como produtor de (*lcl*)-PHA (Obruča *et al.*, 2022). Embora algumas enzimas associadas à síntese dos PHAs já estejam mais elucidadas, como phaC, outros genes e enzimas ainda são uma incógnita (Peoples & Sinskey, 1989). Em contrapartida, outras enzimas associadas aos grânulos ainda não tiveram suas funções e características moleculares totalmente descritas.

Dentro do grupo das depolimerases, já foram identificadas PHA-depolimerases intracelulares e extracelulares (Merrick & Doudoroff, 1964). Estas últimas citadas são produzidas por organismos que degradam PHA presente no ambiente, muitas vezes liberados pela morte celular de microrganismos produtores destes polímeros. Desta maneira, com a degradação extracelular, o carbono antes aprisionado e utilizado pelas células produtoras pode assim retornar ao ambiente como parte do ciclo do carbono, sendo que a degradação deste tem como produto final dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (Lee, 2000; Morohoshi *et al.*, 2018;

Suzuki *et al.*, 2020). Em contrapartida, as enzimas depolimerases intracelulares associadas aos grânulos, são também identificadas por PhaZ. Ao contrário de PhaC, na espécie *Paracoccus denitrificans*, as enzimas PhaZ se mostraram responsáveis pela degradação dos polímeros de 3-hidroxibutirato (HB) (Gao *et al.*, 2001). Uma vez que os polihidroxialcanoatos são biodegradáveis e desempenham o papel de reserva de carbono e de energia nos microrganismos produtores, por consequência, as enzimas depolimerases podem estar relacionadas à mobilização dos grânulos de molécula energética. Na espécie *Ralstonia eutropha* foi demonstrado que, quando as condições requerem o uso deste material de reserva, PhaZ hidrolisa as ligações ésteres dos polímeros em oligômeros ou monômeros liberando dentro da célula moléculas de 3HB para o uso microbiano (Saegusa *et al.*, 2001). Vale ressaltar que, embora ambas as enzimas degradam PHA, as PHA-depolimerases intracelulares não conseguem degradar o PHA externo e o contrário também é válido para o PHA intracelular pelas enzimas extracelulares. Isto se deve ao fato das características físicas dos polímeros quando dentro ou fora das células. O PHA externo é mais cristalino e desnaturado quando comparado ao interno. Essas características parecem ser o ponto chave para a atividade catalítica das diferentes enzimas (Jendrossek *et al.*, 1996).

As proteínas conhecidas como fasinas (do inglês, *phasin*) (PhaP) foram isoladas em grandes quantidades sob a superfície de grânulos de PHA dentro do domínio das bactérias. Além disso, a identificação só foi possível em estirpes produtoras de PHA, não sendo encontradas em não-produtoras (Wieczorek *et al.*, 1995). Quase 20 anos mais tarde, estas proteínas foram identificadas e sua função foi caracterizada na espécie modelo de produção de PHA dentro do domínio *Archaea*, em *Haloferax mediterranei*. Através do desligamento e complementação de genes em estirpes selvagens e mutantes, o estudo foi capaz de demonstrar a relação destas proteínas com o acúmulo de PHA intracelular. Em estirpes mutantes, foi identificado menor quantidade de grânulos e em grande parte, todo o PHA intracelular estava contido em apenas um grânulo, sugerindo que PhaP também pode estar ligada a biossíntese, acúmulo e formação de grânulos. Até antes do estudo realizado por Bresan *et al.*, 2016, a hipótese levantada era que, os grânulos de PHA continham uma camada superficial de fosfolípidos, de maneira que estas moléculas isolavam estes grânulos altamente hidrofóbicos do citoplasma. Todavia, estudos comprovaram que os grânulos de PHA são compostos pelos monômeros sintetizados a partir de PhaC (em média 95%) mas não possuem fosfolípidos na sua composição. Também foi identificado que os demais 5% dos constituintes de PHA são de origem proteica e que uma grande parcela destas é caracterizada pelas fasinas, as quais fornecem ações surfactantes (Bresan *et al.*, 2016).

Assim como algumas PhaC dentro das haloarqueas, esta proteína foi identificada através de BLASTp e análise filogenética como conservada e exclusiva dentro da classe (Cai *et al.*, 2012). Em *R. eutropha*, mutantes de PhaP também apresentaram apenas um grânulo intracelular e a taxa de biossíntese de PHA foi menor quando comparadas às estirpes selvagens (Wieczorek *et al.*, 1995). Em contrapartida, as células que superexpressam genes de PhaP apresentaram diversos pequenos grânulos de PHA (Pötter *et al.*, 2002). Em um ensaio enzimático *in vitro* com PhaC de classe II de *Pseudomonas aeruginosa*, a adição de fasina aumentou a atividade enzimática específica da sintase (Qi *et al.*, 2000).

Semelhante às proteínas fasinas, o regulador da expressão de PhaP (PhaR) também liga-se à superfície dos grânulos de PHB. Estudos conduzidos em *R. eutropha* demonstraram que o mecanismo de regulação de PhaP por PhaR iniciava-se quando as condições não estavam favoráveis à produção de PHB. Inicialmente, o regulador não se ligava aos grânulos e sua concentração no citoplasma aumentava. Uma vez que PhaR estava livre, esta se ligava à região promotora de *phaP*, inibindo a expressão deste gene. Em condições favoráveis e com o início da polimerização de PHB por PhaC, PhaR também se ligava aos grânulos e, concomitantemente, sua concentração no citoplasma diminuía. Como consequência da baixa concentração de PhaR, os genes *phaP* foram expressos e proteínas PhaP foram encontradas associadas aos grânulos. Isso porque, conforme o grânulo atinge o seu volume máximo, as proteínas PhaP tomam o lugar de PhaR, sendo a última liberada ao citoplasma, atingindo elevados níveis de concentração e voltando ao estágio inicial do controle de transcrição de PhaR (Pötter *et al.*, 2002; Pötter *et al.*, 2004; Pötter & Steinbuchel, 2005). Assim como no caso das sintases, uma PhaR encontrada em *H. mediterranei* apresentou-se filogeneticamente distinta das proteínas encontradas em bactérias. Quando proteínas associadas aos grânulos foram isoladas, a identificação de uma proteína de tamanho pequeno foi caracterizada como GAP12 e, posteriormente, foi identificada a transcrição do gene *gap12* em conjunto com *phaP*, sendo nomeado o operon *gap12-phaP*. Curiosamente, o operon de *gap12-phaP* está localizado logo acima do operon referente à *phaE-phaC*. Uma vez que a parcela C-terminal da proteína GAP12 apresentou um domínio putativo de ligação ao DNA, podendo a proteína ter uma função de regulação e, como resultado, o operon foi renomeado para *phaRP* (Cai *et al.*, 2015; Cai *et al.*, 2012).

Embora ainda não se tenha clareza sobre como ocorre a síntese de ácidos graxos em algumas espécies produtora dentro do domínio Archaea, enzimas participantes desta via em bactérias já foram identificadas em algumas espécies de arqueias (Pugh *et al.*, 1971; Falb *et al.*, 2008; Slobodkina *et al.*, 2009; Dibrova *et al.*, 2014). Exemplo disto são as enzimas Enoil-CoA

hidratases, muitas vezes denominadas MaoC ou PhaJ. Embora estas enzimas não estão relacionadas aos grânulos, estas já foram vinculadas à síntese de PHBV em arqueias e também à mobilização de PHA (Liu *et al.*, 2016). Em algumas espécies, a identificação da enzima Enoil-CoA hidratase (PhaJ) demonstrou uma ligação a síntese e mobilização de PHA através da biossíntese de ácidos graxos. Isso porque, em *H. mediterranei*, esta enzima catalisa a desidratação do monômero (R)-3-hidroxiacil-CoA convertendo-o a enoil-CoA. Uma vez que enoil-CoA é um intermediário da via da  $\beta$ -oxidação e (R)-3-hidroxiacil-CoA um produto da degradação de PHA, enoil-CoA pode participar da mobilização de PHA nestas células (Liu *et al.*, 2016). Na espécie *Aeromonas caviae*, o caminho oposto foi identificado. A produção de (R)-3-hidroxiacil-CoA a partir de enoil-CoA foi catalisada pela enzima PhaJ (Fukui *et al.*, 1998).

## 1.6 Extremófilos e seus bioprodutos

Organismos que colonizam ambientes caracterizados por condições extremas para a vida humana são denominados extremófilos (do grego, *philo* = amante) e são encontrados nos três domínios da vida. Entretanto, são majoritariamente identificados dentro do grupo dos procariontes (Rothschild & Mancinelli, 2001). Os fatores que influenciam estes ambientes são de ordem física e química, resultando muitas vezes em estresse celular, uma vez que a grande parte dos organismos vivos não tolera estes tipos de condições (MacElroy *et al.*, 1974, Rothschild & Mancinelli, 2001). Devido ao seu rápido crescimento e à utilização na indústria de processos baseados em extremos de temperatura, pH, salinidade e exposição à radiações, a utilização de microrganismos extremófilos tem se mostrado promissora. Grande parte dos atuais processos industriais e biotecnológicos são realizados sob condições extremas, de forma que as enzimas e demais compostos metabólicos produzidos pelos microrganismos extremófilos — extremozimas e extremólitos — oferecem oportunidades à indústria biotecnológica, podendo ser aplicados sob as condições extremas necessárias aos processos industriais (Raddadi *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015; Boehmwald *et al.*, 2016). Exemplos de compostos isolados de microrganismos extremófilos podem ser encontrados nas mais variadas aplicações de processos biotecnológicos, desde a biotecnologia industrial até a biotecnologia ambiental e a farmacêutica (Raddadi *et al.*, 2015). De maneira a evitar a perfuração da membrana celular devido aos cristais de gelo formados a temperaturas inferiores a 0 °C, organismos psicrófilos habitam regiões frias, como o continente Antártico, regiões de *permafrost* e lagos congelados alterando o ponto de congelamento da água. Destes organismos,

já foram isoladas proteínas anticongelantes aplicadas atualmente na indústria (Duman & Olsen, 1993, Johnson *et al.*, 2007, Franco *et al.*, 2017, Bendia *et al.*, 2018, Romanowicz *et al.*, 2023). Alguns organismos já foram identificados em ambientes com níveis de temperatura próximas ao ponto de ebulição da água. Usualmente, a desnaturação proteica, alta permeabilidade da membrana celular e danos no material genético são resultados do impacto de altas temperaturas em organismos termófilos e hipertermófilos (Peak *et al.*, 1995; Jaenicke, 1996). Exemplo disto é o microrganismo hipertermófilo - organismos capaz de operar metabolicamente e crescer em temperaturas superiores a 80 °C - *Thermus aquaticus* produtor de uma enzima DNA polimerase termoestável. A espécie pioneira foi primeiramente identificada em gêiseres do Parque de Yellowstone, nos Estados Unidos, e deu origem aos estudos de extremófilos (Brock & Freeze, 1969). Devido a estabilidade em altas temperaturas, esta enzima é amplamente aplicada em biologia molecular em reações de PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) (Chien *et al.*, 1976). Em somatório, já foram identificados organismos capazes de tolerar outros parâmetros físicos como a alta incidência de diferentes tipos de radiações. Essas radiações podem causar danos às ligações químicas das moléculas de ácido nucleico, levando à formação de dímeros em algumas bases nitrogenadas, bem como interagir com as moléculas de água dentro das células, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, reactive oxygen species em inglês) que têm o potencial de desestabilizar proteínas, lipídios e DNA. No entanto, esses organismos possuem mecanismos altamente eficientes de reparo de DNA, além de produzirem extremólitos e extremoenzimas - metabólitos e enzimas derivadas de organismos extremófilos, respectivamente - que contribuem para sua capacidade de sobreviver em ambientes extremos.(Besaratina *et al.*, 2005, Daly *et al.*, 2010, Cox & Battista, 2005). Tais organismos são encontrados frequentemente habitando desertos ou fontes hidrotermais de águas profundas, ambientes sujeitos a elevada exposição à radiação (Anderson *et al.*, 1956, Dean *et al.*, 1966, Jolivet *et al.*, 2003, Robinson *et al.*, 2011). Não o bastante, organismos capazes de proliferarem em altas pressões constituem o grupo dos piezófilos, como é o caso de microrganismos isolados da depressão mais profunda atualmente conhecida, a Depressão Challenger, situada a mais de 10 quilômetros de profundidade nas Fossas Mariana. Estes microrganismos são piezófilos obrigatórios, tendo como requisito mínimo 50 MPa para crescimento e apresentando crescimento a 100 MPa (Kato *et al.*, 1998). Por consequência de alterações nos parâmetros físicos e/ou químicos, alguns ambientes podem apresentar mais de uma condição extrema, de maneira que apenas indivíduos capazes de superar as pressões seletivas deste meio é que são capazes de proliferar, sendo estes organismos denominados de poliextremófilos (Zoumplis *et al.*, 2023; Cordero *et al.*, 2022; Merino *et al.*, 2019; Cary *et al.*, 2010).

## 1.7 Halófilos

A disponibilidade de água é crucial para o desenvolvimento da vida. Devido às interações químicas entre solutos e este solvente, esta disponibilidade pode ser alterada e os organismos presentes no ambiente precisam estar adaptados para sobreviverem e prosperarem nestas condições (Rothschild & Mancinelli, 2001). Microrganismos capazes de sobreviver em condições de oligotrofia já apresentaram crescimento em água destilada (Favero *et al.*, 1971). Seguindo este gradiente, a tolerância em água contendo alguma porcentagem de NaCl já foi identificada, entretanto, a maioria destes organismos apresenta crescimento ótimo em ambientes sem dissolução de NaCl e, portanto, não requerem a sua presença para o crescimento, são estes organismos denominados de halotolerantes. Em contrapartida, organismos que requerem íons de sódio em uma porcentagem de NaCl igual ou superior a concentração da água do mar e são metabolicamente ativos, apresentando crescimento e divisão, são classificados como halófilos. Dentro deste grupo, os organismos com crescimento ótimo entre 3 a 15% de NaCl são agrupados entre os halófilos moderados. Organismos que necessitam de concentrações entre 15% e 30% são considerados halófilos extremos e são predominantes no domínio *Archaea* (Kushner, 1978). Até o momento, a maior porcentagem de salinidade a qual um organismo apresentou crescimento foi a 35%, por *Halarsenatibacter silvermanii strain SLAS-IT*, isolada no Searles Lake (CA, Estados Unidos) (Blum *et al.*, 2009). Todavia, mesmo que raramente, organismos do domínio Eukarya também são encontrados em concentrações de sal superiores à saturação de NaCl, como a espécie de alga *Dunaliella salina* (Oren, 2014). No entanto, entre os organismos encontrados em ambientes altamente salinos, a maioria destes está dentro do domínio das *Archaea* e secundária em *Bacteria*. Em condições não “normais” como estas, a maquinaria celular de não halófilos - grande parte dos organismos cientificamente já estudados - não é apta a funcionar e estas não são capazes de sobreviver. Os ambientes salinos foram formados a partir de processos geológicos durante milhares de anos, de maneira que os organismos aptos a prosperarem nestes ambientes provavelmente foram sujeitos a superarem pressões seletivas impostas pelo meio a partir de mecanismos de adaptação fisiológicas concomitantemente (Rothschild & Mancinelli, 2001; Calado & Brandão, 2009). Os principais efeitos da alta salinidade estão relacionados à força iônica e à pressão de turgor (Rothschild & Mancinelli, 2001). Os mecanismos de adaptação osmótica dos organismos halófilos consistem no acúmulo de osmólitos orgânicos intracelular (1) ou em incorporar sal no citoplasma (2), sendo o último conhecido como “*salt-in*” e muito bem descrito

em arqueias. O acúmulo de solutos osmorregulatórios auxilia a manter o interior celular ausente de NaCl e mantém um balanço hídrico positivo. Estes solutos são compatíveis com o metabolismo das células e auxiliam na homeostase celular (Galinski 1995; da Costa *et al.* 1998; Ventosa *et al.* 1998). Além disso, organismos que conseguem expulsar o sal de dentro das células conseguem suportar ambientes contendo diferentes concentrações de sais (Oren, 2011). Ao contrário deste recém citado, o mecanismo de “*salt-in*” consiste no acúmulo de íons específicos, como o caso de potássio (K). A concentração intracelular desses íons é mantida em níveis elevados, em comparação com o ambiente externo, ajudando a evitar a perda de água da célula para o meio ambiente salino. Além disso, neste último exemplo, as proteínas intracelulares possuem adaptações, como carga negativa devido ao excesso de aminoácidos ácidos em relação aos resíduos básicos, de maneira a proteger a hidratação de moléculas essenciais para o funcionamento celular diante de ambientes altamente iônicos (Oren, 2011). Os ambientes de salinas são habitats comuns para alguns destes organismos. Para além dos efeitos decorrentes da alta concentração de sal, os altos níveis de radiação e a baixa concentração de água líquida disponível apresentam condições severas para a manutenção da vida celular (Oren, 2013). Portanto, os microrganismos halófilos muitas vezes são descritos como poliextremófilos e prosperam sob estas condições através da produção de metabólitos capazes de conter moléculas de água e sob a produção de carotenóides. Estes bioprodutos têm impulsionado aplicações biotecnológicas e estudos científicos (Giani & Martínez-Espinosa, 2020; Frösler *et al.*, 2017).

### **1.8 Os PHAs e os halófilos**

Os grânulos de PHAs foram identificados pela primeira vez em 1926 por Lemoigne, na espécie *Bacillus megaterium* (McCool *et al.*, 1996). Quase 50 anos depois, em 1972, estas inclusões celulares foram descritas dentro do domínio *Archaea* (Kirk & Ginzburg, 1972). Recentemente, estudos têm relacionado o acúmulo de PHA a uma melhor performance quando estas células estão sob condições de estresse celular. Embora recente, é atualmente reconhecida a opinião de que os PHA demonstram ser protetores contra esses fatores de estresse, acarretando inúmeras aplicações biológicas e biofísicas às células. Estas, de maneira sinérgica, contribuem para a melhoria geral da aptidão e robustez das células que contêm PHA. Além disso, é notável que vários autores tenham demonstrado que alguns desses efeitos protetores não estão necessariamente ligados à mobilização do PHA, mas sim à mera presença dos grânulos de PHA no citoplasma celular (Obruča *et al.*, 2018; Sedlacek *et al.*, 2019). Vários

estudos realizados com microrganismos extremófilos, especialmente em termófilos e halófilos, têm evidenciado uma diversidade de espécies capazes de acumular polihidroxialcanoatos (PHA) em condições extremas (Koller, 2017; Obruča *et al.*, 2022). A partir da análise de 427 proteomas de referência de arqueias foi igualmente corroborado que os PHAs apresentam uma estreita conexão com arqueas halofílicas, as quais se caracterizam por um tamanho de proteoma ampliado e um conteúdo de GC mais elevado. Desta maneira, a produção de PHA parece ser uma característica compartilhada dentro deste grupo (Wang *et al.*, 2019). Os microrganismos já descritos como produtores destes biopolímeros no domínio *Archaea* encontram-se no ramo das haloarqueias, sendo pertencentes a diversos géneros como: *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halorubrum* e *Halobacterium*, sendo a espécie modelo para a produção de PHA dentro do domínio das archaeas *Haloferax mediterranei* (Kirk & Ginzburg, 1972; Hezayen *et al.*, 2000; Alsafadi & Al-Mashaqbeh, 2017; Karray *et al.*, 2021). As espécies deste grupo são conhecidas pela característica particular de habitarem e dependerem de ambientes saturados de sal, atingindo concentrações de 1,5–5 M NaCl, sendo as haloarchaeas designadas de halófilas extremas (Rothschild & Mancinelli, 2001). Como resultado de milhares de anos de pressão seletiva sobre estes organismos, algumas espécies como *Haloarcula marismortui* e *Haloarcula vallismortis* são capazes de prosperarem no extremo inóspito Mar Morto e no Vale da Morte, respectivamente (Gonzalez *et al.*, 1978; Oren *et al.*, 1990). Não o bastante, *Halorubrum tebenquichense* foi isolado na Laguna Tebenquiche, recebendo altos níveis de radiação, característica comum dos diferentes sítios do deserto do Atacama (Lizama *et al.*, 2002). Originalmente isolada a partir de uma amostra de bacalhau salgado, em 1922, a espécie *Halobacterium salinarum* foi primeiramente descrita (DasSarma *et al.*, 2001; Eichler, 2023). Estas espécies foram primeiramente isoladas nestes ambientes, mas diversos estudos já revelaram a presença destes microrganismos em vários outros ambientes, todos eles compartilhando a mesma característica: a elevada salinidade (Thombre *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2020).

Devido a utilização de fontes de substrato dispendiosas, processo de esterilização rigoroso e elevado custo do processo para a obtenção do produto final, a produção de PHA atualmente ainda não é largamente competitiva se comparada às de plástico derivado de petróleo. No entanto, a utilização de haloarqueias demonstra uma possibilidade de redução no custo de processos de esterilização (Mitra *et al.*, 2020). Uma vez que elevadas concentrações de sais são cruciais para o crescimento ótimo de microrganismos halofílicos e a maior parte de organismos não cresce nem sobrevive em tais limites fisiológicos, o risco de contaminação por demais microrganismos é baixo, o que torna os halófilos bons candidatos para os processos

industriais (Rothschild & Mancinelli, 2001), contribuindo com uma redução final do custo de produção de polihidroxialcanoatos. Em adição, o acúmulo de PHAs em diferentes gêneros de archaeas halofílicas teve a utilização de substratos de baixo custo como fontes de carbono. Como exemplo disso, já foram utilizados glicose, glicerol, amido e até mesmo derivados de resíduos de tratamento (Legat *et al.*, 2010; Karray *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2021). Além disso, os métodos mais comumente utilizados para a extração de PHA são realizados a partir de processos custosos monetariamente e de considerável impacto ambiental. Igualmente, as células halofílicas estão constantemente sob estresse osmótico, de maneira que a obtenção dos PHAs pode ser realizada a partir da lise celular quando expostas à água destilada, reduzindo fortemente o custo do processo de *downstream* em uma escala industrial e apresentando uma possibilidade mais ecológica (Tan *et al.*, 2014). Outro ponto que vale ser ressaltado são as águas de salmouras ou águas residuais salgadas que poderiam promover o crescimento de halófilos e assim contribuir com o custo de produção destes biopolímeros (Simó-Cabrera *et al.*, 2021). Por isso, a exploração de novas estirpes halofílicas como produtoras de PHA pode representar um avanço na produção de PHAs e contribuir para uma economia circular.

### **1.9 Extração e detecção de PHA**

A obtenção de biopolímeros de PHA é possível através da utilização de diversas técnicas de extração, sendo estas adaptadas de acordo com a estirpe em estudo, devido às diferenças fisiológicas, composição celular e condições de crescimento, o tipo de PHA de interesse e solventes disponíveis (Koller *et al.*, 2013a).

Para a extração de PHB muitas vezes a utilização de hipoclorito de sódio e solventes como etanol, acetona e clorofórmio se faz necessária. O hipoclorito de sódio é largamente conhecido e aplicado no uso cotidiano devido a suas propriedades bactericidas. Por ser um elemento reativo, em algumas ocasiões, o cloro pode estar quimicamente instável e interagir com os componentes essenciais da bicamada lipídica da membrana celular, tais quais lipídios e proteínas. Desta maneira a estabilidade das células são afetadas e têm como resultado a lise celular (Köhler *et al.*, 2018; WHO, 2019; Da Cruz Nizer *et al.*, 2020). Com a célula rompida, o extravasamento de organelas, proteínas, ácido nucleico e metabólitos intracelulares ocorre. Devido a este fator, a utilização de solventes como acetona e álcool se faz necessária em alguns passos do processo de extração de determinados metabólitos e biomoléculas. Ambos solventes interagem com os detritos celulares resultantes da biomassa recém rompida e solubilizam tais impurezas resultando em uma purificação do extrato. Em contrapartida, vale ressaltar que a

ação do etanol e da acetona vai além deste tratamento, ela também atua reduzindo a solubilidade das moléculas de PHAs e preservando o extrato de interesse (Koller *et al.*, 2013b). Uma vez que o PHA foi tratado, a adição de clorofórmio ao extrato é utilizada para dissolver PHAs. Com a adição do clorofórmio, os grânulos de PHA tornam-se solúveis, com alto percentual de pureza e baixa degradação. Para a obtenção do extrato, a total evaporação do clorofórmio é crucial (Hahn *et al.*, 1994). O clorofórmio apresenta um ponto de ebulição próximo a 60 °C (National Center for Biotechnology Information, 2023), todavia este é um composto volátil, facilitando o passo final da extração.

Uma vez que o extrato de PHB é obtido, algumas metodologias podem ser utilizadas para quantificar o polímero. Exemplo disso é o Ensaio do ácido crônico (do inglês, *Crotonic acid assay*). A adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ao extracto e posteriormente aquecido converte PHB em ácido crotônico e este pode ser detectado a partir de espectrofotometria via absorção ultravioleta (UV) (Law & Slepecky, 1961), tornando possível confirmar a produção deste PHA por uma determinada estirpe.

## **2.0 Metagenômica**

Desde a implementação do sequenciamento de primeira geração, popularmente conhecido como método Sanger, ocorreram importantes transformações e progressos na área. Além do sequenciamento de genomas individuais, as técnicas de metagenoma vieram a contribuir acrescentando bastante informação ao conhecimento científico a nível de diversidade microbiana em vários ambientes. Primeiramente, o termo metagenômica foi relacionado a uma série de técnicas e processos para conseguir acessar os microrganismos não cultiváveis do solo ao seu nível metabólico. O metagenoma foi então definido por Handelsman *et al.* (1998) como “a metodologia para clonagem e análise funcional dos genomas coletivos da microflora do solo, que chamamos de metagenoma do solo”. Com o desenvolvimento das técnicas, hoje a definição é mais ampla, pois, a partir de uma pequena amostra ambiental, é possível o estudo de todo o material genético recuperado dentro desta amostra (Handelsman, 2005). Dentro do que se é conhecido por “ômicas”, o estudo do metagenoma é baseado no DNA amostral, sendo capaz de ir além do estudo de apenas um indivíduo singular e estudar a amostra a nível de uma comunidade (Tyson *et al.*, 2004). Para além disso, vale a ressaltar que para estes estudos em microbiologia ambiental, estes métodos são independentes de cultivo (Handelsman *et al.*, 1998). Outra vantagem interessante destas técnicas é a capacidade de superar o que na microbiologia foi descrito como “a grande anomalia da contagem em placas”,

onde o resultado do crescimento microbiano em placas apontavam para uma significativa disparidade entre os tamanhos populacionais estimados por distintos métodos de quantificação. Em alguns casos, como em amostras de solo, a porcentagem de bactérias cultiváveis em relação ao número total de células observadas ao microscópio chegava a 0,3% (Torsvik *et al.*, 1990). Não o bastante, a recuperação de microrganismos via técnicas de cultivo só é capaz de recuperar células viáveis, perdendo muita informação sobre as demais células que habitam ou já habitaram um determinado ambiente. Se as técnicas de recuperação e contagem forem comparadas ao uso da metagenômica, a recuperação da informação biológica é extraordinariamente baixa se comparada ao que se pode resgatar a partir do uso de técnicas de metagenômica (Kogure *et al.*, 1979, Staley & Konopka, 1985; Handelsman, 2005). Com a utilização destas ferramentas, é possível, a partir de amplificação e clonagem de genes marcadores filogenéticos, realizar um levantamento da diversidade microbiana das populações dentro de uma comunidade (Schmidt *et al.*, 1991). Para além da identificação da composição da comunidade, a partir da construção de uma biblioteca derivada do metagenoma, é possível detectar a análise funcional de genes de microrganismos não cultiváveis, como a identificação de genes codificantes para enzimas específicas (Healy *et al.*, 1995; Venter *et al.*, 2004). Portanto, os objetivos dos estudos de metagenoma são inúmeros e podem ser direcionados a conhecer o potencial metabólico de uma comunidade microbiana e também utilizá-lo para a bioprospecção de microrganismos.

## **2.1 Salina de Rio Maior, Portugal**

Através do manejo, uso e manutenção antropogênica, a Salina de Rio Maior, localizada no distrito de Santarém em Portugal, é conhecida pela sua contribuição turística e econômica devido à produção de sal. A sua utilização é datada em documentos em 1.117 d.c, mas com pistas de existência nos séculos VIII. Nesta região central do país, foram registradas águas com alta concentração de cloreto de sódio e, como o caso de Rio Maior, superiores à concentração no Oceano Atlântico. A salina está localizada no interior de Portugal, a mais de 30 km da região litorânea, e está relacionada ao processo de transgressão marinha que ocorreu durante o Jurássico inferior. Todavia, diferente do que é recorrente, esta é conhecida pela denominação de “salina interior”, uma vez que a água a qual fornece os sais minerais não é marinha e sim de água doce provinda do subterrâneo, água doce esta que perpassa uma mina de sal gema dando origem a água salgada utilizada na produção do sal nesta salina (Zbyszewski & Barreto de Faria, 1971; Calado & Brandão, 2009). O processo de evaporação é crucial na formação de sal.

A água salgada é direcionada para os cristalizadores, tanques rasos onde a água é exposta ao sol e ao vento. À medida que a água evapora, os sais dissolvidos concentram-se, formando cristais de sal que são utilizados nas atividades econômicas (Finlayson *et al.*, 2018).

A partir de uma amostra coletada em 2019 na salina de mina Rio Maior em Portugal, distintos microrganismos procariontes foram isolados, todavia apresentando uma maior abundância de organismos do domínio *Archaea*. A análise do metagenoma da mesma amostra também confirmou este resultado. Os isolados do domínio *Archaea* apresentaram um valor de similaridade do gene 16S do RNAr acima de 98,7% (Chun *et al.*, 2018) com espécies já identificadas, como : *Halorubrum tenbequichense*, *Halorubrum coriense*, *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Halobacterium salinarum* (Dados não publicados). Em outras salinas, também já foi demonstrada a predominância dos gêneros *Haloarcula*, *Halorubrum* e *Haloferax* durante os estágios de cristalização de sal em salmouras, sendo estes estágios os representantes de maior concentração de sais (Mani *et al.*, 2012).

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é investigar o potencial de produção de PHA por microrganismos halófilos isolados da Salina de Rio Maior, Portugal. Para isto, a realização de pesquisas *in silico* e *in vitro* é necessária.

### 2.2 Objetivos específicos

O presente estudo tem como objetivos específicos: i) validar a produção *in vivo* de PHA em 7 estirpes de haloarquéias isoladas de uma salina de Rio Maior, Portugal; ii) otimizar o acúmulo de PHA nas diferentes estirpes de haloarquéias; iii) pesquisar genes que codificam para as proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA no metagenoma da amostra retirada de uma salina de Rio Maior; iv) confirmar a anotação das proteínas referentes aos genes encontrados no metagenoma.



### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Microrganismos

As estirpes utilizadas neste estudo foram isoladas de uma amostra de água coletada de um cristalizador com 26% de NaCl da Salina de Rio Maior localizada na região central de Portugal (39° 21' 15" N, 8° 53' 45" W). Os isolados foram cedidos pela coleção de culturas de extremófilos do Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), Universidade de Coimbra, Portugal. As estirpes utilizadas no presente trabalho encontram-se taxonomicamente dentro do domínio *Archaea*, especificamente dentro da classe *Haloarchaea* (Tabela 1). A estirpe de *Escherichia coli*, ATCC 25922 foi utilizada como controle negativo para a produção de PHAs.

**Tabela 1.** Taxonomia das estirpes isoladas da Salina de Rio Maior, Portugal.

Estirpe	Espécie
RMP-1	<i>Halorubrum tenbequichense</i>
RMP-11 <sup>T</sup>	" <i>Halorubrum miltondacostae</i> "
RMP-16	<i>Halorubrum coriense</i>
RMP-17	<i>Haloarcula marismortui</i>
RMP-47 <sup>T</sup>	" <i>Halorubrum miltondacostae</i> "
RMP-111a	<i>Halobacterium salinarum</i>
RMP-135	<i>Haloarcula vallismortis</i>

#### 3.2 Recuperação das estirpes criopreservadas

Para a recuperação das estirpes microbianas, o meio sólido SW20 (Rodriguez-Valera et al., 1980) modificado foi utilizado com a adição de 20 g de ágar e conteúdo de 25% de sais totais com o pH final ajustado para 7,4 com 1 N NaOH (Tabela 2). Após o preparo, o meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 min. O meio sólido foi vertido em caixas de Petri e deixado a esfriar até estar pronto para ser utilizado. Os isolados selecionados, criopreservados a -70 °C, foram descongelados e espalhados sob a superfície do meio de cultura SW20 modificado e incubados em estufa de laboratório (EHRET) a 37 °C, temperatura ótima do crescimento destas estirpes.

### 3.3 Crescimento microbiano

Após apresentarem crescimento visível em meio sólido, identificado através da formação de colônias, todos os isolados, a partir da biomassa retirada da placa, foram inoculados em frascos Erlenmeyers de 300 mL contendo 50 mL de meio líquido SW20 modificado e incubados a 37 °C com agitação constante a 140 rpm (Innova 3100 Digital Water Bath Shaker - New Brunswick Scientific). O crescimento dos isolados foi mensurado através da medição da turbidez das culturas, comprimento de onda a 610 nm, com um espectrofotômetro (JENWAY 6405 UV/Vis). O crescimento de *E. coli* ATCC 25992 foi realizado a partir da inoculação das células em meio de cultura Luria Bertani (LB, Cultimed) (composição (g/L): peptona de caseína, 10; extracto de levedura, 5; cloreto de sódio, 10, pH 7) e incubadas a 37 °C (Sambrook *et al.*, 1989). Após o preparo, todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min. A curva de crescimento microbiano foi então traçada a partir do tempo e dos valores da densidade óptica obtidos sob escala logarítmica. Através disto, foi possível linearizar os valores da densidade óptica ( $x$ ) calculando o valor do logaritmo natural da densidade óptica ( $\ln$  de  $x$ ) e, a partir deste cálculo, foi realizada uma regressão linear dos pontos durante a fase exponencial do crescimento, na qual o coeficiente angular da reta (a inclinação) corresponde a velocidade específica máxima de crescimento de cada estirpe (Monod, 1949).

**Tabela 2.** Composição do meio SW20 modificado (Rodriguez-Valera *et al.*, 1980).

Componentes	g/L
NaCl	195
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	34,6
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	49,5
CaCl <sub>2</sub>	0,72
KCl	5,0
HNaCO <sub>3</sub>	0,2
NaBr	0,65
Extrato de levedura	2,5
Casaminoácidos	2,5

### 3.4 Acúmulo potencializado de PHA

Para otimizar as condições de acúmulo de PHA, os isolados foram transferidos do meio SW20 modificado para um meio de cultura mineral suplementado com uma fonte de carbono específica.

Os isolados foram primeiramente cultivados em SW20 modificado e incubados em banho maria com agitação a 140 rpm a 37 °C (Innova 3100 - New Brunswick Scientific) até atingirem a fase exponencial. Seguidamente, as estirpes foram então inoculadas em Erlenmeyers de 300 mL contendo 50 mL e contendo 100 mL de meio mínimo (MG) suplementado com 2% de glicose (p/v) ou com 2% de glicerol (p/v), e incubados sob as mesmas condições descritas em 3.3 (Han *et al.*, 2007). A composição do meio MG está descrita na Tabela 3. Todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min. As fontes de carbono foram esterilizadas por autoclavagem separadamente e adicionadas ao meio MG após a esterilização. Os experimentos foram realizados em duplicata sob condições aeróbicas. O crescimento dos isolados foi determinado através da medição da turbidez das culturas, a 610 nm, como previamente descrito em 3.3 desta mesma secção.

**Tabela 3.** Composição do meio mineral (MG) (Han *et al.*, 2007).

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
NaCl	200
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	20
KCl	2
Glutamato de sódio	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,037.5
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,05
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0,036
Extrato de levedura	1

### 3.5 Coloração de grânulos de PHB por Sudan Black B

Para a visualização dos grânulos de PHA, a técnica de coloração por Sudan Black B foi realizada (Burdon, 1946; Liu *et al.*, 1998). Todas as estirpes foram submetidas à coloração após atingirem sua respectiva fase estacionária. Para o preparo da amostra, foram coletados 2 mL de cada crescimento e estes submetidos a duas lavagens com Tris-HCl 10mM com 10% NaCl para a remoção do meio de cultura. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 rpm com remoção do sobrenadante e a ressuspensão do *pellet* com adição de 200 µL de tampão e sujeitos a vórtex. Em seguida, foram adicionados mais 1,8 mL de tampão, centrifugados e ressuspensos em 200 µL de tampão. Cada suspensão foi então depositada em uma lâmina de vidro e estas submetidas à fixação celular a partir de esfregação em chama de bico de Bunsen. As células foram coradas durante 10 min com Sudan Black 0,3% (p/v) em etilenoglicol, previamente filtrado. O excesso de corante foi lavado com xilol até a remoção total do corante da lâmina. As amostras foram completamente secas ao ar. Uma solução inicial de safranina com concentração de 2,5% em etanol 96% foi preparada e diluída ao adicionar 90 mL de água a 10 mL dessa solução, resultando em uma solução final de safranina com concentração de 0,25% em água, foi utilizada para a coloração das células durante 5 minutos, e no fim removida com água deionizada. Após a secagem das lâminas, as amostras foram observadas em

microscopia óptica. A confirmação da presença de PHB a partir da técnica de coloração efetuou-se através da observação de grânulos escuros corados por Sudan Black B e a análise das células foi posteriormente realizada por microscopia de campo claro (Mesquita *et al.*, 2015).

### **3.6 Visualização de grânulos de PHB por microscopia óptica**

Após a coloração dos grânulos pelo corante, a visualização destes foi realizada a partir de microscopia óptica (Carl Zeiss Axio Imager A2 e LEITZ). As amostras foram preparadas e, com as lâminas secas, foi adicionado óleo de imersão sob a superfície de uma lamela. As amostras foram então observadas a partir da microscopia óptica com uma ampliação de 1000x (Legat *et al.*, 2010). Após a observação dos grânulos em laboratório, foram realizadas microfotografias para uma posterior análise qualitativa das imagens e detecção dos grânulos de PHA. As imagens foram analisadas em computador e, utilizando o software ZEISS ZEN Microscopy Software foi possível ajustar o contraste, as cores e a exposição da imagem para uma visualização otimizada (ZEISS, 2023).

### **3.7 Fixação das células para a microscopia eletrônica**

A fim de obter melhor resolução e confirmação dos grânulos de PHA, a microscopia eletrônica de transmissão foi realizada. Para o procedimento de identificação de inclusões celulares de PHA, as amostras crescidas em MG + 2% de glicose foram utilizadas. Devido a alta concentração de NaCl necessária para manter a homeostase celular, foi necessária a adição deste sal ao tampão, em concentração próxima à do meio de cultura ou molaridade de até 1.5 M, com intuito de evitar a lise celular devido à osmose. Foram coletados 1,5 mL de cada amostra e estes transferidos para *ependorf*. Para as estirpes que apresentaram alta densidade óptica, diluições utilizando o meio de cultura foram necessárias. As estirpes RMP-11<sup>T</sup> e RMP-17, por apresentarem alta densidade óptica, foram diluídas em MG utilizando-se de 0,5 mL de cada cultura e adicionados 1 mL de meio MG. As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm a fim de testar a força mínima para a formação de *pellet* com intuito de não afetar a morfologia devido à força mecânica. O sobrenadante foi removido. Após, uma solução tampão cacodilato (0.2 M, pH 7.2) foi preparada e utilizada para diluir o glutaraldeído 25% para obter a solução final fixadora, com concentração de glutaraldeído a 2,5%. Neste passo, foram preparadas duas amostras por estirpe: uma amostra contendo 10% de NaCl e a outra 20% de NaCl, a fim de

preservar as células. Foram então realizados dois tratamentos: cacodilato 0.2M + 10% NaCl e 0.2M + 20% NaCl. O fixador foi deixado a atuar durante 3 horas a 4 °C e foi então retirado seguido da adição da solução tampão (cacodilato), a 4 °C, preservando as amostras até o envio à microscopia. As amostras foram processadas e as imagens tiradas pelo Serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS), Universidade do Porto, Portugal.

### 3.8 Optimização da extração de PHA a partir da estirpe RMP-17

A fim de extrair e detectar o acúmulo de PHA em arqueias halófilas, foram realizadas 6 extrações distintas com duas quantidades distintas de biomassa. Os isolados da estirpe RMP-17 crescidos em MG suplementado com 2% de glicose foram utilizados para a optimização da técnica de extração de PHA.

I) Água destilada: As amostras foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) e centrifugadas a 4.000 rpm durante 25 minutos para a remoção do meio salino. O sobrenadante foi descartado. Para as amostras crescidas em 100 mL, o procedimento foi repetido para recolha de toda a biomassa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 45 mL de água destilada estéril e incubado por 60 horas à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram submetidas a centrifugação sob as mesmas condições e o *pellet* foi lavado com água destilada estéril. O procedimento foi repetido duas vezes. As amostras foram incubadas a 70 °C até a obtenção de um pó branco. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado uma mistura de 10 mL de acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ,  $\geq 99\%$ , MERCK) e 10 mL de etanol absoluto (Fischer Chemical) (1:1, v/v). As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio (Chloroform, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. for analysis) e os extratos incubados em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco (Escalona et al., 1994).

II) Água destilada + NaClO (5 - 13%) durante 30 minutos: As amostras foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) e centrifugadas a 4.000 rpm durante 25 minutos para a remoção do meio salino. O sobrenadante foi descartado. Para as amostras crescidas em 100 mL, o procedimento foi repetido para recolha de toda a biomassa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 45 mL de água destilada estéril e incubado por 60 horas à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram submetidas a centrifugação sob as mesmas condições, o *pellet* foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugado. Foi

adicionado 45 mL de NaClO e as amostras incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente centrifugadas. O *pellet* obtido foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em solução etanol:acetona (1:1, v/v). As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio e os extratos incubados em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco (Bhattacharyya *et al.*, 2012).

III) Água destilada + NaClO (5 - 13%) durante 2 horas: As amostras foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) e centrifugadas a 4.000 rpm durante 25 minutos para a remoção do meio salino. O sobrenadante foi descartado. Para as amostras crescidas em 100 mL, o procedimento foi repetido para coleta de toda a biomassa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 45 mL de água destilada estéril e incubado por 60 horas à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a centrifugação sob as mesmas condições, o *pellet* foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugado. Foi adicionado 45 mL de NaClO e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas e posteriormente centrifugadas. O *pellet* obtido foi lavado com água destilada estéril e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em solução etanol:acetona (1:1, v/v). As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio e os extratos incubados em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco (Pramanik *et al.*, 2012).

IV) Solução SDS (0,1%): As amostras foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) e centrifugadas a 4.000 rpm durante 25 minutos para a remoção do meio salino. O sobrenadante foi descartado. Para as amostras crescidas em 100 mL, o procedimento foi repetido para coleta de toda a biomassa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 45 mL de uma solução de SDS 0,1% em água destilada estéril e incubado por 60 horas à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram submetidas a centrifugação sob as mesmas condições e o *pellet* foi lavado com a solução SDS 0,1% e centrifugado. Uma vez obtido, o *pellet* foi lavado com água destilada, centrifugado e o sobrenadante descartado. As amostras foram incubadas a 70 °C até a obtenção de um pó branco. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em solução etanol:acetona (1:1, v/v). As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio e os extratos incubadas em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco (Dong & Sun, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2012; Mahansaria *et al.*, 2015; Bhattacharyya *et al.*, 2015).

V) Solução SDS (0,1%) + NaClO (5 - 13%) durante 30 minutos: As amostras foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) e centrifugadas a 4.000 rpm durante 25 minutos para a remoção do meio salino. O sobrenadante foi descartado. Para as amostras crescidas em 100 mL, o procedimento foi repetido para recolha de toda a biomassa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 45 mL de uma solução de SDS 0,1% em água destilada estéril e incubado por 60 horas à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram submetidas a centrifugação sob as mesmas condições, o *pellet* foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugado. Foi adicionado 45 mL de NaClO e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente centrifugadas. O *pellet* obtido foi lavado com água destilada estéril e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em solução etanol:acetona (1:1, v/v). As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio e os extratos incubados em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco (Dong & Sun, 2000).

VI) Solução SDS (0,1%) + NaClO (5 - 13%) durante 2 horas: As amostras foram colocadas em tubos Falcon (50 mL) e centrifugadas a 4.000 rpm durante 25 minutos para a remoção do meio salino. O sobrenadante foi descartado. Para as amostras crescidas em 100 mL, o procedimento foi repetido para recolha de toda a biomassa. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 45 mL de uma solução de SDS 0,1% em água destilada estéril e incubado por 60 horas à temperatura ambiente. Seguidamente as amostras foram submetidas a centrifugação sob as mesmas condições, o *pellet* foi lavado com água destilada estéril e novamente centrifugado. Foi adicionado 45 mL de NaClO e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 horas e posteriormente centrifugadas. O *pellet* obtido foi lavado com água destilada estéril e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em solução etanol:acetona (1:1, v/v). As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 10 mL de clorofórmio e os extratos incubados em banho-maria a 60 °C até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco (Dong & Sun, 2000).

### **3.9 Extração de PHA das demais estirpes**

Uma vez otimizada a técnica, as demais estirpes foram crescidas em 100 mL de meio MG suplementado com 2% de glicose ou 2% de glicerol. O crescimento das estirpes foi interrompido até estas atingirem a fase estacionária. A extração de PHA destas estirpes foi realizada através da metodologia II e V.

### **3. 10 Ensaio do ácido crotónico**

Para a detecção de PHB, foi realizado o Ensaio do ácido Crotónico através da extração de PHA previamente realizada (Law & Slepecky, 1961). O extrato obtido foi tratado com 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e, para a obtenção de ácido crotónico, os recipientes foram alocados em banheira a 100 °C durante 10 minutos. Ao fim desse passo, as soluções foram homogeneizadas e cerca de 2 mL foram transferidos a uma cubeta de quartzo. As absorbâncias foram medidas dentro do espectro ultravioleta nos comprimentos de onda de 220, 235, 240, 260 e 280 nanômetros (nm) num espectrofotômetro (Jenway 6405 UV/Vis) utilizando o ácido sulfúrico como branco.

### **3. 11 Amostras do metagenoma**

O DNA extraído da amostra de água salgada foi sequenciado por shotgun para obter o metagenoma. O DNA foi preparado para sequenciamento com o kit de preparação de biblioteca Nextera XT (Illumina) e sequenciado em formato *paired-end* com o MiSeq reagent Kit v3 (600 ciclos) (Illumina). As leituras de alta qualidade foram ensambladas com o MetaSpades versão 1.3.4 (Nurk *et al.*, 2017) e organizadas em bins com o MaxBin 2 versão 2.2.4 (Wu *et al.*, 2016). Os genes foram anotados com o Prokka versão 1.14.5 (Seemann, 2014). O CheckM versão 1.0.018 (Parks *et al.*, 2015) foi usado para a categorização taxonômica dos bins (Tabela 4). Os dados obtidos foram gentilmente cedidos para o desenvolvimento deste trabalho pelo laboratório Microbiomas, Metabólitos e Ômicas do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra.

### **3. 12 Busca por genes relacionados ao metabolismo de PHA no metagenoma**

A partir dos bins gerados, a busca por genes relacionados ao metabolismo dos PHAs foi realizada com base nas sequências dos genes codificadores para enzimas base da biosíntese: PhaA (EC 2.3.1.16), PhaB (EC 1.1.1.36), PhaC (EC 2.3.1.304), demais PGAPs (PhaG, PhaP, PhaR), PhaJ e PhaZ.

### **3. 13 Investigação e confirmação de genes relacionados ao metabolismo de PHA**

Devido aos sucessivos estudos demonstrando agrupamentos de genes relacionados ao metabolismo de PHA, sendo muitas vezes regulados pelo mesmo operon, e visando aumentar o alcance da detecção de mais proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA nos dados do metagenoma, as sequências de aminoácidos das proteínas putativas referentes aos genes não anotados pelo programa Prokka e próximas aos genes identificados pelo programa foram investigadas. As buscas no metagenoma foram delimitadas a 10 proteínas hipotéticas a jusante de genes relacionados ao metabolismo de PHA e já identificados pelo software e 10 proteínas hipotéticas a montante do gene identificado, com intuito de encontrar possíveis genes agrupados e suas respectivas sequências de aminoácidos relacionados ao metabolismo de PHA até então não identificados pelo software (Rehm & Steinbüche, 1999; Maehara *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2005).

A sequência de aminoácidos dos genes associados ao metabolismo de PHAs já identificados pelo programa e as sequências de aminoácidos das proteínas putativas próximas foram manualmente analisadas via Protein: Basic Local Alignment Search Tool (BLASTp) do National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (Benson *et al.*, 2012). As sequências de aminoácidos foram alinhadas por BLASTp no banco de dados de sequência proteica não redundante (nr) do GenBank (do inglês: *non-redundant protein sequence*). Através da ferramenta BLAST, o percentual de identidade das sequências de aminoácidos dos genes relacionados ao metabolismo de PHA provenientes do metagenoma com outras espécies do banco de dados do NCBI foi obtido com o intuito de obter mais informações sobre seu nível de identidade.

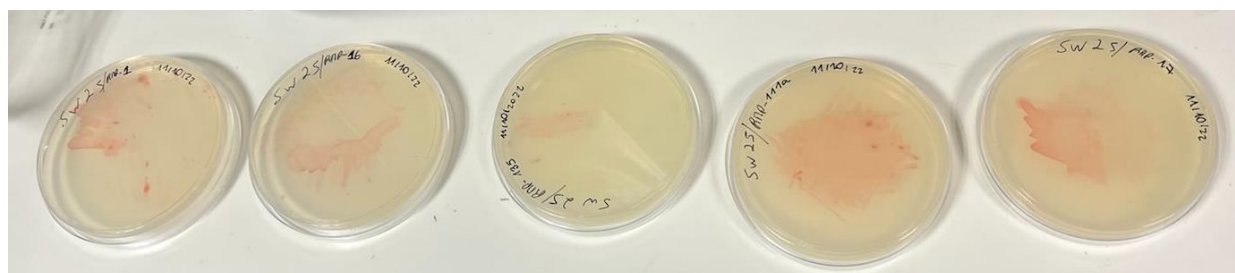
**Tabela 4.** Numeração das BINS e suas referêntes categorias taxonômicas. As taxonomias foram verificadas através do programa CheckM, versão 1.0.018. (Parks *et al.*, 2015), onde k\_ é referente ao reino, c\_ é referente à classe, f\_ é referente à família e s\_ é referente à espécie.

<b>Bin</b>	<b>CheckM</b>
1	s__algicola
3	k_Archaea
4	root
5	k_Archaea
6	c__Gammaproteobacteria
7	f__Halobacteriaceae
13	f_Rhodobacteraceae
18	f_Rhodobacteraceae
20	f__Halobacteriaceae
21	f__Halobacteriaceae
22	f__Halobacteriaceae
24	k_Archaea
26	k_Bacteria
27	f__Halobacteriaceae

## 4. Resultados

### 4.1 Crescimento de estirpes em meio de cultura sólido

Todas as amostras apresentaram crescimento em até 7 dias durante tentativa de recuperação dos isolados criopreservados (Figura 6). O crescimento em meio de cultura sólido, contendo 25% de sais totais, foi confirmado pela formação de colônias arredondadas e de superfície lisa e de coloração avermelhada ou rosada, fenótipo típico de archaeas halófilas. Os isolados RMP-17, RMP-16 e RMP-47, todas as vezes que cultivados, apresentaram crescimento relativamente rápido quando comparados com os demais isolados, com o aparecimento de colônias entre 2 e 3 dias. Não o bastante, os dois isolados mantiveram o crescimento rápido ao longo da superfície da placa durante os dias seguintes. Os isolados RMP-11<sup>T</sup> e RMP-111a apresentaram crescimento médio-rápido, por volta de 4 a 5 dias, quando comparado aos demais e as células do último apresentaram uma coloração mais rosada se comparado ao restante. Em contrapartida, os isolados RMP-1 e RMP-135 apresentaram pouco e lento crescimento, requerendo em média 7 e 10 dias, respectivamente (Figura 6).



**Figura 6.** Crescimento das estirpes em meio SW20 modificado após 7 dias de crescimento em estufa a 37 °C. Da esquerda para a direita: RMP-1, RMP-16, RMP-135, RMP-111a e RMP-17. Todas as estirpes apresentaram crescimento e coloração rosada ou avermelhada.

### 4.2 Crescimento de estirpes em meio de cultura líquido (SW20)

Nesta seção, os resultados da produção de biomassa foram exibidos de acordo com a temperatura ideal para o crescimento da espécie, conforme medida por uma densidade óptica de 610 nm. A estirpe RMP-1 apresentou o valor máximo de densidade óptica de 0.541 após 549 horas, com uma taxa específica de crescimento de 0.0100 h<sup>-1</sup>. A estirpe RMP-11<sup>T</sup> apresentou o maior valor de densidade óptica, 0.925, após 302 horas e uma taxa específica de crescimento de 0.0038 h<sup>-1</sup>. Ainda dentro do gênero *Halorubrum*, RMP-16 apresentou 0.970

como maior valor de densidade óptica obtida e  $0.0370 \text{ h}^{-1}$  como valor de taxa específica de crescimento. A estirpe próxima de *Haloarcula marismortui*, RMP-17, apresentou o maior valor de densidade óptica após 137 horas, sendo este 0.799, e uma velocidade específica de crescimento de  $0.0350 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-47, após 302 horas, apresentou 1.188 como maior valor de densidade óptica obtida e uma velocidade de crescimento específica de  $0.0114 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-111a obteve a maior densidade óptica após 182 horas de crescimento com o valor de 0.874 e uma velocidade específica de crescimento de  $0.0358 \text{ h}^{-1}$  e a estirpe RMP-135 obteve 0.708 após 230 horas de crescimento com uma velocidade específica de crescimento de  $0.0284 \text{ h}^{-1}$ .

### 4.3 Acúmulo potencializado de PHA

Após o crescimento microbiano e a caracterização deste no meio propício para o acúmulo de biomassa, a potencialização do acúmulo de PHA nas estirpes foi então realizada. Os resultados foram obtidos a partir da temperatura ótima de crescimento das estirpes, registrada em uma densidade óptica de 610 nm. Para a análise do acúmulo potencializado de PHA em haloarquéias, foi utilizado um meio mínimo limitado por nutrientes com adição de uma fonte específica de carbono. Com o intuito de facilitar a compreensão dos resultados obtidos, os primeiros valores são referentes às estirpes crescidas em meio MG + 2% de glicose e, em seguida, os resultados apresentados são referentes ao crescimento em meio MG + 2 % de glicerol.

A estirpe RMP-1 apresentou o maior valor de densidade óptica após 161 horas de crescimento com o valor de 0.694 e uma velocidade específica de crescimento  $0.0167 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-11<sup>T</sup> apresentou 0.808 como valor de densidade óptica após 161 horas e uma velocidade de crescimento específica de  $0.0174 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-16 obteve como valor para a densidade óptica 0.566 e uma velocidade específica de crescimento de  $0.0139 \text{ h}^{-1}$ . Durante o acompanhamento do crescimento da estirpe RMP-17, foi notado que esta mesma estirpe apresentou crescimento até 139 horas após o início incubação, atingindo o valor de 0.790 para a densidade ótica e, após 256 horas após o início da incubação, o valor da densidade óptica foi apresentado como 0.800. Todavia, nas aproximadas 50 horas após, houve um aumento na densidade óptica da estirpe, sendo 1.024 o maior valor obtido pela estirpe após 328 horas de crescimento e a velocidade específica de crescimento de  $0.0063 \text{ h}^{-1}$ . e  $0.0036 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. A estirpe RMP-47 após 161 horas obteve o maior valor de densidade óptica de 0.699 e uma velocidade específica de crescimento de  $0.0173 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-111a após

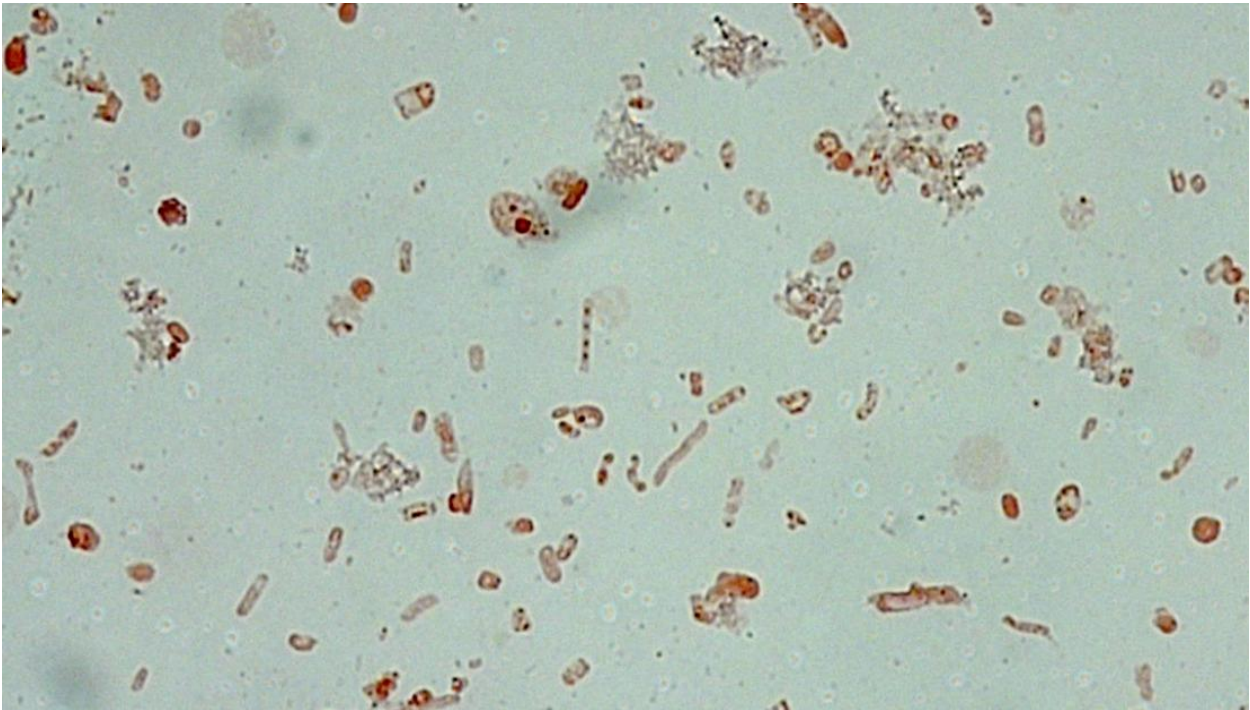
311 horas de crescimento obteve o maior valor de densidade óptica de 0.910 e uma velocidade específica de crescimento de  $0.0087 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-135 apresentou o maior valor de densidade óptica de 0.992 após 263 horas e uma velocidade específica de crescimento de  $0.166 \text{ h}^{-1}$ .

Sob as mesmas condições, as estirpes foram crescidas em meio MG com suplementação de glicerol. O maior valor de absorvância obtido pela estirpe RMP-1 foi de 0.256 após 96 horas de crescimento e a velocidade de crescimento de  $0.0177 \text{ h}^{-1}$ . Para a estirpe RMP-11<sup>T</sup>, o maior valor de absorvância obtido foi de 0.563 após 161 horas e uma velocidade de crescimento de  $0.0287 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-16 obteve, após 168 horas, o maior valor da densidade óptica de 0.239 e uma velocidade específica de crescimento de  $0.037 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-17 obteve o valor máximo da densidade óptica de 0.459 após 256 horas e velocidade de crescimento de  $0.0118 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-47 apresentou o valor máximo de densidade óptica de 0.830 após 161 horas e uma velocidade específica de crescimento de  $0.0307 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-111a obteve 0.499 como maior valor de densidade óptica após 67 horas após a incubação e uma velocidade de crescimento de  $0.0687 \text{ h}^{-1}$ . A estirpe RMP-135 apresentou, após 96 horas, o valor de 0.224 referente a densidade óptica e uma velocidade de crescimento de  $0.0181 \text{ h}^{-1}$ .

Vale ressaltar que, embora a adição de fontes de carbono em excesso foi empregada nos cultivos, nenhuma contaminação visível foi identificada durante os procedimentos de crescimento.

#### **4.4 Visualização de grânulos de PHB por Sudan Black via microscopia óptica**

A capacidade de produção de PHA em diferentes estirpes de haloarchaea foi investigada em crescimento em meio MG + 2% de glicose e meio MG +2% de glicerol (Materiais e Métodos 3.4). Todas as espécies foram analisadas na sua respectiva fase estacionária de crescimento. Como resultado da coloração e da visualização por microscopia óptica, RMP-11<sup>T</sup> e RMP-111a apresentaram grânulos escuros corados, confirmando o acúmulo de PHB intracelular através do crescimento em meio MG com 2% de glicose (Figura 7 e 8). Em contrapartida, devido ao pequeno tamanho celular, as estirpes RMP-16 e RMP-17 mostraram resultados inconclusivos.



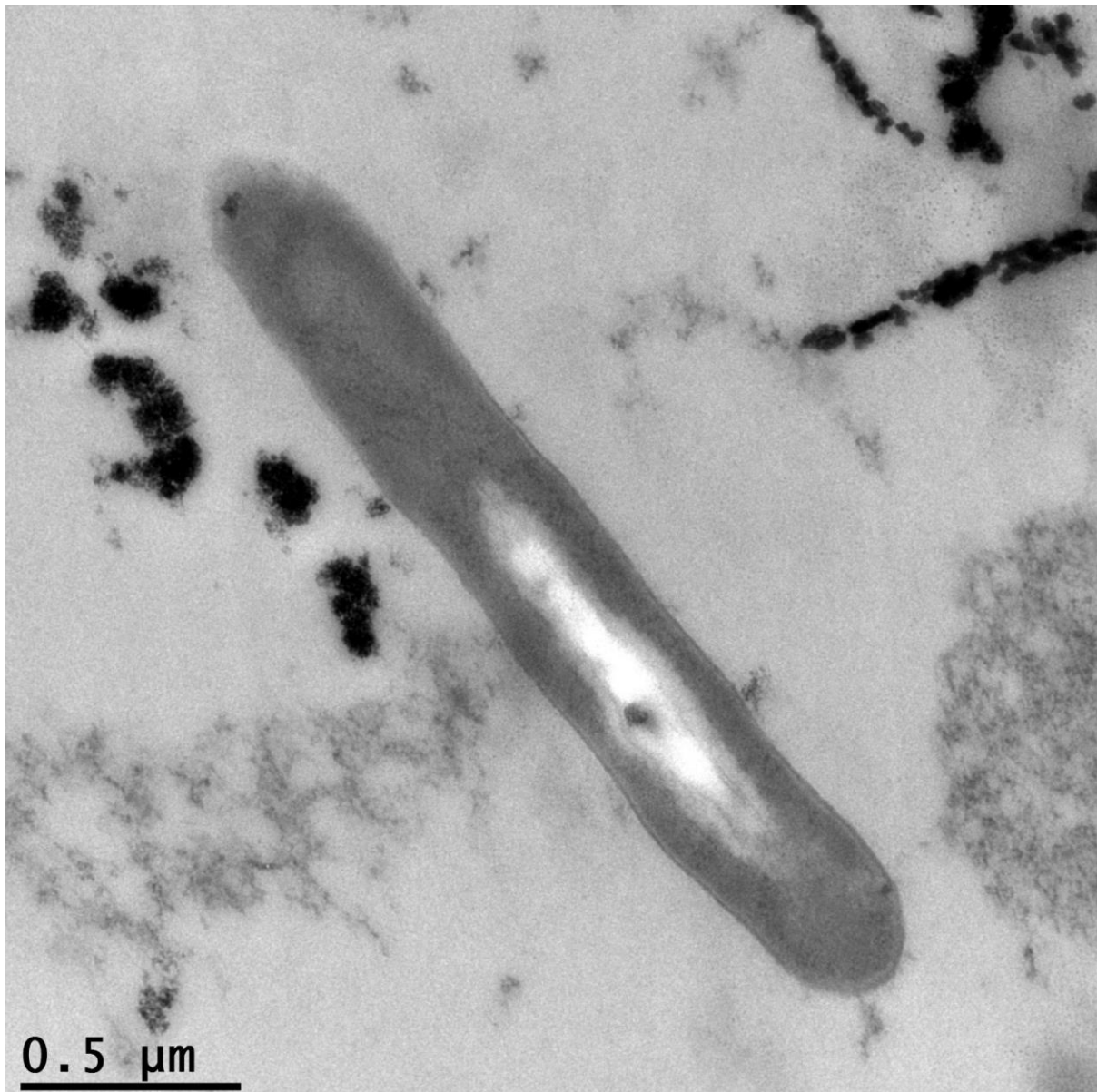
**Figura 7.** Células da estirpe RMP-11<sup>T</sup> crescidas em meio mineral (MG) suplementado com 2% de glicose e retiradas para a coloração durante a fase estacionária de crescimento. Visualização das células a partir da técnica de coloração com Sudan Black B em um microscópio óptico (Carl Zeiss Axio Imager A2) com uma objetiva de imersão em óleo de 100x. Os grânulos de PHB são apresentados como inclusões celulares escuras.



**Figura 8.** Células da estirpe RMP-111a crescidas em meio mineral (MG) suplementado com 2% de glicose e analisadas durante a fase estacionária de crescimento. Visualização das células a partir da técnica de coloração com Sudan Black B em um microscópio óptico (Carl Zeiss Axio Imager A2) com uma objetiva de imersão em óleo de 100x. Os grânulos de PHB são apresentados como inclusões celulares escuras.

#### ***4.5 Visualização de grânulos de PHA por microscopia eletrônica***

Para uma melhor identificação dos grânulos de PHA intracelular, foi realizada a preparação das células para microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para corroborar com os demais resultados obtidos a partir da microscopia óptica usando as mesmas estirpes utilizadas para a técnica de coloração por Sudan Black. As células utilizadas para a TEM foram retiradas do meio mineral suplementado com fonte de carbono para o processamento quando atingiram sua fase estacionária. Devido à indisponibilidade de imagens das demais espécies, apenas os dados de observação da estirpe RMP-11<sup>T</sup> após o crescimento em meio MG + 2% de glicose foi possível de ser observado (Figura 9). Foi obtido um resultado positivo a partir da imagem uma vez que foi possível visualizar um único grânulo grande ocupando uma grande parte do espaço intracelular da estirpe RMP-11<sup>T</sup>.

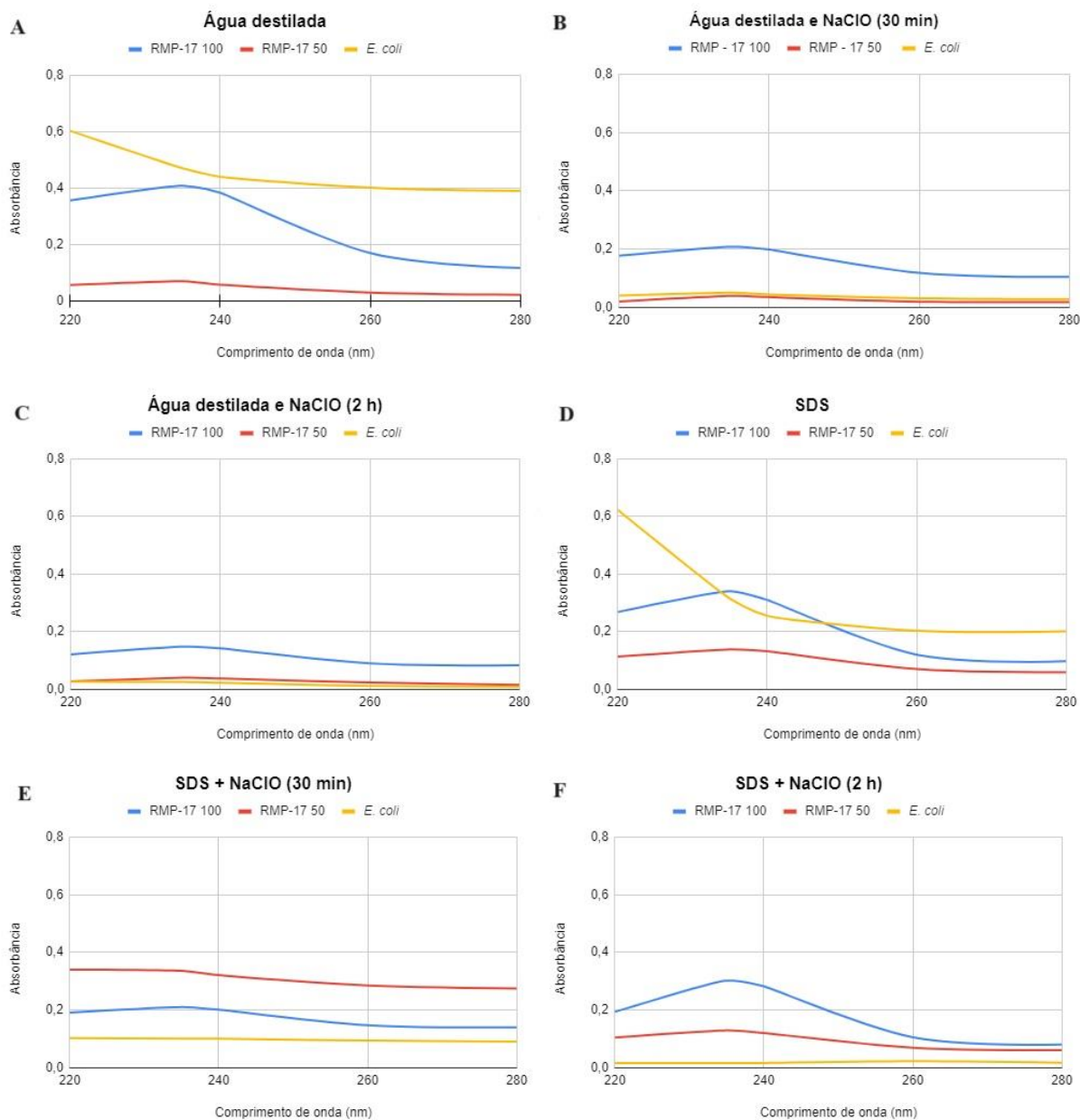


**Figura 9.** Morfologia de uma das células da estirpe RMP-11<sup>T</sup>. As células foram cultivadas em meio MG contendo 2% (p/v) de glicose e foram coletadas na fase estacionária de crescimento. O conteúdo de PHA da célula foi identificado a partir de finas secções celulares e a micrografia eletrônica foi tirada como descrito nos Materiais e Métodos. Bar 0,5  $\mu\text{m}$ .

#### **4.6 Otimização da extração de PHA e detecção de PHB em RMP-17**

Com intuito de otimizar a extração de PHA, a estirpe RMP-17 foi utilizada como piloto para testar a metodologia, o tempo de duração de cada extração, a quantidade de biomassa necessária e os reagentes utilizados durante o processo de extração. Para confirmar o resultado da extração, a metodologia de detecção de PHB foi utilizada (Law & Slepecky, 1961). Apesar de estar fundamentado na quantificação de PHA, neste estudo o método foi empregado

exclusivamente para natureza qualitativa. Para determinar a natureza da substância produzida por cada espécie, o produto sintetizado foi submetido à digestão com ácido sulfúrico concentrado, convertendo-o em ácido crotônico. Posteriormente, o espectro de absorção foi obtido na faixa de 200 a 280 nm, com o pico esperado para a detecção de PHB em 235 nm, sendo então elaborado um gráfico para análise (Figura 10). As células da estirpe foram coletadas durante a fase estacionária em meio MG com 2% de glicose sob temperatura ótima de crescimento da estirpe (Han *et al.*, 2007). Esta estirpe foi utilizada uma vez que estirpes da espécie *Haloarcula marismortui*, como *H. marismortui* ATCC 43049<sup>T</sup> e *H. marismortui* MTCC 1596, já apresentaram acúmulo de PHB em outros estudos (Han *et al.*, 2007; Pramanik *et al.*, 2012). Em todas as metodologias realizadas e nas diferentes quantidades de biomassa utilizadas, a estirpe apresentou um pico de absorvância de 235 nm. A extração realizada apenas com água destilada teve como resultado um pico de absorvância de 0.408 e 0.069 para a biomassa proveniente de 100 mL e 50 mL de volume de crescimento, respectivamente. A extração realizada a partir de água destilada e digestão por NaClO durante 30 minutos apresentou como maior valor de absorvância 0.208 e 0.039 a 235 nm a partir de 100 mL e 50 mL, respectivamente. A extração realizada por água destilada e NaClO durante 2 horas apresentou absorvância de 0.148 e 0.04 a 235 nm a partir de 100 mL e 50 mL, respectivamente. O procedimento de extração a partir de solução de SDS 0.1% apresentou valores de absorvância de 0.340 e 0.138 a 235 nm a partir de 100 mL e 50 mL, respectivamente. Em contrapartida, quando a extração foi realizada com solução de SDS 0.1% e digestão por NaClO durante 30 minutos, os valores obtidos a partir de 100 mL foram de 0.210 e 0.336 para 50 mL. Quando realizada a extração a partir de solução de SDS 0.1% e NaClO durante 2 horas, os valores de absorvância obtidos a 235 nm a partir de 100 mL e 50 mL foram 0.302 e 0.129, respectivamente. Concomitantemente, a estirpe de *E. coli* ATCC 29922 foi utilizada como controle negativo durante as extrações. Em todas as extrações a estirpe não apresentou um pico necessário para a detecção de PHB e apresentou decaimento nos valores de absorvância durante todos os comprimentos de ondas utilizados para a leitura dos resultados (Figura 10).

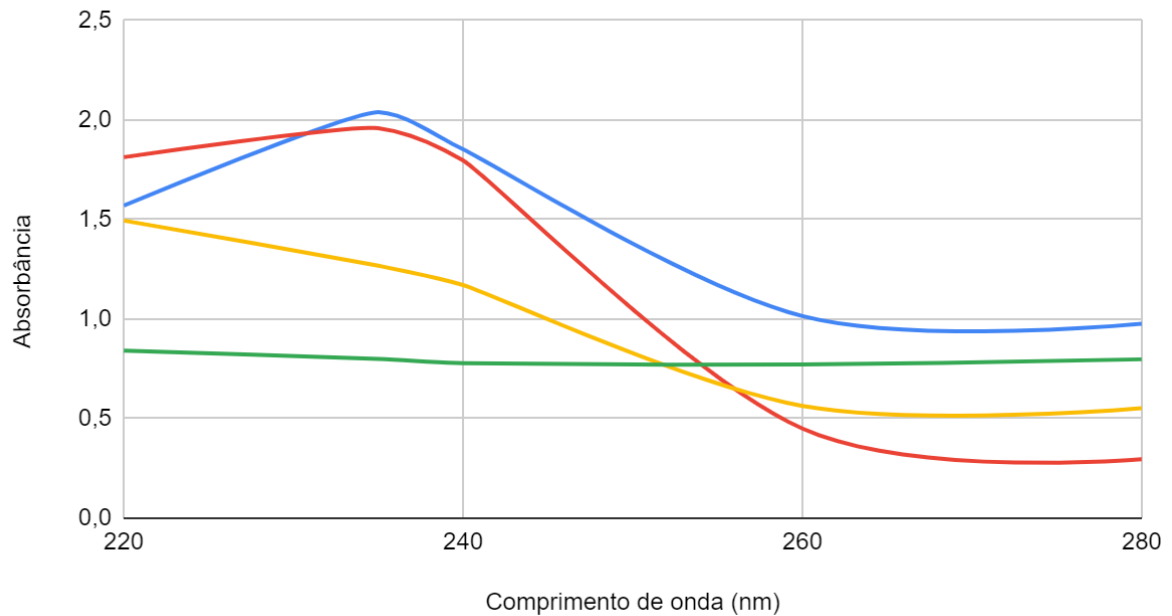


**Figura 10:** Medida dos valores da absorbância resultantes da conversão de PHB a ácido crotonico entre 200 nm e 280 nm. Os gráficos estão plotados a partir das seis metodologias de extração de PHA da estirpe RMP-17 e de *Escherichia coli*, sendo a última utilizada como controle negativo. De cima para baixo e da esquerda para a direita: (A) Extração realizada a partir de água destilada. (B) Extração realizada a partir de água destilada e NaClO durante 30 minutos. (C) Extração realizada a partir de água destilada e NaClO durante 2 horas. (D) Extração realizada a partir de solução de SDS 0.1%. (E) Extração realizada a partir de solução de SDS 0.1% e NaClO durante 30 minutos. (F) Extração realizada a partir de solução de SDS 0.1% e NaClO durante 2 horas. As células da estirpe RMP-17 foram crescidas em meio MG + 2% de glicose. Os traços em azul representam os valores das células crescidas em 100 mL de meio de cultura. Os traços em azul representam os valores da extração das células crescidas em 50 mL de meio de cultura o. Os traços em amarelo representam os valores da extração realizada a partir das células de *E. coli* crescidas em 100 mL de meio de cultura Luria Bertani.

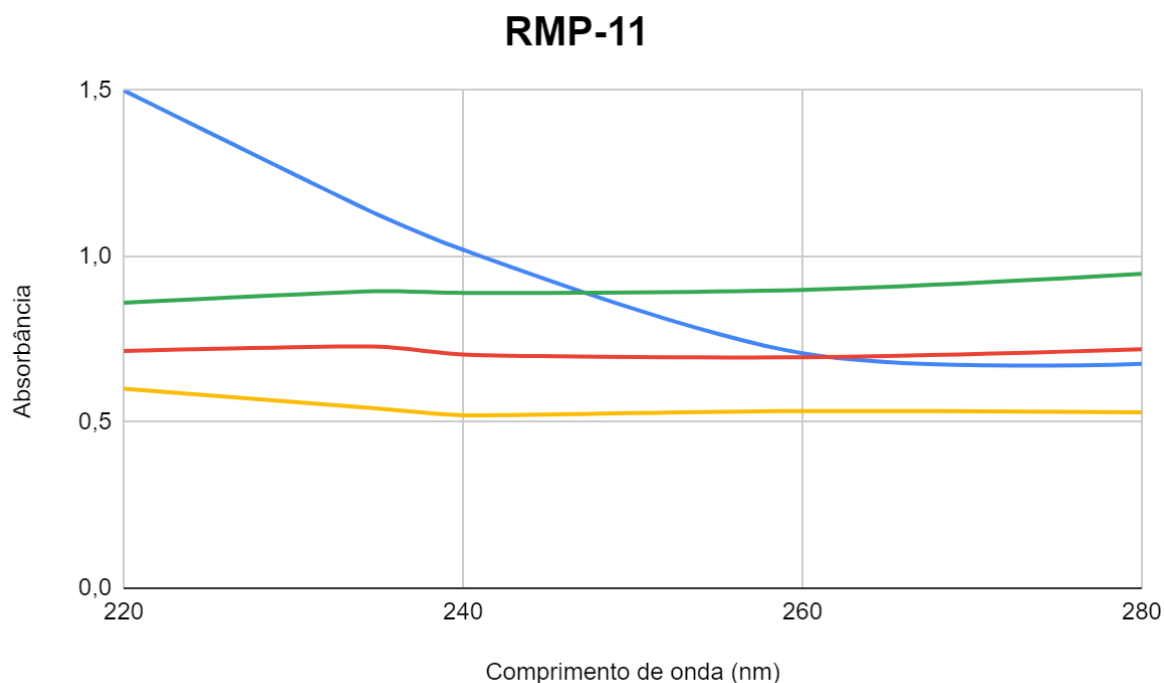
#### 4.7 Extração de PHA e detecção de PHB das estirpes

A partir da otimização da extração de PHA pela estirpe RMP-17, as duas extrações que obtiveram melhores resultados e com melhor eficiência de tempo e reagentes foram aplicadas nas demais estirpes de haloárqueias, sendo estas: extração a partir de água destilada e extração a partir de solução de SDS 0.1%. A biomassa utilizada para as extrações foi proveniente de 100 mL de meio mínimo mineral com adição de 2% de fonte de carbono (glicose ou glicerol). Vale ressaltar que, embora a adição de fontes de carbono em excesso foi empregada nos cultivos, nenhuma contaminação visível foi identificada durante os procedimentos de crescimento. Foi observado que as estirpes RMP-17 e RMP-11<sup>T</sup> apresentaram picos de absorvância no comprimento de onda de 235 nm. A estirpe RMP-11<sup>T</sup> apresentou resultado positivo a partir da extração via solução de SDS 0.1% quando crescida em meio MG suplementado com glicose e também em meio MG suplementado com glicerol (Imagem 12). Os valores de absorvância referente a RMP-11<sup>T</sup> foram 0.728 para MG + 2% de glicose e 0.895 para MG + 2% de glicerol (Anexo 1). Embora o perfil do gráfico referentes aos resultados de RMP-11<sup>T</sup> não apresentarem um pico tão acentuado, o resultado foi considerado positivo uma vez que para realizar a leitura dos resultados desta estirpe através do espectrofotômetro foi necessário realizar diluições para obter os valores para leitura. A diluição foi realizada a partir de 200 micrometros da amostra em 1,8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Em contrapartida, a estirpe RMP-17 apresentou picos de absorvância a 235 nm quando crescidas em MG + 2% de glicose utilizando a metodologia de extração a partir de água destilada e também a partir de solução SDS 0.1%, representando a detecção positiva de PHB (Imagem 11 e Anexo 2). Assim como foi necessário diluir a amostra de RMP-11<sup>T</sup>, foi necessário utilizar a mesma diluição para as leituras de RMP-17. Para além de RMP-11<sup>T</sup>, não foram registrados picos no comprimento de onda de 235 nm em relação ao crescimento com suplementação de glicerol para nenhuma das demais estirpes e com suplementação de glicose para as estirpes RMP-1, RMP-16, RMP-47, RMP-111a e RMP-135.

## RMP-17



**Figura 11.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorbância entre 200 nm e 280 nm a partir da extração da biomassa da estirpe RMP-17. O traço em azul representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento da estirpe realizado em meio mineral (MG) suplementado por 2% de glicose. O traço em vermelho representa a extração realizada a partir da solução de SDS 0.1% e o crescimento em 2% de glicose. Em amarelo, o traço representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento em meio MG suplementado com 2% de glicerol. Em verde, o traço representa a extração realizada por solução de SDS 0.1% e o crescimento em MG + 2% de glicerol.



**Figura 12.** Detecção de ácido crotonico através dos valores da absorvância entre 200 nm e 280 nm a partir da extração da biomassa da estirpe estirpe RMP-11. O traço em azul representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento da estirpe realizado em meio mineral (MG) suplementado com 2% de glicose. O traço em vermelho representa a extração realizada a partir da solução de SDS 0.1% e o crescimento em 2% de glicose. Em amarelo, o traço representa a extração realizada a partir de água destilada e o crescimento em meio MG suplementado com 2% de glicerol. Em verde, o traço representa a extração realizada por solução de SDS 0.1% e o crescimento em MG + 2% de glicerol.

#### 4.8 Busca por genes relacionados ao metabolismo de PHA no metagenoma

Foram identificados genes codificantes para as proteínas da via clássica dos PHAs: PhaA, PhaB, PhaC, PhaE e PhaJ.

##### 4.8.1 PhaA

A proteína PhaA é referida por diferentes nomes, como Acetil-CoA acetiltransferase, acetoacetil-CoA tiolase e beta-cetotiolase e está dentro da família das proteínas tiolases (Obruča *et al.*, 2022). No fim da busca, foram detectadas 6 genes e suas respectivas sequências de aminoácidos referentes às proteínas PhaA. No BIN 1, gênero *Algicola*, foi detectado um gene referente à Acetil-CoA acetiltransferase. No BIN 6, foi detectado um gene codificador a uma PhaA. No BIN 13, *Rhodobacteraceae*, foram encontrados 1 gene codificante para uma putativa beta-cetotiolase (*bktB*) e 1 gene para Acetil-CoA acetiltransferase (*phaA*). No BIN 18,

*Rhodobacteraceae*, um gene codificante para Acetil-CoA acetiltransferase foi encontrado (*phaA*) e outro para beta-cetotiolase foram encontrados (Tabela 5).

#### **4.8.2 *PhaB***

Como resultado da análise do metagenoma, foram identificados 3 genes codificantes para a proteína Acetoacetil-CoA redutase e suas respectivas sequências de aminoácidos. Dois dos três genes de *PhaB* encontrados no metagenoma foram encontrados no BIN 6 e o terceiro gene foi encontrado no BIN 13 (Tabela 5).

#### **4.8.3 *Pha-sintases (PhaC)***

A enzima *PhaC*, chave da polimerização de PHA, foi identificada em diversos bins. No BIN 5, domínio Archaea, dois genes codificantes para subunidades de Poli(3-hidroxiálcanoato) polimerase foram encontrados, *PhaC1* e *PhaC2* (Tabela 6). No BIN 6, foram encontrados 2 genes codificantes para subunidades hipotéticas de *PhaC*, *PhaC1* e *PhaC2*, respectivamente (Tabela 5). Dentro do BIN 7, foram encontrados 2 genes codificantes para proteínas hipotéticas *PhaC* e *PhaE* (Tabela 6). Dentro de BIN 13, apenas um gene de subunidade *PhaC* foi encontrado. No BIN 18, dois genes codificantes para *PhaC* putativas foram encontrados, *phaC\_1* e *phaC\_2*. No BIN 19, um gene codificante para uma subunidade hipotética de *PhaC* foi encontrado (Tabela 5). Dentro de BIN 24, foi encontrado um gene codificante para uma subunidade de *PhaC* (Tabela 6).

#### **4.8.4 *PhaJ***

Para além de genes codificantes de proteínas da via clássica de PHA, foram identificados genes codificantes para proteínas putativas *PhaJ*. Todavia, é notável a quantidade reduzida destes genes se comparados àqueles referentes à *PhaA*, *PhaB* e *PhaC*. Apenas 1 gene no BIN 13 e outro no BIN 18 foram encontrados. Ambos os genes codificam para uma enoil-CoA hidratase (R)-específica putativa (Tabela 6).

#### 4.9 Investigação e confirmação de genes relacionados ao metabolismo de PHA

O percentual de identidade de proteínas identificado por BLASTp referente à sequência de aminoácido dos genes relacionados ao metabolismo dos PHAs identificados pelo software está representado na Tabela 7. Os genes que foram apresentados pelo software como codificantes para proteínas hipotéticas e próximos dos genes já identificados foram investigados a partir das suas respectivas sequências de aminoácidos utilizando a ferramenta BLASTp. Embora o programa Prokka não tenha anotado algumas proteínas, diversas proteínas tiveram suas identidades confirmadas através do GenBank.

No BIN 1, um gene codificante para uma acetil-CoA aciltransferase foi detectado. No BIN 4, uma proteína hipotética foi identificada como acetil-CoA acetiltransferase e uma outra proteína foi identificada como desidratase da família MaoC. Dentro de BIN 6, a sequência de aminoácidos referente a uma proteína de um gene resultou na identificação de uma proteína repressora da síntese de polihidroxicanoato (PhaR) e de uma Subunidade da Sintase do ácido poli(R)-hidroxicanoato PhaE. No BIN 13, 4 proteínas foram identificadas: proteína da família da fosfolipase semelhante à patatina (do inglês; *Patatin-like phospholipase family protein*) (PhaP), proteína repressora da síntese de polihidroxicanoato (PhaR), fasina (PhaP) e também a única proteína polihidroxicanoato depolimerase (PhaZ) encontrada no metagenoma. No BIN 18, duas proteínas da família das fasinas (PhaP) e uma PhaR tiveram suas anotações identificadas. Em BIN 19, a comparação contra o GenBank suportou a anotação da função do gene como codificante para uma proteína da família das fasinas (Tabela 7).

**Tabela 5.** Proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA dentro do domínio *Bacteria* detectadas nos agrupamentos do metagenoma da Salina de Rio Maior, Portugal.

BIN	Proteína
1	Acetil-CoA acetiltransferase (PhaA)
	Acetil-CoA acetiltransferase PhaA
	Acetoacetil-CoA redutase PhaB_1
6	Acetoacetil-CoA redutase PhaB_2
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC_1
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC_2
	Acetil-CoA acetiltransferase (PhaA)
	Beta-cetotilase (BktB)
13	Acetoacetil-CoA redutase (PhaB)
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) (PhaC)
	Enoil-CoA hidratase específica-(R) (PhaJ)
	Acetil-CoA acetiltransferase (PhaA)
	Beta-cetotilase (BktB)
18	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC_1
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC_2
	Enoil-CoA hidratase específica-(R) (PhaJ)
19	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC

**Tabela 6.** Proteínas relacionadas ao metabolismo de PHA dentro do domínio *Archaea* detectadas nos agrupamentos do metagenoma da Salina de Rio Maior, Portugal.

BIN	Proteína
5	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) (PhaC_1)
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) (PhaC_2)
7	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaE
24	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC

**Tabela 7.** Lista de genes relacionados ao metabolismo de PHA encontrados no metagenoma. Os asteriscos são referentes às anotações das proteínas que não foram anotadas pelo programa Prokka e foram identificadas através do GenBank.

Bin	Proteína (gene)	Organismo próximo	Identidade (%)	Número de acesso
1	Acetil-CoA aciltransferase ( <i>phaA</i> )	<i>Psychroflexus planctonicus</i>	78.52%	WP_188457988.1
	Acetil-CoA aciltransferase	<i>Psychroflexus sp.</i>	98.48%	MDR9400185.1
4	Acetil-CoA acetiltransferase	<i>Halogeometricum rufum</i>	89.43%	WP_089810072.1
	Desidratase da família MaoC	<i>Haloarcula</i>	95.24%	WP_014031079.1
5	Subunidade de Poli(3-hidroxiálcanoato) polimerase PhaC1	<i>Haloarcula mannanytica</i>	81.97%	WP_137683212.1
	Subunidade de Poli(3-hidroxiálcanoato) polimerase PhaC2	<i>Haloarcula</i>	98.02%	WP_127013871.1
6	Acetil-CoA acetiltransferase ( <i>phaA</i> )	<i>Spiribacter roseus</i>	99.23%	WP_110882515.1
	Acetoacetil-CoA redutase ( <i>phbB1</i> )	<i>Spiribacter roseus</i>	99.60%	WP_148121675.1
	Acetoacetil-CoA redutase ( <i>phbB2</i> )	<i>Spiribacter</i>	98.75%	WP_144347497.1
	Sintase de ácido poli(R)-hidroxiálcanoato de classe I ( <i>phaC1</i> )	<i>Spiribacter</i>	99.33%	WP_069133909.1
	Subunidade da sintase do ácido poli(R)-hidroxiálcanoato classe III PhaC ( <i>phaC2</i> )	<i>Gammaproteobacteria bacterium 2W06</i>	98.10%	PZA01159.1
	Polyhydroxyalkanoate synthesis repressor PhaR *	<i>Spiribacter roseus</i>	98.80%	WP_110882516.1

	Subunidade da sintase do ácido poli(R)-hidroxialcanoato PhaE *	<i>Spiribacter sp. SSL99</i>	97.70%	WP_148121678.1
7	Classe III da subunidade PhaC (phaC) da sintase do ácido poli(R)-hidroxialcanoato ( <i>phaC</i> )	<i>Halomicroarcula salinisoli</i>	84.02%	WP_277542290.1
	Subunidade da sintase do ácido poli(R)-hidroxialcanoato PhaE ( <i>phaE</i> )	<i>Halomicroarcula salinisoli</i>	88.89%	WP_220588404.1
	Beta-cetotiolase ( <i>BktB</i> )	<i>Roseibaca ekhonensis</i>	67.27%	WP_121093221.1
	Proteína da família da fosfolipase semelhante à patatina *	<i>Roseibaca sp. Y0-43</i>	78.13%	WP_227426504.1
	Enoil-CoA hidratase específica para (R) ( <i>phaJ</i> )	<i>Roseibaca calidilacus</i>	92.76%	KPP92782.1
	Repressor de síntese de polihidroxialcanoato PhaR *	<i>Paracoccaceae bacterium</i>	80.22%	TVS06314.1
	Fasina *	<i>Paracoccaceaea bacterium</i>	88.97%	MCC5963948.1
13	Polihidroxialcanoato despolimerase *	<i>Roseibaca ekhonensis</i>	89.50%	WP_121096154.1
	Sintase de ácido poli(R)-hidroxialcanoato de classe I	<i>Roseibaca ekhonensis</i>	79.67%	WP_121096159.1
	Acetil-CoA acetiltransferase	<i>Roseibaca sp. Y0-43</i>	90.51%	WP_227427742.1
	Acetoacetil-CoA redutase ( <i>phaB</i> )	<i>Paracoccaceae bacterium</i>	90.38%	WP_072247107.1
	Acetil-CoA acetiltransferase	<i>Roseibaca domitiana</i>	86.35%	WP_249057059.1
	Enoil-CoA hidratase específica para (R) ( <i>phaJ</i> )	<i>Roseovarius gahaiensis</i>	93.86%	WP_167199634.1

	Acetil-CoA acetiltransferase	<i>Paracoccaceae bacterium</i>	90.77%	MCR9114915.1
	Proteína da família das Fasinas *	<i>Roseovarius salinarum</i>	52.67%	WP_101067911.1
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC_1	<i>Roseovarius gahaiensis</i>	76.00%	NHQ75873.1
18	Beta-cetotiolase ( <i>BktB</i> )	<i>Roseovarius indicus</i>	84.83%	WP_057817487.1
	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC_2	<i>Roseovarius indicus</i>	83.03%	WP_064260702.1
	Repressor de síntese de polihidroxiacanoato PhaR *	<i>Roseovarius sp. HI0049</i>	82.81%	KZY30311.1
	Proteína da família das Fasinas *	<i>Roseovarius sp. MMSF_3281</i>	89.78%	WP_306152375.1
19	Subunidade da polimerase de poli(3-hidroxiacanoato) PhaC	<i>Salibaculum halophilum</i>	95.03%	WP_084860574.1
	Proteína da família das Fasinas *	<i>Salibaculum halophilum</i>	99.32%	WP_084860573.1
24	Subunidade PhaC da sintase do ácido polihidroxiacanoico de classe III	<i>Natrinema sp. SICR25-10</i>	91.98%	WP_233340652.1

## 5. Discussão:

A exploração de novas espécies produtoras de PHAs é crucial no cenário global devido à sua capacidade de promover a sustentabilidade ambiental, diversificar a economia e promover a inovação tecnológica. Esses polímeros biodegradáveis representam uma alternativa promissora aos plásticos convencionais derivados de petróleo, oferecendo soluções para os desafios contemporâneos de resíduos plásticos e segurança alimentar (Obruča *et al.*, 2022). Além disso, a busca por genes relacionados ao metabolismo de PHA em metagenomas apresenta uma nova perspectiva na exploração desses compostos, permitindo a descoberta de novas rotas metabólicas e a otimização dos processos de produção, ampliando ainda mais o potencial desses materiais sustentáveis (Handelsman, 2005; Lin *et al.*, 2021). Neste contexto, a pesquisa e o desenvolvimento de novas espécies produtoras de PHAs desempenham um papel fundamental na busca por um futuro mais sustentável e resiliente. A utilização de microrganismos extremófilos é bastante promissora para o campo, com enfoque nos halófilos. Todavia, devido a elevada concentração de sal necessária para o cultivo destes microrganismos, as técnicas utilizadas para a exploração da síntese de PHA por halófilos podem ser prejudicadas. No caso da utilização de biorreatores para produção em larga escala, a utilização de sal em conjunto com condições aeróbicas resulta na corrosão do material em uso (Hezayen *et al.*, 2000). Durante a realização do presente trabalho, a realização da técnica de microscopia óptica e coloração por Sudan Black resultou diversas vezes na cristalização dos sais presentes nos meios de cultivo utilizados e conseqüentemente, em algumas estirpes, resultou na ruptura celular devido à osmólise. Isto foi notável para os resultados da estirpe RMP-11<sup>T</sup> através da microscopia óptica (Figura 7). Curiosamente, durante a manipulação da estirpe RMP-111a, próxima a *Halobacterium salinarum*, a estabilidade das células permaneceu a mesma durante a lavagem das células para a remoção do excesso do meio de cultura, mantendo sua morfologia habitual de bastonetes (Imagem X). Estudos indicam que isto pode estar relacionado à uma rápida recuperação da dinâmica molecular funcional do proteoma de *H. salinarum* e, como resultado, uma capacidade de se sobressair durante flutuações ambientais (Vauclare *et al.*, 2020). A partir da imagem de microscopia óptica foi possível detectar pontos mais fortemente corados e semelhantes aos grânulos no interior das células. Em contrapartida, a detecção de PHB a partir do ensaio do ácido crotônico não apresentou um resultado positivo. Para além, devido a indisponibilidade das micrografias de microscopia eletrônica até a finalização deste trabalho, não foi possível confirmar a produção de PHA por RMP-111a através de mais de um

experimento. Por isso, para uma melhor confirmação destes resultados, se faz necessária a utilização de outras metodologias. Ao contrário de RMP-111a, as células de RMP-17, estirpe filogeneticamente próxima de *H. marismortui*, apresentaram resultados promissores. Embora a visualização dos grânulos intracelulares não ter sido possível, a estirpe RMP-17 apresentou resultados positivos ao acúmulo de PHB em todas as vezes que as extrações foram realizadas e sujeitas a detecção de PHB quando a estirpe foi crescida em meio mineral mínimo suplementado por glicose. O estudo de Han *et al.*, 2007, relatou para além da detecção *in vivo* de PHB através da suplementação por glicose por *H. marismortui*, a caracterização molecular do operon *phaEC<sub>Hm</sub>*. O perfil de expressão dos genes *phaEC<sub>Hm</sub>* foi analisado, e a importância dos dois genes na síntese de PHB foi identificada por meio de expressão heteróloga e investigações de *knockout/complementação* gênica sugerindo que tanto *PhaC<sub>Hm</sub>* quanto *PhaE<sub>Hm</sub>* são necessários para a síntese de PHA ativa em *H. marismortui*. Embora o ácido crotonico não tenha sido detectado quando a estirpe foi crescida em glicerol, a produção de PHB por *H. marismortui* através da suplementação por vinhaça, resíduo da produção industrial de etanol, já foi estudada (Pramanik *et al.*, 2012). Desta maneira, o presente estudo corrobora com os resultados positivos da produção de PHB pela estirpe de *H. marismortui*. A outra estirpe que apresentou resultados positivos foi RMP-11<sup>T</sup> e isto é interessante, uma vez que a estirpe é representante de uma nova espécie e está no momento a ser descrita. Ainda que os valores do ensaio do ácido crotonico não tenham sido muito elevados, estes ainda se enquadram dentro do que se é considerado um resultado positivo dentro do ensaio. Não o bastante, vale ressaltar que os valores positivos obtidos referentes à extração de PHB pela estirpe são duplamente referentes à extração realizada pela solução de SDS (Figura 10, 11 e 12). Isso pode ser um indicativo sobre a relação da metodologia aplicada e as características celulares da estirpe (Escalona *et al.*, 1996). Validando os resultados obtidos a partir da extração, a mesma estirpe apresentou grânulos corados por Sudan Black quando analisados por microscopia óptica e também demonstrou a presença de inclusão celular quando analisadas por microscopia eletrônica, sendo ambos os resultados referentes ao crescimento celular em meio mínimo suplementado por glicose (Fig 7 e 8). Durante o desenvolvimento dos protocolos de extração, uma metodologia de extração foi realizada como teste inicial para a maioria das estirpes utilizadas no presente trabalho crescidas em 2% de glicose e, embora o protocolo seja adaptado para estirpes bacterianas, o resultado foi semelhante as extrações adaptadas para estirpes de haloarquéias (Pagliano *et al.*, 2021). Neste caso, o pico de absorvância a 235 nm pela estirpe RMP-11<sup>T</sup> ficou mais evidente e também foi possível identificar picos produzidos pelas amostras referentes às estirpes RMP-1, RMP-17 e RMP-111a (Anexo 3). A diferença nos

resultados obtidos levanta a hipótese da eficácia dos protocolos de extração quando relacionados à ruptura celular, uma vez que a utilização de um agente surfactante pode ser mais eficaz do que a utilização puramente de água destilada. No caso da extração nas estirpes RMP-1 e RMP-11<sup>T</sup>, a lise celular através da adição de NaClO e incubação durante 24 horas pode ter sido necessária para a extração de PHA, mas outras técnicas devem ser aplicadas para a confirmação deste resultado (Anexo 1). Infelizmente, nenhum outro resultado foi positivo para a produção de PHB para as demais estirpes a partir das condições de crescimento testadas durante este trabalho. Embora algumas estirpes não tenham apresentado produção detectável de PHB, alguns pontos são interessantes a serem considerados. Uma grande parte dos estudos visando produção de PHA em larga escala foi realizada utilizando espécies de bactérias ou de arqueias com crescimento em fermentadores (Lillo & Rodriguez-Valera, 1990). Não o bastante, devido a maior quantidade de biomassa produzida, a quantidade acumulada para a análise é maior do que os de crescimento em Erlenmeyer, podendo influenciar na quantidade de PHB produzido para detecção e no comportamento microbiano da cultura. Além disso, em *H. mediterranei*, devido ao seu relativo rápido crescimento, vasta diversidade de substrato utilizado para a produção e alta porcentagem de acúmulo de PHB, PHBV e PHV, a espécie é modelo para a produção de PHA e foram detectados acúmulo de PHAs sob condições de depleção de nutrientes orgânicos, como por exemplo nitrogênio ou fósforo em reatores e sob crescimento em concentrações de sal mais baixas (Fernandez-Castillo *et al.*, 1986; Lillo & Rodriguez-Valera, 1990, Cui *et al.*, 2017). A relação com depleção de nutrientes também já foi identificada no domínio *Bacteria*. Em alguns casos, a privação de oxigênio em reatores também alterou o coeficiente de produção de PHB (Ward *et al.*, 1977; Biglari *et al.*, 2020). Portanto, a exploração do potencial das estirpes utilizadas através de outras condições nutricionais e fatores químico-físicos se faz necessária para possíveis resultados positivos.

Dado o limitado conhecimento genético e molecular das enzimas envolvidas na síntese de PHA, a identificação no metagenoma de genes codificantes para estas não é um trabalho linear. Ao contrário dos genes relacionados à síntese de PHA em bactérias que geralmente estão agrupados, isto não é amplamente reconhecido em arqueias (Lu *et al.*, 2008). A análise a partir dos dados do metagenoma da Salina de Rio Maior dos bins de arqueias apresentou enzimas referentes às subunidades de PHA-sintases, como PhaC e PhaE. Com a análise das sequências a partir do GenBank foram identificadas duas proteínas PHA-sintases da classe III. Curiosamente, no BIN 7, para além da subunidade PhaC sintase de classe III também foi identificada uma subunidade PhaE, o que é sugestivo uma vez que sintases de classe III são compostas por PhaC e PhaE. Embora ainda poucos são os estudos publicados identificando e

caracterizando molecularmente as enzimas em haloarquéias, o estudo de Han *et al.*, 2007, caracterizou a enzima PHA-sintase em *H. marismortui* como homólogas as enzimas de classe III bacterianas devido à presença de sequências conservadas semelhantes. Todavia, diferente das estirpes bacterianas, *H. marismortui* apresentou uma diferença substancial no tamanho das subunidades da enzima e a composição dos aminoácidos para a associação ao grânulo da subunidade PhaE estava ausente. Além disso, a análise de 18 estirpes de 12 gêneros de haloarquéias apresentou resultados corroborativos e, como resultado disso, o estudo propôs uma nova classe III de PHA-sintase para o domínio *Archaea* (Han *et al.*, 2010). Embora a busca por genes codificantes a proteínas participantes do metabolismo de PHA em arqueias resultou na detecção das enzimas chaves para a polimerização, é notável o número reduzido das outras enzimas identificadas no metagenoma. Isto pode estar relacionado ao fato da compreensão das enzimas em *Archaea* ainda ser limitada. Embora a descrição das vias metabólicas e enzimas participantes da síntese de PHA esteja mais elucidada em bactérias, estas ainda não estão totalmente consolidadas. A análise dos genes e proteínas relacionadas à biossíntese de PHA detectou no BIN 6 todas as enzimas participantes da via clássica de PHA. Curiosamente, a detecção da sequência de aminoácidos da proteína PhaA apresentava logo em seguida uma proteína hipotética e a comparação desta contra o Genbank suportou a anotação da função do gene como codificante de uma proteína repressora da síntese de PHA (PhaR). Em seguimento a estes dois genes, os genes de PhaB e PhaC foram detectados. Assim como a proteína repressora da síntese de PHA (PhaR), uma subunidade de PhaE foi detectada logo após a sequência de aminoácidos da subunidade PhaC. Uma vez que a subunidade PhaC teve sua anotação gerada pelo Prokka e a comparação contra o Genbank corroborou a anotação da função do gene, o qual apresentou como resultado uma subunidade de PHA-sintase de classe III, isto sugere uma complementação das subunidades PhaC e PhaE de mesma classe. Embora seja necessário o sequenciamento do DNA por espécie devido aos métodos de reconstrução dos genes a partir da metodologia de shotgun utilizada para gerar os dados, a análise do metagenoma vai de acordo com os resultados de outros estudos, onde em algumas espécies, é perceptível o agrupamento de genes do metabolismo de PHA (Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2017). Em contrapartida, a detecção de um gene de PhaC apresentou similaridade com a classe I das sintases. Esse achado indica uma variedade de mecanismos e potencial para a produção de PHA entre esses organismos halófilos. Tais descobertas são essenciais para compreender a diversidade e complexidade das vias metabólicas de PHA em microrganismos isolados de ambientes salinos e podem estimular pesquisas adicionais sobre os fatores genéticos envolvidos nesse processo. A partir da análise do percentual de identidade das proteínas do BIN 6, é

notável a similaridade da sequência de aminoácido das proteínas do metagenoma com espécies de *Spiribacter*. Já é sabido que várias espécies do gênero são halofílicas moderadas e isoladas de ambientes salinos, todavia, até o momento, não existem estudos publicados sobre a produção de PHA por espécies pertencentes ao gênero *Spiribacter* (León *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2023). Similar a BIN 6, no BIN 13 foram detectados os genes chaves para a síntese de PHA. Após a detecção do gene *bktB*, codificante para uma proteína beta-cetotiolase, uma proteína identificada como hipotética pelo programa Prokka e localizada a 3 posições acima de *bktB*, teve a sua anotação corroborada no GenBank como uma proteína da família da fosfolipase semelhante à patatina. Em um estudo utilizando uma fração do grânulo de PHB isolado da espécie *R. eutropha*, o gene codificador de uma proteína da família da fosfolipase semelhante à patatina foi identificado formando um operon com *phaB* e *phaC*, o que sugere uma possível função no metabolismo de PHB (Sznajder *et al.*, 2014). Embora o conhecimento sobre essa proteína ainda seja escasso, em *Haloflex mediterranei*, a proteína já foi identificada associada aos grânulos e à degradação de PHA (Liu *et al.*, 2015). Não o bastante, a partir da detecção do gene *phaC* no mesmo BIN, a sequência de aminoácidos de duas proteínas antecessoras de PhaC tiveram suas sequências comparadas contra o GenBank e este suportou a anotação da função do gene como um repressor de síntese de polihidroxialcanoato (PhaR) e como uma fasina (PhaP). Em adição, a sequência de aminoácidos da proteína sucessora a PhaC, segundo o GenBank, foi identificada como uma PhaZ. Em *R. eutropha*, *phaR* está situado após o operon biossintético de PHA, *phaCAB* (Slater *et al.*, 1998). Diversos estudos caracterizaram combinações de agrupamento de genes codificantes para proteínas PhaC, PhaR, PhaP e PhaZ, todavia, ainda não foi identificado uma congruência para a disposição destes genes, mas a regulação de PhaP por PhaR já foi demonstrada e relacionada com a biossíntese, acúmulo e formação de grânulos (Cai *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2015). Não diferente, no BIN 18, após a detecção de um gene de PhaC a anotação foi identificada pelo GenBank como uma proteína PhaP, sendo a sequência de aminoácidos de PhaP localizada apenas uma sequência de aminoácidos de uma outra proteína hipotética. Não o suficiente, quando o segundo gene de PhaC foi detectado a partir da anotação por Prokka, as duas proteínas hipotéticas seguintes foram identificadas pelo GenBank como uma proteína repressora da síntese de PHA (PhaR) e PhaP, respectivamente. Quando analisados o percentual de identidade das proteínas e os organismos às quais estas pertencem, o gênero *Roseovarius* apareceu relacionado a estas. Atualmente, sabe-se que algumas espécies pertencentes ao gênero são halófilas ou halófilas moderadas e poucos estudos identificaram o acúmulo de PHA pelas espécies do gênero foram publicados (Li *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2020). No BIN 19, a detecção de uma

PhaC via Prokka também resultou numa posterior confirmação da proteína hipotética antecessora, via GenBank, a uma PhaP. Este padrão demonstra uma possível associação dos genes de PHA-sintases com PhaR e PhaP. Todavia, são necessários mais estudos para confirmar estes resultados.

Embora as aplicações do metagenoma sejam abrangentes e acessem informações para além do sequenciamento de um só genoma, a análise de metagenomas apresenta desafios significativos devido à complexidade das comunidades microbianas presentes nas amostras. A diversidade de microrganismos em um metagenoma contribui para a presença de múltiplos conjuntos de genes, dificultando a identificação dos genes envolvidos em vias metabólicas específicas, especialmente quando essas vias são realizadas por uma combinação de diferentes espécies microbianas (Handelsman, 2005). Além disso, o DNA extraído de uma amostra metagenômica é frequentemente fragmentado em pequenos pedaços, o que pode comprometer a montagem genômica completa e resultar em lacunas na sequência, afetando a capacidade de identificar genes completos associados a vias metabólicas. Adicionalmente, muitos genes presentes em um metagenoma podem ter funções desconhecidas ou serem genes "órfãos", sem anotações funcionais conhecidas em bancos de dados públicos, dificultando ainda mais a determinação de sua função e sua relação com vias metabólicas específicas. Infelizmente, a detecção de outros genes, como por exemplo FabG, não foi possível durante a análise do metagenoma. Não se pode descartar a hipótese deste fato poder ser explicado pela mera ausência dos genes, mas também pelos métodos de reconstrução não gerarem a informação completa do material genético presente. Esta é uma consequência das limitações da metodologia de *shotgun*. Apesar das dificuldades do trabalho em relação ao metagenoma, este trabalho resultou na identificação de diversos genes participantes da síntese de PHA, oferecendo oportunidades para estudos futuros.

## 6. Conclusão:

Como resultado deste trabalho, o potencial de exploração da produção de polihidroxialcanoatos a partir dos microrganismos halofílicos presentes na Salina de Rio Maior, a partir do acúmulo de PHA nas suas células e da presença dos genes das vias metabólicas necessários a sua síntese, foi demonstrado. A identificação da maquinaria sintética de PHA no domínio *Archaea* corroborou com os resultados da produção *in vivo* de PHA nas estirpes de haloarquéias. A diversidade de genes encontrados dentro do domínio *Bacteria* mostrou como a biossíntese pode ser complexa e dependente de mecanismos regulatórios como a maioria dos processos celulares.

A busca por genes e vias metabólicas no metagenoma revelou potenciais novos organismos halófilos para a produção de PHA. Uma vez que a acetil-CoA é a precursora do ciclo do ácido cítrico e também de vias de PHA, detectar a presença de genes codificadores de proteínas envolvidas nestes processos é de crucial importância. Isso porque novas aplicações biotecnológicas podem ser desenvolvidas. Em algumas estirpes de bactérias, a utilização da tecnologia CRISPRi (traduzido do inglês: repetições palindrômicas curtas e interespaiais agrupadas) para a repressão do gene codificante para a enzima catalisadora do primeiro passo da via condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, a citrato sintase, resultou no aumento significativo da produção de PHB e PHBV, muito provavelmente devido ao redirecionamento e disponibilidade de acetil-CoA para a produção de PHA ao invés de citrato (Chang *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2017). Não o bastante, entender e identificar os participantes da biossíntese podem abrir espaço para a tecnologia de DNA recombinante, de maneira que organismos não nativo-produtores de PHA podem sintetizar diferentes tipos de PHAs (Slatter *et al.*, 1988; Schubert *et al.*, 1988). A partir da clonagem de fragmentos de DNA derivados do ambiente em um organismo cultivável ou de crescimento mais rápido é uma das aplicações grandiosas na área da biotecnologia e diversidade microbiana. A busca e identificação de genes específicos do metabolismo dos PHAs em uma amostra do metagenoma fornece *insights* sobre o universo de microrganismos não cultiváveis ou até então não cultivados (Handelsman, 2005). Não o bastante, com os resultados obtidos, novas metodologias de recuperação de microrganismos não isolados podem ser desenvolvidas, de maneira a desenvolver e melhorar as condições dos organismos de interesse, como o exemplo de espécies do gênero *Spiribacter*, *Roseibaca* e *Roseovarius*.

Para além do aparato genético, o presente estudo também apresenta a importância dos fatores físico-químicos para uma produção de PHA de sucesso. Demonstrando como a escolha

correta de uma fonte de carbono pode influenciar no acúmulo de PHA intracelular, esta pesquisa impulsiona futuros estudos em microrganismos halófilos em diferentes condições de crescimento e estresse celular, visando uma maior produtividade.

## 7. Perspectivas futuras

A análise das vias metabólicas dos PHAs utilizando bioinformática e a validação do acúmulo *in vivo* emergem como elementos essenciais para futuras investigações. Dito isso, o presente trabalho oferece potencial para aprimorar os parâmetros de cultivo, incluindo rendimento, concentração e taxa de produção pelas estirpes produtoras e as demais estirpes. Este avanço é viabilizado por meio de diversas estratégias, como a expansão da gama de substratos utilizados, a otimização das vias metabólicas e a supressão de reações concorrentes, além do aumento da disponibilidade de precursores de PHA e a regulação do fornecimento de cofatores. Essas abordagens apresentam novas perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes na produção de PHAs. Para uma caracterização completa do PHA produzido por cada espécie, é crucial realizar uma análise econômica para determinar o potencial comercial da espécie com base no rendimento da síntese de PHA, nos custos de produção e na viabilidade de mercado. Além disso, técnicas como GS-MS (Cromatografia gasosa-espectrometria de massa), RMP (Ressonância magnética nuclear) e HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) são necessárias para identificar o tipo de monômero de PHA sintetizado (Han *et al.*, 2010; Legat *et al.*, 2010; Satoh *et al.*, 2016). Posteriormente, é possível explorar o potencial de aprimoramento dos monômeros sintetizados, incorporando-os em copolímeros para conferir propriedades específicas, como maior flexibilidade, estabilidade térmica ou biodegradabilidade. Essa abordagem visa melhorar o produto para atender às diversas demandas no campo científico.

A similaridade das proteínas relacionadas ao metabolismo dos PHAs e com alta similaridade para o gênero *Spiribacter* e *Roseovarius* pôde abrir portas para uma possível recuperação destas espécies a partir de amostras da Salina de Rio Maior e futuros testes visando o acúmulo de PHA. Também, a análise genômica de novos isolados quanto à sua capacidade potencial de produzir bioprodutos pode ser valiosa para aplicações biotecnológicas relacionadas aos PHAs (Pinto *et al.*, 2015).



## Referências:

- Akmal, D., Azizan, M. N., & Majid, M. I. A. (2003). Biodegradation of microbial polyesters P(3HB) and P(3HB-co-3HV) under the tropical climate environment. *Polymer Degradation and Stability*, 80(3), 513–518. 10.1016/S0141-3910(03)00034-X
- Alcântara, J. M. G., Distanto, F., Storti, G., Moscatelli, D., Morbidelli, M., & Sponchioni, M. (2020). Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Advances*, 42, 107582. 10.1016/j.biotechadv.2020.107582
- Alsafadi, D. & Al-Mashaqbeh, O. (2017). A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*, 34, 47–53. 10.1016/j.nbt.2016.05.003
- Anderson, A. W., Nordon, H. C., Cain, R. F., Parrish, G., & Duggan, D. (1956). Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to  $\gamma$  radiation. *Food Technol.* 10, 575–578.
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54, 450–472. 10.1128/mr.54.4.450-472.1990
- Anderson, A. J., Haywood, G. W., & Dawes, E. A. (1990). Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates). *International Journal of Biological Macromolecules*, 12(2), 102–105. 10.1016/0141-8130(90)90060-n
- Arthur, C., Baker, J., & Bamford, H. (2009). Proceedings of the international research workshop on the occurrence, effects and fate of microplastic marine debris, Sept 9–11, 2008; National Oceanic and Atmospheric Administration: 2009.
- Bauer, H., & Owen, A. J. (1988). Some structural and mechanical properties of bacterially produced poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate. *Colloid Polym. Sci.* 266, 241–247. 10.1007/BF01452586
- Bendia, A. G., Signori, C. N., Franco, D. C., Duarte, R. T. D., Bohannan, B. J. M., & Pellizari, V. H. (2018). A Mosaic of Geothermal and Marine Features Shapes Microbial Community Structure on Deception Island Volcano, Antarctica. *Frontiers in Microbiology*, 9. 10.3389/fmicb.2018.00899
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36–D42. 10.1093/nar/gks1195
- Besaratinia, A., Synold, T. W., Chen, H. H., Chang, C., Xi, B., Riggs, A. D., & Pfeifer, G. P. (2005). DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29), 10058–10063. 10.1073/pnas.0502311102

Biglari, N., Orita, I., Fukui, T., & Sudesh, K. (2020). A study on the effects of increment and decrement repeated fed-batch feeding of glucose on the production of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by a newly engineered *Cupriavidus necator* NSDG-GG mutant in batch fill-and-draw fermentation. *Journal of Biotechnology*, 307, 77-86. 10.1016/j.jbiotec.2019.10.013

Biodegradable Plastic Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Starch Based, PLA, PHA, PBAT, PBS), By Application (Packaging, Consumer Goods, Agriculture), And Segment Forecasts 2022 - 2030. (2020) Market Research Reports & Consulting | Grand View Research, Inc. [Acedida em: 12.12.2022 12:12].

Bhattacharyya, A., Jana, K., Haldar, S., Bhowmic, A., Mukhopadhyay, U. K., De, S., & Mukherjee, J. (2015). Integration of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) production by *Haloferax mediterranei* through utilization of stillage from rice-based ethanol manufacture in India and its techno-economic analysis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31, 717–727. 10.1007/s11274-015-1823-4

Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S., Haldar, S., Mukhopadhyay, U., & Mukherjee, J. (2012). Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express*, 2(1), 34.10.1186/2191-0855-2-34

Blum, J. S., Han, S., Lanoil, B., Saltikov, C., Witte, B., Tabita, F. R., Langley, S., Beveridge, T. J., Jahnke, L., & Oremland, R. S. (2009). Ecophysiology of "*Halarsenatibacter silvermanii*" strain SLAS-1T, gen. nov., sp. nov., a facultative chemoautotrophic arsenate respirer from salt-saturated Searles Lake, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1950–1960. 10.1128/aem.02614-08

Boehmwald, F., Muñoz, P., Flores, P., & Blamey, J. M. (2016). Functional Screening for the Discovery of New Extremophilic Enzymes. In J. M. Blamey (Ed.), *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges* (pp. 321-350). Cham: Springer. 10.1007/978-3-319-13521-2\_11

Botterell, Z. L. R., Beaumont, N., Dorrington, T., Steinke, M., Thompson, R. C., & Lindeque, P. K. (2018). Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplankton: A review. *Environmental Pollution*. 10.1016/j.envpol.2018.10.065

Braunegg, G., Lefebvre, G., & Genser, K. F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65(2-3), 127–161. 10.1016/s0168-1656(98)00126-6

Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports*, 6, 26612. 10.1038/srep26612

Brock, T. D., & Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology*, 98(1), 289-297. 10.1128/jb.98.1.289-297.1969

Burdon, K. L. (1946). Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations. *Journal of Bacteriology*, Dec, 52(6), 665-678. 10.1128/jb.52.6.665-678.1946

Cai, S., Cai, L., Liu, H., Liu, X., Han, J., Zhou, J., & Xiang, H. (2012). Identification of the haloarchaeal phasin (PhaP) that functions in polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1946–1952. 10.1128/AEM.07114-11

Cai, S., Cai, L., Zhao, D., Liu, G., Han, J., Zhou, J., & Xiang, H. (2015). A Novel DNA-Binding Protein, PhaR, Plays a Central Role in the Regulation of Polyhydroxyalkanoate Accumulation and Granule Formation in the Haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 373–385. 10.1128/AEM.02878-14

Calado, C., & Brandão, J. (2009). Salinas interiores em Portugal: o caso das marinhas de Rio Maior. *Geonovas*, 22, 45–54.

Cary, S. C., McDonald, I. R., Barrett, J. E., & Cowan, D. A. (2010). On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils. *Nature Reviews Microbiology*, 8(2), 129–138. 10.1038/nrmicro2281

Castro, D. J., Gomez-Altuve, A., Reina, J. C., Rodríguez, M., Sampedro, I., Llamas, I., & Martínez-Checa, F. (2020). *Roseovarius bejariae* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a hypersaline steep-sided river bed. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 3194-3201. 10.1099/ijsem.0.004154

Chang, Y., Su, T., Qi, Q., & Liang, Q. (2016). Easy regulation of metabolic flux in *Escherichia coli* using an endogenous type I-E CRISPR-Cas system. *Microbial Cell Factories*, 15, 195–203. 10.1186/s12934-016-0594-4

Chambon, M., Elberse, J. E., Dalege, J., Beijer, N. R. M., & van Harreveld, F. (2023). Understanding public perceptions toward sustainable healthcare through psychological network analysis of material preference and attitudes toward plastic medical devices. *Scientific Reports*, 13(1), 17938. 10.1038/s41598-023-45172-6

Chek, M. F., Kim, S.-Y., Mori, T., Tan, H. T., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2020). Asymmetric Open-Closed Dimer Mechanism of Polyhydroxyalkanoate Synthase PhaC. *iScience*, 23(5), 101084. 10.1016/j.isci.2020.101084

Chek, M. F., Kim, S.-Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from *Chromobacterium* sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Sci Rep* 7, 7, 5312. 10.1038/s41598-017-05509-4

Chien, A., Edgar, D. B., & Trela, J. M. (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127(3), 1550–1557. 10.1128/jb.127.3.1550-1557.1976

Choi, G. G., Kim, H. W., Kim, Y. B., & Rhee, Y. H. (2005). Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes sp. MT-16*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(6), 540–545.

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D. R., da Costa, M. S., Rooney, A. P., Yi, H., Xu, X. W., De Meyer, S., Trujillo, M. E. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466. 10.1099/ijsem.0.002516

Conkle, J. L., Báez Del Valle, C. D., & Turner, J. W. (2017). Are We Underestimating Microplastic Contamination in Aquatic Environments? *Environmental Management*, 61(1), 1–8. 10.1007/s00267-017-0947-8

Cordero, R. R., Feron, S., Damiani, A., Redondas, A., Carrasco, J., Sepúlveda, E., Jorquera, J., Fernandoy, F., Llanillo, P., Rowe, P. M., & Seckmeyer, G. (2022). Persistent extreme ultraviolet irradiance in Antarctica despite the ozone recovery onset. *Scientific Reports*, 12(1), 1266. 10.1038/s41598-022-05449-8

Cox, M. M., & Battista, J. R. (2005). *Deinococcus radiodurans* — the consummate survivor. *Nature Reviews Microbiology*, 3(11), 10.1038/nrmicro1264

Cui, Y.-W., Shi, Y.-P., & Gong, X.-Y. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Advances*, 7(31), 18953–18961. /10.1039/C7RA02131C

Dibrova, D. V., Galperin, M. Y., & Mulkidjanian, A. Y. (2014). Phylogenomic reconstruction of archaeal fatty acid metabolism. *Environmental Microbiology*, 16(4), 907–918. 10.1111/1462-2920.12359

Da Costa, M. S., Santos, H., & Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. In: Antranikian G (ed) *Biotechnology of extremophiles. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 61, 117–153. 10.1007/BFb0102291

Da Cruz Nizer, W. S., Inkovskiy, V., & Overhage, J. (2020). Surviving Reactive Chlorine Stress: Responses of Gram-Negative Bacteria to Hypochlorous Acid. *Microorganisms*, 8(8), 1220. 10.3390/microorganisms8081220

Daly, M. J., Gaidamakova, E. K., Matrosova, V. Y., Kiang, J. G., Fukumoto, R., Lee, D.-Y., Wehr, N. B., Viteri, G. A., Berlett, B. S., & Levine, R. L. (2010). Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. *PLoS One*, 5, e12570. 10.1371/journal.pone.0012570

DasSarma, S., Kennedy, S. P., Berquist, B., Victor Ng, W., Baliga, N. S., Spudich, J. L., Krebs, M. P., Eisen, A. J., Johnson, C. H., Hood, L. (2001). Genomic perspective on the photobiology of *Halobacterium* species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon. *Photosynthesis Research*, 70(1), 3–17.10.1023/a:1013879706863

Dean, C. J., Feldschreiber, P., & Lett, J. T. (1966). Repair of X-Ray Damage to the Deoxyribonucleic Acid in *Micrococcus radiodurans*. *Nature*, 209(5018), 49–52. 10.1038/209049a0

Dedkova, E. N., & Blatter, L. A. (2014). Role of  $\beta$ -hydroxybutyrate, its polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate in mammalian health and disease. *Frontiers in Physiology*, 5, 260. 10.3389/fphys.2014.00260

Dong, Z., & Sun, X. (2000). A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. *Chinese Science Bulletin*, 45, 252–256. 10.1007/BF02884685

Duman, J. G., & Olsen, T. M. (1993). Thermal Hysteresis Protein Activity in Bacteria, Fungi, and Phylogenetically Diverse Plants. *Cryobiology*, 30(3), 322–328. 10.1006/cryo.1993.1031

Eichler, J. (2023). *Halobacterium salinarum*: Life with more than a grain of salt. *Microbiology*, 169(4), 001327. 10.1099/mic.0.001327

Escalona, A., Rodriguez, V. F., & Marcilla, G. A. (1994). Procedure for the extraction of polyhydroxyalkanoates from halophilic bacteria which contain them. European Patent Office Publ. of Application with search report, EP19940500077. European Parliament and Council. Annex VI, table 3.1. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006.

European Bioplastics (2023). Bioplastic market development update 2023. <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics-market-development-update-2023-2/> [Acessado em 08/01/2024]

European Parliament and Council. Annex VI, table 3.1. Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006. [Acessado em: 11/11/2023].

Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., Gonzalez, O., Pfeiffer, F., Bornberg-Bauer, E., & Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic archaea, *Extremophiles*, 12, pp. 177–196. 10.1007/s00792-008-0138-x

Favero, M. S., Carson, L. A., Bond, W. W., & Petersen, N. J. (1971). *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals, *Science*, 173(3999), pp. 836–838. 10.1126/science.173.3999.836

Fernandez-Castillo, R. F., Rodriguez-Valera, J., Gonzalez-Ramos, F., & Ruiz-Berraquero (1986). Accumulation of poly(-hydroxybutyrate) by halobacteria, *Applied Environmental Microbiology*, 51, pp. 214–216. 10.1128/aem.51.1.214-216.1986

Fiedler, S., Steinbuchel, A., & Rehm, B. H. (2002). The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the Fadba operon from *P. oleovorans* and of the

enoyl-CoA hydratase genes PhaJ from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*, *Arch. Microbiol.*, 178, pp. 149–160. 10.1007/s00203-002-0444-0

Finlayson, C. M., Milton, R., Prentice, C., & Davidson, N. C. (eds) (2018). *The Wetland Book II, Distribution, Description, and Conservation*. Berlin: Springer.

Franco, D. C., Signori, C. N., Duarte, R. T. D., Nakayama, C. R., Campos, L. S., & Pellizari, V. H. (2017). High Prevalence of *Gammaproteobacteria* in the Sediments of Admiralty Bay and North Bransfield Basin, Northwestern Antarctic Peninsula. *Frontiers in Microbiology*, 8. 10.3389/fmicb.2017.00153

Fredi, G., & Dorigato, A. (2021). Recycling of bioplastic waste: A review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 4(3), pp. 159–177. 10.1016/J.AIEPR.2021.06.00

Frösler, J., Panitz, C., Wingender, J., Flemming, H.-C., & Rettberg, P. (2017). Survival of *Deinococcus geothermalis* in Biofilms under Desiccation and Simulated Space and Martian Conditions. *Astrobiology*, 17, pp. 431–447. 10.1089/ast.2015.1431

Fukui, T., & Doi, Y. (1997). Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology*, 179(15), pp. 4821–4830. 10.1128/JB.179.15.4821-4830.1997

Fukui, T., Shiomi, N., & Doi, Y. (1998). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*, *J. Bacteriol.*, 180, pp. 667-673. 10.1128/JB.180.3.667-673.1998

Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria, *Adv Microb Physiol*, 37, pp. 273–328. 10.1016/S0065-2911(08)60148-4

Gao, D., Maehara, A., Yamane, T., & Ueda, S. (2001). Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiology Letters*, 196(2), pp. 159–164. 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10558.x

Giani, M. & Martínez-Espinosa, R.M. (2020). Carotenoids as a Protection Mechanism against Oxidative Stress in *Haloferax mediterranei*, *Antioxidants*, 9, p. 1060. 10.3390/antiox9111060

Gonzalez, C., Gutierrez, C., & Ramirez, C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp. nov. An amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 24, pp. 710–715. 10.1139/m78-119

Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J., & Xiang, H. (2007). Molecular Characterization of the phaECHm Genes, Required for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), pp. 6058–6065. 10.1128/AEM.00953-07

Han, J., Hou, J., Liu, H., Cai, S., Feng, B., Zhou, J., & Xiang, H. (2010). Wide Distribution among Halophilic Archaea of a Novel Polyhydroxyalkanoate Synthase Subtype

with Homology to Bacterial Type III Synthases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7811–7819. 10.1128/AEM.01117-10

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol*, 5, pp. R245–9. 10.1016/s1074-5521(98)90108-9

Handelsman, J. (2005). Metagenomics or Megagenomics?, *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), pp. 457–458. 10.1038/nrmicro1185

Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., & Chang, H. N. (1994). Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), pp. 256–261. 10.1002/bit.260440215

Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L., & Dawes, E. A. (1988). Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*, 52(1-2), pp. 91–96. 10.1111/J.1574-6968.1988.TB02577.X

Healy, F. G., Ray, R. M., Aldrich, H. C., Wilkie, A. C., Ingram, L. O., & Shanmugam, K. T. (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), pp. 667–674. 10.1007/BF00164771

Hezayen, F. F., Rehm, B. H. A., Eberhardt, R., & Steinbüchel, A. (2000). Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, pp. 319–325. 10.1007/s002530000394

Hong, J., Park, W., Seo, H., Kim, I.-K., & Kim, K.-J. (2020). Crystal structure of an acetyl-CoA acetyltransferase from PHB producing bacterium *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 10.1016/j.bbrc.2020.09.048

Jaenicke, R. (1996). Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *FASEB J.*, 10, pp. 84–92. 10.1096/fasebj.10.1.8566552

Jin, H., Ma, T., Sha, X., Liu, Z., Zhou, Y., Meng, X., Chen, Y., Han, X., & Ding, J. (2021). Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *J Hazard Mater.*, 401, p. 123430. 10.1016/j.jhazmat.2020.123430

Jendrossek, D., Schirmer, A., & Schlegel, H. G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6), pp. 451–463. 10.1007/s002530050844

Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes)., *Journal of Bacteriology*, 191(10), pp. 3195–3202. 10.1128/JB.01723-08

Johnson, S. S., Hebsgaard, M. B., Christensen, T. R., Mastepanov, M., Nielsen, R., Munch, K., Brand, T., Gilbert, M. T., Zuber, M. T., Bunce, M., Rønn, R., Gilichinsky, D., Froese, D., & Willerslev, E. (2007). Ancient bacteria show evidence of DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(36), pp. 14401-5. 10.1073/pnas.0706787104

Jolivet, E. (2003). *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 53(3), pp. 847–851.

Karray, F., Ben Abdallah, M., Baccar, N., Zaghden, H., & Sayadi, S. (2021). Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by *Haloarcula*, *Halorubrum*, and *Natrinema* Haloarchaeal Genera Using Starch as a Carbon Source. *Archaea.*, 2021, p. 8888712. 10.1155/2021/8888712

Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., & Horikoshi, K. (1998). Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Appl Environ Microbiol.*, 64(4), pp. 1510-3. 10.1128/AEM.64.4.1510-1513.1998

Kirk, R. G. & Ginzburg, M. (1972). Ultrastructure of two species of halobacterium. *Journal of Ultrastructure Research*, 41, pp. 80–94. 10.1016/S0022-5320(72)90040-8

Kjeldsen, A., Price, M., Lilley, C., Guźniczak, E., & Archer, I. (2018). A review of standards for biodegradable plastics. *Industrial Biotechnology Innovation Centre*, 33(1).

Kogure, K., Simidu, U., & Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(3), pp. 415–420. 10.1139/m79-063

Köhler, A. T., Rodloff, A. C., Labahn, M., Reinhardt, M., Truyen, U., & Speck, S. (2018). Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Journal of Hospital Infection*. 10.1016/j.jhin.2018.07.017

Koller, M., Niebelschütz, H., & Braunegg, G. (2013a). Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences*, 13(6), pp. 549–562. 10.1002/elsc.201300021

Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., & Braunegg, G. (2013b). Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates] (scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure. *Biotechnology Letters*, 35(7), pp. 1023–1028. 10.1007/s10529-013-1185-7

Koller, M. (2017). Production of Poly Hydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by extremophiles. *MOJ Polymer Science*, 1(2). 10.15406/mojps.2017.01.00011

Kühn, S., Bravo Rebolledo, E. L., & van Franeker, J. A. (2015). Deleterious effects of litter on marine life. In *Marine Anthropogenic Litter*; Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Eds.; Springer: Cham: pp 75–116. 10.1007/978-3-319-16510-3\_4

Kumar, P., & Kim, B. S. (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource technology*, 269, pp. 544-556. 10.1016/j.biortech.2018.08.120

Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria. *Microbial Life in Extreme Environments*, Academic Press; London, UK.: p. 318.

Kutralam-Muniasamy, G., Corona-Hernandez, J., Narayanasamy, R.-K., Marsch, R., & Pérez-Guevara, F. (2017). Phylogenetic diversification and developmental implications of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate gene cluster assembly in prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13). 10.1093/femsle/fnx135

Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology*, 82(1), 33-36. 10.1128/jb.82.1.33-36.1961

Lee, S. Y. (2000). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14. 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P

Legat, A., Gruber, C., Zangger, K., Wanner, G., & Stan-Lotter, H. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1119–1127. 10.1007/s00253-010-2611-6

León, M. J., Fernández, A. B., Ghai, R., Sánchez-Porro, C., Rodríguez-Valera, F., & Ventosa, A. (2014). From Metagenomics to Pure Culture: Isolation and Characterization of the Moderately Halophilic Bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(13), 3850–3857. 10.1128/AEM.00430-14

Li, Z., Zhao, R., Ji, S., Shi, X., & Zhang, X.-H. (2013). *Roseovarius marisflavi* sp. nov., isolated from an amphioxus breeding zone in the coastal region of the Yellow Sea, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(3), 413–421. 10.1007/s10482-013-9965-6

Li, B., Ding, Y., Cheng, X., Sheng, D., Xu, Z., Rong, Q., Wu, Y., Zhao, H., Ji, X., & Zhang, Y. (2020). Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere*, 244, 125492. 10.1016/j.chemosphere.2019.125492

Lillo, J. G., & Rodríguez-Valera, F. (1990). Effects of culture conditions on poly(beta-hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2517-2521. 10.1128/aem.56.8.2517-2521.1990

Lin, L., Chen, J., Mitra, R., Gao, Q., Cheng, F., Xu, T., Zuo, Z., & Xiang, H. (2021). Optimising PHBV biopolymer production in haloarchaea via CRISPRi-mediated redirection of carbon flux. *Communications Biology*, 4, 1007. 10.1038/s42003-021-02541-z

Lithner, D., Larsson, Å., & Dave, G. (2011). Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of The Total Environment*, 409(18), 3309–3324. 10.1016/j.scitotenv.2011.04.038

Liu, M., González, J. E., Willis, L. B., & Walker, G. C. (1998). A Novel Screening Method for Isolating Exopolysaccharide-Deficient Mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4600–4602. 10.1128/AEM.64.11.4600-4602.1998

Liu, Q., Zhang, H., Deng, B., & Zhao, X. (2014). Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): Structure, Property, and Fiber. *International Journal of Polymer Science*, 1–11. 10.1155/2014/374368

Liu G., Hou J., Cai S., Zhao D., Cai L., Han J., Zhou J., & Xiang H. (2015). A patatin-like protein associated with the polyhydroxyalkanoate (PHA) granules of *Haloferax mediterranei* acts as an efficient depolymerase in the degradation of native PHA. *Appl Environ Microbiol*, 81(9), 3029-38. 10.1128/AEM.04269-14

Liu, G., Cai, S., Hou, J., Zhao, D., Han, J., Zhou, J., & Xiang, H. (2016). Enoyl-CoA hydratase mediates polyhydroxyalkanoate mobilization in *Haloferax mediterranei*. *Scientific Reports*, 6, 24015. 10.1038/srep24015

Lizama, C., Monteoliva-Sánchez, M., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Suárez-García, A., Campos, V., & Roselló-Mora, R. (2002). *Halorubrum tebenquichense* sp. nov., a novel halophilic archaeon isolated from the Atacama Saltern, Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 149–155. 10.1099/00207713-52-1-149

Lu, H. B., Xue, X. F., Phurbu, D., Xing, P., & Wu, Q. L. (2018). *Roseovarius tibetensis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Lake LongmuCo on Tibetan Plateau. *Journal of Microbiology*, 56, 783–789. 10.1007/s12275-018-8178-0

Luzier, W. D. (1992). Materials derived from biomass/biodegradable materials. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(3), 839–842. 10.1073/pnas.89.3.839

MacElroy M (1974). Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6:74–75. 10.1016/0303-2647(74)90026-4

Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T., & Doi, Y. (2002). A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3992–4002. 10.1128/JB.184.14.3992-4002.2002

Mahansaria, R., Choudhury, J. D., & Mukherjee, J. (2015). Polymerase chain reaction-based screening method applicable universally to environmental haloarchaea and halobacteria for identifying polyhydroxyalkanoate producers among them. *Extremophiles*, 19(5), 1041–1054. 10.1007/s00792-015-0775-9

Mani, K., Salgaonkar, B.B., & Braganca, J.M. (2012). Culturable halophilic archaea at the initial and crystallization stages of salt production in a natural solar saltern of Goa, India. *Aquat. Biosyst.* 8, 15. 10.1186/2046-9063-8-15

McCool, G. J., & Cannon, M. C. (2001). PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, 183(14), 4235–4243. 10.1128/JB.183.14.4235-4243.2001

McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., & Cannon, M. C. (1996). Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. *FEMS Microbiology Letters*, 138(1), 41–48. 10.1016/0378-1097(96)00079-1

Meng, D. C., Shen, R., Yao, H., Chen, J.-C., Wu, Q., & Chen, G.-Q. (2014). Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 24–33. 10.1016/j.copbio.2014.02.013

Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., & Zhang, S. (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology*, 10. 10.3389/fmicb.2019.00780

Merrick, J. M., & Doudoroff, M. (1964). Depolymerization of Poly-Beta-Hydroxybutyrate by intracellular enzyme system. *Journal of Bacteriology*, 88(1), 60-71. 10.1128/jb.88.1.60-71.1964

Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Ferreira, E. C. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta*, 865(1), 8–15. 10.1016/j.aca.2015.01.018

Mierziak, J., Burgberger, M., & Wojtasik, W. (2021). 3-Hydroxybutyrate as a Metabolite and a Signal Molecule Regulating Processes of Living Organisms. *Biomolecules*, 11(3), 402. 10.3390/biom11030402

Mitomo, H., Barham, P., & Keller, A. (1987). Crystallization and Morphology of Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and Its Copolymer. *Polym J*, 19, 1241–1253. 10.1295/POLYMJ.19.1241

Mitra, R., Xu, T., Xiang, H., & Han, J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 86. 10.1186/s12934-020-01342-z

Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(1), 371–394. 10.1146/ANNUREV.MI.03.100149.002103

Morohoshi, T., Ogata, K., Okura, T., & Sato, S. (2018). Molecular Characterization of the Bacterial Community in Biofilms for Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) Films in Seawater. *Microbes and Environments*, 33(1), 19–25. 10.1264/jsme2.ME17052

Narancic, T., Verstichel, S., Reddy Chaganti, S., Morales-Gamez, L., Kenny, S. T., De Wilde, B., Babu Padamati, R., & O'Connor, K. E. (2018). Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution. *Environmental Science & Technology*. 10.1021/acs.est.8b02963

Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A. (2017). MetaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 27(5), 824-834. 10.1101/gr.213959.116

OECD. (2022). Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060. OECD Publishing, Paris. OECD iLibrary. [Acedida em: 28/11/2022].

Oeding, V., & Schlegel, H. G. (1973).  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. *Biochemical Journal*, 134(1), 239–248. 10.1042/BJ1340239

Obruča, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances*, 36(3), 856–870. 10.1016/j.biotechadv.2017.12.006

Obruča, S., Dvořák, P., Sedláček, P., Koller, M., Sedlář, K., Pernicová, I., & Šafránek, D. (2022). Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances*, 58, 107906. 10.1016/j.biotechadv.2022.107906

Oren, A., Ginzburg, M., Ginzburg, B. Z., Hochstein, L. I., & Volcani, B. E. (1990). *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an Extremely Halophilic Bacterium from the Dead Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40(2), 209–210. 10.1099/00207713-40-2-209

Oren, A. (2011). Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environmental Microbiology*, 13, 1908–1923. 10.1111/j.1462-2920.2010.02365.x

Oren, A. (2013). “Life in magnesium- and calcium-rich hypersaline environments: salt stress By Chaotropic Ions,” in *Polyextremophiles. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, eds J. Seckbach, A. Oren, and H. Stan-Lotter (Dordrecht: Springer), 215–232. 10.1007/978-94-007-6488-0

Oren, A. (2014). The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 21, 23. 10.1186/s40709-014-0023-y

Pagliano, G., Galletti, P., Samorì, C., Zaghini, A., & Torri, C. (2021). Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 5410.3389/fbioe.2021.624021

Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. 10.1101/gr.186072.114

Peak, M. J., Robb, F. T., & Peak, J. G. (1995). Extreme resistance to thermally induced DNA backbone breaks in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, 177, 6316–6318. 10.1128/jb.177.21.6316-6318.1995

Peoples, O. P., & Sinskey, A. J. (1989). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15298–15303. 10.1016/S0021-9258(19)84825-1

Pinto, L. H., D'Alincourt Carvalho-Assef, A. P., Vieira, R. P., Clementino, M. M., & Albano, R. M. (2015). Complete genome sequence of *Haloferax gibbonsii* strain ARA6, a potential producer of polyhydroxyalkanoates and halocins isolated from Araruama, Rio de Janeiro, Brasil. *Journal of Biotechnology*, 212, 69–70. 10.1016/j.jbiotec.2015.08.010

Policastro, G., Panico, A., & Fabbicino, M. (2021). Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 20(2), 479–513. 10.1007/s11157-021-09575-z

Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F., & Steinbüchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 148(8), 2413–2426. 10.1099/00221287-148-8-2413

Pötter, M., Müller, H., Reinecke, F., Wieczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., Friedrich, B., & Steinbüchel, A. (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology (Reading)*, 150(Pt 7), 2301-2311. 10.1099/mic.0.26970-0

Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation†. *Biomacromolecules*, 6(2), 552–560. 10.1021/bm049401n

Pötter, M., Müller, H., & Steinbüchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 151, 825–833. 10.1099/mic.0.27613-0

Pramanik, A., Mitra, A., Arumugam, M., Bhattacharyya, A., Sadhukhan, S., Ray, A., Haldar, S., Kumar, U, Mukherjee, J. (2012). Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. *Folia Microbiologica*, 57(1), 71–79. 10.1186/2191-0855-2-34

Prieto, A., Escapa, I. F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., de la Peña, F., Tarazona, N., & Revelles, O. (2015). A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 18(2), 341–357. 10.1111/1462-2920.12760

Primpke, S., Christiansen, S. H., Cowger, W., De Frond, H., Deshpande, A., Fischer, M., Holland, E. B., Meyns, M., O'Donnell, B. A., Ossmann, B. E., Pittroff, M., Sarau, G., Scholz-Böttcher, B. M., & Wiggin, K. J. (2020). Critical Assessment of Analytical Methods for the Harmonized and Cost-Efficient Analysis of Microplastics. *Applied Spectroscopy*, 74(9), 1012–1047. 10.1177/0003702820921465

Pugh, E. L., Wassef, M. K., & Kates, M. (1971). Inhibition of fatty acid synthetase in *Halobacterium cutirubrum* and *Escherichia coli* by high salt concentrations. *Canadian Journal of Biochemistry*, 49, 953–958. 10.1139/O71-138

Qi, Q., Steinbüchel, A., & Rehm, B. H. A. (2000). In vitro synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II

polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(1), 37–43. 10.1007/s002530000357

Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., & Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1687–1696. 10.1007/s00253-009-2397-6

Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Neifar, M., & Fava, F. (2015). Biotechnological applications of extremophiles, extremozymes and extremolytes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7907–7913. 10.1007/s00253-015-6874-9

Rehm, B. H. A., & Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1-3), 3–19. 10.1016/S0141-8130(99)00010-0

Rehm, B. H. A., & Steinbüchel, A. (2002). PHA synthases: the key enzymes of PHA biosynthesis. In *Biopolymers*; Doi, Y., Steinbüchel, A. (Eds.), Wiley-VCH: Weinheim, Germany; Vol. 3a, pp 173-216. 10.1002/3527600035.bpol3a06

Rehm, B. H. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, 376, 15–33. 10.1042/BJ20031254

Ren, Q., Sierro, N., Witholt, B., & Kessler, B. (2000). FabG, an NADPH-Dependent 3-Ketoacyl Reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, Provides Precursors for Medium-Chain-Length Poly-3-Hydroxyalkanoate Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2978–2981. 10.1128/JB.182.10.2978-2981.2000

Robinson, C. K., Webb, K., Kaur, A., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., Baliga, N. S., Place, A., & Diruggiero, J. (2011). A major role for nonenzymatic antioxidant processes in the radioresistance of *Halobacterium salinarum*. *J Bacteriol*, 193(7), 1653–1662. 10.1128/JB.01310-10

Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1980). Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *Journal of General Microbiology*, 119, 535–538. 10.1099/00221287-119-2-535

Romanowicz, K. J., Crump, B. C., & Kling, G. W. (2023). Genomic evidence that microbial carbon degradation is dominated by iron redox metabolism in thawing permafrost. *ISME Communications*, 3, 124. 10.1038/s43705-023-00326-5

Rothschild, L., & Mancinelli, R. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409, 1092–1101. 10.1038/35059215

Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C., & Saito, T. (2001). Cloning of an Intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Gene from *Ralstonia eutropha* H16 and Characterization of the Gene Product. *Journal of Bacteriology*, 183(1), 94–100. 10.1128/JB.183.1.94-100.2001

Sarmiento, F., Peralta, R., & Blamey, J.M (2015). Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3: 1-15. 10.3389/fbioe.2015.00148

Satoh, H., Sakamoto, T., Kuroki, Y., Kudo, Y., & Mino, T. (2016). Application of the Alkaline-Digestion-HPLC Method to the Rapid Determination of Polyhydroxyalkanoate in Activated Sludge. *Journal of Water and Environment Technology*, 14(5), 411–421. 10.2965/JWET.16-027

Schubert, P., Steinbüchel, A., Schlegel, H.G., (1988). Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170, 5837–5847. 10.1128/jb.170.12.5837-5847.1988

Schmidt, T. M., DeLong, E. F., Pace, N. R. (1991). Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Bacteriology*. 1991;173(14):4371–4378. 10.1128/jb.173.14.4371-4378.1991

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 14, July, Pages 2068–2069. 10.1093/bioinformatics/btu153

Sedlacek, P., Slaninova, E., Enev, V., Koller, M., Nebesarova, J., Marova, I., Hrubanova, K., Krzyzanek, V., Samek, O., & Obruča, S. (2019). What keeps polyhydroxyalkanoates in bacterial cells amorphous? A derivation from stress exposure experiments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(4), 1905-1917.10.1007/s00253-018-09584-z

Simó-Cabrera, L., García-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., AbdElgawad, H., Arribas Agüero, A., Monzó Sánchez, F., Cánovas, V., Pire, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2021). *Haloarchaea as Cell Factories to Produce Bioplastics*. *Marine Drugs*, 19(3), 159. 10.3390/md19030159

Kaniuk, Ł., Stachewicz, U. (2021). Development and Advantages of Biodegradable PHA Polymers Based on Electrospun PHBV Fibers for Tissue Engineering and Other Biomedical Applications. *ACS Biomater Sci Eng*, 7(12), 5339-5362. 10.1021/ACSBiomaterials.1C00757

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Slater, S.C., Voige, W.H., Dennis, D.E. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.*, 170, 4431–4436. 10.1128/jb.170.10.4431-4436.1988

Slobodkina, G. B., Kolganova, T. V., Querellou, J., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Slobodkin, A. I. (2009). *Geoglobus acetivorans* sp. nov., an iron(III)-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2880–2883 10.1099/ijs.0.011080-0

Staley, J. T. & Konopka, A. (1985). Measurement of in Situ Activities of Nonphotosynthetic Microorganisms in Aquatic and Terrestrial Habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39(1), 321–346. 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541

Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 81–96. 10.1016/S1369-703X(03)00036-6

Steinbüchel, A. & Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128(3), 219-228. 10.1016/0378-1097(95)00125-O

Suzuki, M., Tachibana, Y., & Kasuya, K. (2020). Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polymer Journal*, 53(1), 47–66. 10.1038/s41428-020-00396-5

Sznajder, A., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2014). Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1847–1858. 10.1128/AEM.03791-14

Tan, G.-Y., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., L, Y., Zhao, L., Mo, Y., Wang, J.-Y. (2014). *Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review*. *Polymers*, 6, 706–754. 10.3390/polym6030706

Tao, W., Lv, L., & Chen, G. Q. (2017). Engineering *Halomonas species* TD01 for enhanced polyhydroxyalkanoates synthesis via CRISPRi. *Microb. Cell Fact.*, 16, 48–57. 10.1186/s12934-017-0655-3

Thombre, R. S., Shinde, V. D., Oke, R. S., Dhar, S. K., & Shouche, Y. S. (2016). Biology and survival of extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui* RR12 isolated from Mumbai salterns, India in response to salinity stress. *Scientific Reports*, 6, 25642. 10.1038/srep25642

Torsvik, V., Goksøyr, J., Daae, F. L. (1990). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol.* Mar;56(3):782-7. 10.1128/aem.56.3.782-787.1990

Tsuge, T., Taguchi, K., Seiichi, Taguchi, & Doi, Y. (2003). Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid  $\beta$ -oxidation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31(4-5), 195–205. 10.1016/S0141-8130(02)00082-X

Tyson, G., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428, 37–43. 10.1038/nature02340

UPPD (2019). Directive 2019/904 of the European Parliament and of the council on the reduction of the impact of certain plastic products on the environment. Off. J. Eur. Union.

Vauclare, P., Natali, F., Kleman, J. P., Zaccai, G., & Franzetti, B. (2020). Surviving salt fluctuations: stress and recovery in *Halobacterium salinarum*, an extreme halophilic Archaeon. *Sci Rep*, 10, 3298. 10.1038/s41598-020-59681-1

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. Apr 2;304(5667):66-74.10.1126/science.1093857

Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:504–544. 10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998

Verma, D. K., Chaudhary, C., Singh, L., Sidhu, C., Siddhardha, B., Prasad, S. E., & Thakur, K. G. (2020). Isolation and Taxonomic Characterization of Novel Haloarchaeal Isolates From Indian Solar Saltern: A Brief Review on Distribution of Bacteriorhodopsins and V-Type ATPases in Haloarchaea. *Frontiers in Microbiology*, 11. 554927.10.3389/fmicb.2020.554927

Wang L, Armbruster W, Jendrossek D. (2007). Production of medium-chain-length hydroxyalkanoic acids from *Pseudomonas putida* in pH stat. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jul;75(5):1047-53. 10.1007/s00253-007-0920-1

Wang, L., Liu, Q., Wu, X., Huang, Y., Wise, M. J., Liu, Z., Wang, W., Hu, J., Wang, C. (2019). Bioinformatics Analysis of Metabolism Pathways of Archaeal Energy Reserves. *Scientific Reports*, 9, 1034. 10.1038/s41598-018-37768-0

Ward, A. C., Rowley, B. I., Dawes, E. A. (1977). Effect of oxygen and nitrogen limitation on Poly-B-hydroxybutyrate biosynthesis in ammonium-grown *Azotobacter beijerinckii*. *Journal of General Microbiology*, 102, 61-68. 10.1099/00221287-102-1-61.

Wieczorek, R., Pries, A., Steinbüchel, A., & Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2425–2435. 10.1128/jb.177.9.2425-2435.1995

WHO (2019). Cleaning and disinfection of environmental surfaces in the context of COVID-19.

Wu, Y.-W., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2016). MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets, *Bioinformatics*, Volume 32, Issue 4, February, Pages 605–607. 10.1093/bioinformatics/btv638

Zbyszewski, G. & Barreto de Faria, J. (1971). O sal-gema em Portugal Metropolitano; suas jazidas, características e aproveitamento. *Estudos, Notas e Trabalhos do S.F.M.*, 20, 5-105.

Zhang, T. T., Liu, D., Zhang, X. Y., Wang, J. C., & Du, Z. J. (2023). *Spiribacter salilacus* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from a saline lake in China. *Arch Microbiol*, 205, 166. 10.1007/s00203-023-03511-1

Ziajahromi, S., Kumar, A., Neale, P. A., & Leusch, F. D. L. (2017). Impact of Microplastic Beads and Fibers on Waterflea (*Ceriodaphnia dubia*) Survival, Growth, and

Reproduction: Implications of Single and Mixture Exposures. *Environmental Science & Technology*, 51(22), 13397–13406. 10.1021/acs.est.7b03574

Zoumplis, A., Kolody, B., Kaul, D., Zheng, H., Venepally, P., McKnight, D. M., Takacs-Vesbach, C., DeVries, A., Allen, A. E. (2023). Impact of meltwater flow intensity on the spatiotemporal heterogeneity of microbial mats in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica, *ISME Communications*, Volume 3, Issue 1, 3. 10.1038/s43705-022-00202-8

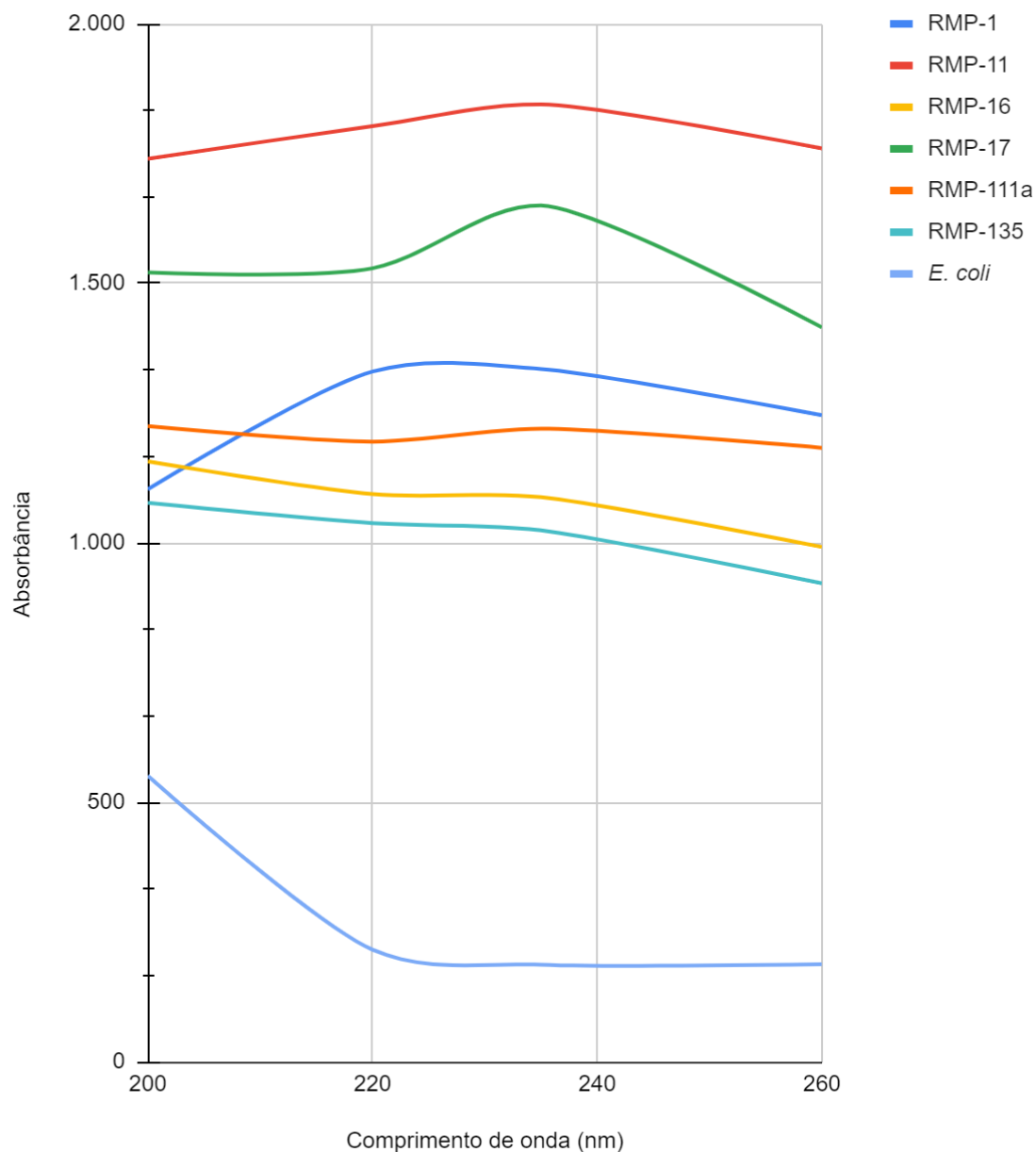
**Anexos:**

	ÁGUA	SDS	ÁGUA	SDS
	Glucose	Glicerol	Glucose	Glicerol
220	1,5	0,715	0,601	0,86
235	1,125	0,728	0,541	0,895
240	1,02	0,704	0,521	0,89
260	0,708	0,696	0,534	0,899
280	0,676	0,72	0,53	0,947

**Figura 13.** Valores de absorvância obtidos a partir da leitura dos resultados do ensaio de ácido crotônico da estirpe RMP-11<sup>T</sup>.

	ÁGUA	SDS	ÁGUA	SDS
	Glucose	Glicerol	Glucose	Glicerol
220	1,57	1,813	1,495	0,841
235	2,039	1,959	1,268	0,8
240	1,853	1,797	1,171	0,778
260	1,015	0,45	0,564	0,772
280	0,977	0,296	0,552	0,798

**Figura 14.** Valores de absorvância obtidos a partir da leitura dos resultados do Ensaio de ácido crotônico da estirpe RMP-17.



**Figura 15.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorbância entre 200 nm e 260 nm a partir da extração da biomassa das estirpes RMP-1, RMP-11<sup>T</sup>, RMP-16, RMP-17, RMP-111a e RMP-135 e de *Escherichia coli*, sendo a última utilizada como controle negativo. O meio de cultura com a biomassa crescida foi inicialmente disposto em tubos Falcon (50 mL) e centrifugados por 45 min a 4000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensionado em 45 mL de TRIS-HCl 10 mM, pH 7.5, para a lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas sob as mesmas condições, o sobrenadante majoritariamente descartado e o *pellet* foi ressuspensionado e transferido para uma caixa de Petri e incubada em estufa de laboratório (EHRET) a 100 °C por 24 horas. Com a biomassa seca, a remoção desta foi realizada a partir da dissolução através da adição de 40 mL de hipoclorito de sódio (lixívia para uso comercial entre 5% até 13%) e então incubada em estufa a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas sob as mesmas condições e o sobrenadante removido. Foram adicionados à amostra 40 mL de água destilada previamente esterilizada, a amostra foi submetida a centrifugação sob as mesmas condições e o sobrenadante descartado.

Ao *pellet*, foi adicionado uma mistura de 10 mL de acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ,  $\geq 99\%$ , MERCK) e 10 mL de etanol absoluto (Fischer Chemical), sendo este submetido à vortex até homogeneização e centrifugado. Após a remoção do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso com 10 mL de clorofórmio (Chloroform, EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur. for analysis) disposto em balão de vidro e incubado em banho-maria (a 60 °C) até a completa evaporação, sendo obtido um pó branco.

	VALORES DE ABSORBÂNCIA			
	200	220	235	260
RMP-1	1.103	1.330	1.335	1.246
RMP-11	1.740	1.803	1.845	1.760
RMP-16	1.157	1.094	1.088	992
RMP-17	1.521	1.529	1.650	1.415
RMP-111a	1.225	1.195	1.220	1.183
RMP-135	1.077	1.038	1.024	922
<i>E. coli</i>	551	216	187	188

**Figura 16.** Detecção de ácido crotônico através dos valores da absorvância entre 200 nm e 260 nm a partir da extração da biomassa das estirpes RMP-1, RMP-11<sup>T</sup>, RMP-16, RMP-17, RMP-111a e RMP-135 e de *Escherichia coli*, sendo a última utilizada como controle negativo.