



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA

JOÃO PAULO MARTINS LAUDARES

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS COM
EMPREGO DE CIANOBACTÉRIAS MARINHAS

ARRAIAL DO CABO / RJ

2023



MARINHA DO BRASIL
INSTITUTO DE ESTUDOS DO MAR ALMIRANTE PAULO MOREIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PROGRAMA ASSOCIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MARINHA

JOÃO PAULO MARTINS LAUDARES

PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS COM
EMPREGO DE CIANOBACTÉRIAS MARINHAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Marinha.

Orientador: Dr. Renato Crespo Pereira

ARRAIAL DO CABO / RJ

2023

Biblioteca do IEAPM

L367p Laudares, João Paulo Martins
 Produção biotecnológica de poliésteres biodegradáveis
 com emprego de cianobactérias marinhas / [por] João Paulo
 Martins Laudares. -- 2023.
 177 f.: il; 30 cm.

 Orientador: Renato Crespo Pereira
 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Marinha) -
 Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e
 Universidade Federal Fluminense - IEAPM/UFF, Programa
 Associado de Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha,
 Arraial do Cabo - RJ, 2023.

 1. Biopolímeros 2. Bioprospecção 3. Polímeros
 biodegradáveis 4. Polihidroxialcanoatos
 5. Polihidroxibutirato I. PEREIRA, Renato Crespo
 II. Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo
 Moreira. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
 Marinha III. Universidade Federal Fluminense IV. Título

CDD: Ed. 22 -- 660.6

JOÃO PAULO MARTINS LAUDARES

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE POLIÉSTERES BIODEGRADÁVEIS COM
EMPREGO DE CIANOBACTÉRIAS MARINHAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira e à Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Marinha.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Crespo Pereira (Presidente)

UFF – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Henrique Fragoso dos Santos

UFF – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Louisi Souza de Oliveira

IEAPM – Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira

Prof. Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira

UFF – Universidade Federal Fluminense

Profa. Dra. Sabrina Teixeira Martinez

SENAI CIMATEC

Arraial do Cabo, 8 de maio de 2023

*Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil.
E, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.*

Albert Einstein, em carta de 1951.

*Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

Poema Mar Português, Fernando Pessoa, Edições Ática: Lisboa. 1959.

Infelizmente, somos uma espécie com tendências esquizofrênicas e como uma senhora que precisa dividir sua casa com um grupo crescente e destrutivo de adolescentes, Gaia (a Terra) fica furiosa. Se não mudarem seus hábitos, ela vai expulsá-los.

James E. Lovelock, A Vingança de Gaia:
Crise Climática e o destino da Humanidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Elizabeth e Paulo Cesar, às minhas irmãs Luciana (*in memoriam*) e Mônica, à minha companheira de longa data, Néri, a meus parentes amados e a todos aqueles que de alguma forma me fizeram feliz nesta vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Renato Crespo, que confiou na minha capacidade de enfrentamento e resolução de problemas e esteve sempre disponível para me apoiar no que fosse necessário ao longo do projeto. Ainda que muitas vezes tenhamos parecido “a beira do abismo” com relação a alcançar os objetivos do projeto, sua confiança de que eu traria a solução permitiu a conclusão deste trabalho.

Gratidão à professora Dra. Maria Helena Baeta Neves, por ter aberto as portas da Sal Cisne para a obtenção de amostras, colaborado com a identificação de espécies de isolados e dado tanto suporte ao longo dos anos.

Gratidão a Dra. Elisabete Barbarino pelos ensinamentos relacionados ao cultivo e isolamento de microalgas e cianobactérias e tantos outros aprendizados nos meses em que passei em seu laboratório. Aprendizados fundamentais para a viabilização do projeto e formação acadêmica.

Gratidão ao Cmd. Dr. Márcio Lobão, pelo desenvolvimento de método e realização das primeiras análises cromatográficas para o projeto e pelas sugestões relacionadas as etapas de derivatização.

Gratidão ao Cmd. Dr. Sávio Calazans, pela abertura das portas do laboratório de genética marinha do IEAPM e pelos aprendizados relacionados a extração, qualificação e quantificação do DNA, montagem das reações de PCR e pelas orientações dadas para o tratamento de sequências provenientes do sequenciamento.

Gratidão ao Dr. Lohengrin Fernandes pelo suporte com as operações de avaliação da fluorescência dos grânulos de PHA, que remontam ao ano de 2019 quando fizemos as primeiras avaliações.

Gratidão a Dra. Carolina Guerra pelo suporte relacionado às operações microbiológicas utilizando as cepas tipo para fins de estabelecimento de controles de referência.

Gratidão ao Dr. Davyson Moreira pelo suporte que tem dado à realização das cromatografias e espectros de massa dos produtos derivatizados.

Gratidão a Dra. Daniela Bueno Sudatti pelo suporte e orientação relacionados tanto a parte de cromatografia em camada delgada quanto à cromatografia gasosa com detector FID.

Agradeço as minhas amigas de turma, Andressa de Moraes, Débora Cedro, Jade del Nero e Patrícia Merlin, pela companhia e troca de informações ao longo do

período em que estivemos próximos. Enfim, chegamos ao final da jornada, iniciada lá nos idos de 2019, cheios de sonhos e entusiasmo, antes que os movimentos tectônicos da pandemia do COVID-19 colocassem pontos de interrogação e de exclamação no meio de nossas vidas.

Gratidão especial à minha querida amiga Bruna Figueredo, pela amizade, companhia e colaboração ao longo do curso de pós-graduação, pela companhia nos finais de semana de trabalho, pela parceria nas disciplinas, pelo suporte e companhia nos laboratórios e pelos nossos treinos de natação no mar e aventuras ciclísticas. Encontrar essa amizade, foi como achar uma pepita de ouro no caminho da vida. Sua capacidade de admirar genuinamente o outro encoraja e estimula.

Agradeço aos meus muitos amigos de curso e a todos os professores e funcionários do programa de pós-graduação em biotecnologia marinha, modalidade associativa IEAPM/UFF. Não elencarei nominalmente a todos para não cometer injustiças esquecendo de alguém. Sua colaboração, seja na resolução de dificuldades pontuais, seja no aporte técnico científico de nossas conversas, fizeram deste período uma jornada profundamente enriquecedora.

Agradeço ao amigo Luciano Alves Correia (Shallan), responsável pelo laboratório de Cultivo de Microalgas, pelas conversas, suporte e ensinamentos ao longo deste período.

Agradecimentos a empresa Sal Cisne e particularmente ao gerente Marcus Pereira, que me autorizou e apoiou durante as coletas de material biológico nas salinas, bem como ao Sr. Aurênio Ribeiro, que auxiliou nas coletas de campo.

Agradeço aos amigos do laboratório de Genética, Patrícia, Nicollas e Wanessa, pelo companheirismo e pelos dias divididos com atividades e conversas que tanto contribuíram para o meu desenvolvimento científico-profissional e pessoal.

Agradeço as amigas do Laboratório de Fisiologia de Microalgas, Marcela e Luana, que sempre estiveram prontas a partilhar informações e colaborar.

Agradeço aos amigos do grupo de Plâncton do IEAPM, Thiago Matos, Janaina, Carolina, Ana Carolina, João Victor e Márcio (*in memoriam*), pelo companheirismo e pela prontidão em ajudar sempre que necessário.

Agradeço ao amigo Dr. Fábio Contrera Xavier, pelas conversas e pelos comentários a parte de introdução do meu manuscrito.

Agradecimentos aos técnicos Marcus e Dagles que me ajudaram em todos os momentos em que precisei do apoio da química.

Agradecimentos a todo o time do CCBCF-UFRJ, em especial a Dra. Polyana, que prestaram um serviço de elevado padrão, tão essencial às atividades brasileiras de pesquisa e desenvolvimento.

Agradecimentos ao Dr. Paulo Solomon pela seção de parte das cepas de microrganismos utilizados neste trabalho e a aluna Msc. Thatiana Vilalba, do laboratório, por intermediar as operações de transferência das cepas e sempre me esclarecer questões relacionadas.

Agradecimento às guarnições militares do IEAPM, que com seu esforço e dedicação sempre mantém o pronto atendimento das necessidades de civis e militares dentro da instituição.

Agradecimentos à banca examinadora desta dissertação, por aceitarem o convite para revisar este trabalho e contribuir com sugestões para os avanços científico e técnico das áreas aqui exploradas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	A IDADE DO PLÁSTICO	21
1.2	PLÁSTICOS E O MEIO AMBIENTE	24
1.3	BIOPOLÍMEROS	30
1.4	POLIHIDROXIALCANOATOS	32
1.5	PRODUÇÃO FOTOSSINTÉTICA DE POLIHIDROXIALCANOATOS	51
1.6	BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTORES DE POLIHIDROXIALCANOATOS	60
2	OBJETIVOS	64
2.1	OBJETIVO GERAL	64
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
3	HIPÓTESE	65
4	ISOLATION, IDENTIFICATION, AND UNIALGAL CULTIVATION OF CYANOBACTERIAL OF MICROBIAL MATS FROM SALT CRYSTALLIZERS FOR BIOTECHNOLOGICAL BIOPROSPECTION.	66
4.1	INTRODUCTION	67
4.2	MATERIALS AND METHODS	71
4.3	RESULTS AND DISCUSSION	80
5	BIOPROSPECTION OF MARINE AND HYPERSALINE CYANOBACTERIA FOR POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION AND BIOPOLYMER CHARACTERIZATION	89
5.1	INTRODUCTION	90
5.2	MATERIAL AND METHODS	94
5.3	RESULTS AND DISCUSSION	104
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
	REFERÊNCIAS	127
	APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	161
	ANEXO A – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS	162

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IEAPM	Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira
UFF	Universidade Federal Fluminense
PHA	Polihidroxicanoatos
PHB	Polihidroxibutirato
P3HB	Poli-3-hidroxibutirato
P4HB	Poli-4-hidroxibutirato
PHBV	Copolímero de hidroxibutirato-valerato
PHBHx	Copolímero de hidroxibutirato-hexanoato
PHO	Polihidroxiocanoato
PVP	Polivinilpirrolidona
CTAB	Brometo de cetil-trimetil amônio (do inglês, " <i>cetyl trimethylammonium bromide</i> ")
EDTA	Ácido etilenotetraaminotetraacético ("do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ")
TRIS	tris (hidroximetil aminometano)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
BMAK	Banco de microrganismos Aidar e Kuchner
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
TNO	Organização holandesa para a pesquisa científica aplicada (do holandês: " <i>Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek</i> ")
PE	Polietileno
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Cloreto de polivinila
PET	Polietileno tereftalato
UNEP	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (do inglês, " <i>United Nations Environment Programme</i> ")

OECD	Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento (do inglês: “ <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> ”)
Mt	Mega toneladas (1x10 ⁶ toneladas)
AIEA	Agência Internacional de Energia Atômica
ONU	Organização das Nações Unidas
scl-PHA	<i>Short chain length PHA</i>
mcl-PHA	<i>Medium chain length PHA</i>
lcl-PHA	<i>Long chain length PHA</i>
PHH	Polihidroxihexanoato
ISO	<i>International Standards Organization</i>
FDO	<i>Food and Drug Administration</i>
PhaA	Fasina A
PhaB	Fasina B
PhaC	Fasina C
PhaE	Fasina E
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotideo reduzida
NADP+	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotideo
GAP	Proteína associada a grão (<i>Grain associated protein</i>)
EMP	Embden–Meyerhof–Parnas (Ciclo)
pH	Potencial de hidrogênio
NPCM	Materiais Carbonáceos Não poliméricos (<i>Non-polimeric carbon materials</i>)
PHBV	Copolímero de polihidroxibutirato-co-valerato
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
DGGE	Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
LED	Diodo Emissor de Luz (<i>Light emitting diodes</i>)
CTAB	Brometo de Cetil trimetil amônio (<i>Cetil trimetil amonium bromide</i>)
PVP-8000	Polivinilpirrolidona de peso molecular 8000

Tris-HCl	Tris-hidroximetilaminometano (tris(hydroxymethyl)aminomethane)
RPM	Rotações por minuto
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
NCBI	<i>National Center for Biological Information</i>
MEGA 11	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11</i>
EPS	<i>Extracellular polysaccharides</i> (polissacarídeos extracelulares)
UV	<i>Ultraviolet</i> (abreviação para radiação ultravioleta)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i> (Coleção de culturas de microorganismos do Instituto Pasteur)
OTU	Unidade taxonômica operacional
cpcBA-IGS	Espaçador da região intergênia da ficocianina e regiões flanqueantes (<i>phycocyanin intergenic spacer and flanking regions</i>)
CG-FID	Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas
T_m	Temperatura de anelamento
TBE	Solução tamponante contendo Tris-HCl, e EDTA
DMSO	Dimetilsulfoxido
FITC	Fluoresceína tio isocianato. (Filtro de radiação luminosa otimizado para a filtragem da radiação emitida pelo corante FITC)
CCMR	Coleção de Cultura de Microrganismos da UFRJ
°Bé	Grau Baumé – Unidade de medida de densidade de salmouras

INDICE DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1: Plásticos como uma mistura de polímeros (naturais ou sintéticos) e aditivos. A extensa gama de polímeros e aditivos, com diferentes propriedades, confere a estes materiais grande flexibilidade de aplicações. 21

Figura 2: Exemplo de seção de uma molécula polimérica de polietileno, um polímero sintético derivado de hidrocarbonetos (Mano, 1999). 22

Figura 3: Molécula de etileno, monômero utilizado para a produção do polímero polietileno. Nesta figura é possível identificar o mero- (em destaque), aparecendo como unidade que se repete na macromolécula polimérica (Mano, 1999). 22

Figura 4: Os grandes volumes de plástico, descartado de maneira não controlada, associados a sua característica recalcitrante contribuem para o acúmulo destes materiais em espaços terrestres (a esquerda) e marinhos (à direita). 25

Figura 5: Fontes de microplásticos para os oceanos (Fonte: Boucher e Friot., 2017). 26

Figura 6: Biopolímeros e polímeros naturais (reproduzida de Kumaran et al., 2020). 31

Figura 7: Fotomicrografia eletrônica obtida a partir de cultivo de *Ralstonia eutropha* H16 submetida a restrição de nitrogênio. Os grânulos brancos formados no interior das células são compostos por PHA (Tian et al., 2005). 33

Figura 8: Estruturas moleculares de dois hidroxiácidos componentes de polihidroxicanoatos. 34

Figura 9: Diversidade de hidroxiácidos relacionados à construção dos blocos poliméricos de PHA. Atualmente são conhecidos mais de 150 hidroxiácidos derivados do PHA formando polímeros com grande variedade de propriedades físicas e químicas, variando desde estruturas cristalinas até elastômeros (Reproduzida a partir de Yang et al., 2013). 35

Figura 10: Representação estrutural de molécula genérica de polihidroxicanoatos com radical R. As extremidades da cadeia carbônica principal são flanqueadas por duas hidroxilas. A seção central, delimitada por colchetes, pode conter grande número de repetições, formando a molécula do polímero. Em vermelho, está destacado o grupamento éster que caracteriza os polihidroxicanoatos. 37

Figura 11: Estrutura genérica de uma molécula de PHA. O radical R pode assumir diferentes configurações, dependendo dos substratos utilizados na biossíntese. O quadro reúne alguns exemplos de PHAs em função do R (Reproduzida a partir de Koch e Forchhammer, 2021). 38

Figura 12: Processos de degradação de PHAs em ambiente marinho. A biomineralização permite a reintrodução do material ao ciclo biogeoquímico do carbono (Modificado a partir de: Suzuki et al., 2021). 41

Figura 13: Degradação de uma garrafa formada por extrusão e sopro com o emprego do polímero PHBV, um PHA composto por monômeros butirato e valerato. As garrafas apresentam o estado de degradação após 1, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (Fonte: Madison & Huisman, 1999). 43

Figura 14: Condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA pela ação da enzima tiolase PhaA. 45

Figura 15: Condensação de duas moléculas de acetoacetil-CoA em 3-hidroxi-butiril-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase PhaB. 45

Figura 16: Condensação de moléculas de 3-hidroxi-butiril-CoA em PHB pela enzima multimerica PhaE e PhaC. 45

Figura 17: Rota de biossíntese do PHB a partir de acetil-CoA (Carpine et al., 2020). Derivado da degradação de carboidratos este metabólito está relacionado a produção de PHB em *Synechocistis* sp. PCC 6803 conforme demonstrado por Koch & Forchhammer, 2020). 46

Figura 18: Estrutura do grânulo de PHB elucidada para a *Ralstonia eutropha*. Inicialmente compreendido como uma organela recoberta por fosfolípidos, foi demonstrado que a superfície do carbonossomo é recoberta integralmente por proteínas associadas ao metabolismo do PHB (Fonte: Bresan et al., 2016). 47

Figura 19: Fluxograma de processo simplificado da produção de PHAs por fermentação. Nesta representação geral do processo, a etapa de extração é realizada com emprego de solvente. Não estão representadas redundâncias de equipamentos, bombas de processo, correntes de reciclo ou instrumentação (Simplificado com base em Chen, 2015). 48

Figura 20: Unidades de produção de PHA por fermentação ao redor do mundo. 20a.) Biocycle - Brasil ; 20b.) Danimer Scientific - EUA ; 20c.) ; 20d.) BioOn – Itália. 49

Figura 21: Potencial produção de diferentes compostos de alto valor agregado e suas diversas aplicações a partir de matérias-primas simples e de origem ambiental por cianobactérias (Reproduzida a partir de: Cassieur-Chauvat et al., 2021).	51
Figura 22 Conversão de glicogênio intracelular em substrato para a produção de PHB (reproduzido de: Koch et al., 2019).	54
Figura 23: Esquema básico da produção fotossintética de polihidroxialcanoatos. No processo acima, dois estágios de cultivo são necessários para a obtenção do polímero. Apesar de existirem diferentes abordagens para o processo de extração, o emprego de solventes continua sendo a forma mais simples e comum de recuperação do polímero.	57
Figura 24: Área da Sal Cisne apresentando as áreas de salinas (reservatórios de evaporação) e unidade industrial.	61
Figura 25 Tapetes microbianos formados no fundo de tanques cristalizadores de sal.	62
Figure 26: Sampling site highlighting the location where the microbial mats were collected (source: Google Earth).	71
Figure 27: Sal Cisne® company crystallizer ponds. B. Detail of the crystallizer ponds.	72
Figure 28: Cross section of the microbial mat, sampled from the bottom of the crystallizer. The surface layer, which is orange in color, was sampled to obtain cyanobacteria isolates.	73
Figure 29: Procedures used for isolation of slow-growing cyanobacteria from microbial mats subsample. All transfers were done under inverted microscope and manual manipulation. The n variable indicates the number of passages needed for unialgal isolation.	74
Figura 30: Regions amplified by the primer pair Cya106F/781R. The pair of primers set 27F/1492R was used in this study but due to the non axenic nature of cultures the sequenced sequences present low quality. (Modified from Nubel et al, 1997).	76
Figure 31: Structure of the phylogenetic analysis applied in this work to identify the isolated cyanobacteria samples.	79
Figure 32: Culture of isolate 6 (<i>Aphanothece halophytica</i>) with 6 months of difference. A. Stationary phase. B. Declining phase.	83
Figure 33: Culture of isolate 5.	83

Figure 34: Genomic DNA from cyanobacteria isolated from microbial mats. Despite some degradation observed, the general good quality of the extracted material allowed genetic analyses. Strain 5 extracted DNA was done separately. Strain 7 is a positive control of *Spirulina subsalsa* used for quality checking purposes. (E=Reference ladder. 1 to 7 are isolates. 3.1, 3.2, 3.2, 4.1, 4.2, 6.1 e 6.2 are extraction replicas.) 84

Figure 35: Phylogenetic tree with microbial mat cyanobacteria (rRNA 16s). The clade related to the *A. halophytica* strains isolated in this study appear highlighted. The type strains ATCC 43922, PCC 7418 are *Aphanothece halophytica* strains. 86

Figure 36: Detail from figure 35. Extremely halotolerant cluster including the isolates from this study. 87

Figure 37: Workflow for bioprospection of PHA-producing marine cyanobacteria. 94

Figure 38: Sal Cisne® Solar saltern at Cabo Frio, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. The microbial mat (brown color of the crystallizers) was sampled from the bottom of crystallizer tanks (red square). The blue arrow indicates the flow of water through salt crystallization ponds. The ponds highlighted in red are the ones subjected to sampling. 95

Figure 39: Electrophoresis in 2.5 % agarose gel for separation of the PCR products using the primers phaC(3.1)F/phaC(3.1)R (Lane and Benton, 2015). The amplicon related to the BMAK 0159 strain (159), with approximately 450 bp was purified and sequenced for identification of the enzyme synthase gene. (in the picture: E = ladder 100bp; Isolates I1 to I6; SS-*Spirulina subsalsa*, 158, 159 and 162 are BMAK strains; 168, 170, 171 and 285 are CCMR strains; C are the PCR control reaction). 105

Figura 40: PhaC protein sequences used for the maximum likelihood algorithm. 105

Figura 41: Phylogenetic tree of phaC genes from multiple species. The sequences used in this comparison were retrieved from NCBI. The gene phaC from BMAK 0159 appears indicated inside the red box. 106

Figure 42: Cyanobacteria stained with Nile Red and observed under a fluorescence microscope: A. Non-induced cell exhibiting weak fluorescence distributed throughout the filament. B. After induction and with PHA granules. 107

Figure 43: Nile Red/DMSO stained cell of BMAK 0159 of control culture. Most of the cells shows a lower degree of fluorescence. 108

Figure 44: Absorbance measured from cultures of the cyanobacterium BMAK 0159 <i>Spirulina platensis</i> in Guillard F/2 medium.	110
Figure 45: General aspect of the induced cyanobacteria cultures after 35 days. Brownish colouration indicates the progression of the chlorosis process.	112
Figure 46: A. Addition of the anti-solvent (methanol) reduces the solubility of PHA in the medium, producing the formation of the dispersed precipitate; B. After centrifugation, it was possible to separate the precipitate from the supernatant and recover the extracted polymeric material.	114
Figure 47: Polymeric film formed on a glass plate after natural evaporation of the solvent.	116
Figure 48: General steps of acid-catalyzed hydrolysis and esterification (Source: Kučera et al., 2019)	117
Figure 49: Chromatograms of the transesterification reaction products. A. Control reaction B. transesterification reaction of the PHB standard.	118
Figure 50: Chromatograms of the transesterification products. A) PHB standard. B) Polymer	119
Figure 51: Chromatograms of the transesterification products of the saline sample. A) PHB standard. B) Sample	119

TABELAS

Tabela 1: Comparação entre as propriedades físico-químicas dos polímeros P3HB e Polipropileno (Fonte: Verlinden et al., 2007 e Hankermeyer e Tieerdema, 1999)	39
Tabela 2: Potencial de substituição de alguns polímeros não renováveis por similares renováveis (. Reproduzido de Brito et al., 2011).	40
Tabela 3: Empresas produtoras de PHAs por biossíntese (Fonte: Carpine et al, 2020).	50
Tabela 4: Cianobactérias produtoras de polihidroxicanoatos (Com base em Carpine et al., 2020).	52
Tabela 5: Aspectos relevantes do ponto de vista biotecnológico, para a viabilização da produção de polihidroxicanoatos (Com base em Wang et al., 2014).	59
Table 6: Cyanobacterial 16S rRNA gene sequences used for the phylogenetic analyses.	78
Table 7: Strain isolated from microbial mat. (Scale bar: 20µm)	81
Table 8: Summary of morphological and phenotypical aspects of isolates.	82
Table 9: Cyanobacterial strains chosen for the bioprospecting study.	96
Table 10: Cyanobacteria strains from the Brazilian biological collections to carry out the bioprospecting work.	96
Table 11: Primers used for molecular detection of PHA producers. The primers phaCF1/phaCF3 and phaCR1 were selected based on their capacity to amplify most of the sequences used in the design (Montenegro et al., 2017).	98
Table 12: Results of the bioprospecting for PHA-producers.	109
Table 13: Biomass after cultivation period.	111
Table 14: Results of PHA-rich biomass density obtained after induction period.	113
Table 15: Biomass after pigment removal.	113
Table 16: Biomass density after digestion of the NPCM.	114
Table 17: PHA production experiment after cultivation and induction of the BMAK 159 strain using nitrate restriction in 0.4% acetate in Guillard F/2 medium. The medium PHA productivity of the overall process is 0.9%.	115

RESUMO

Plásticos são matérias-primas essenciais à produção de bens de consumo. Fundamentais para a sociedade moderna, seu uso revolucionou praticamente todos os setores da atividade humana. No entanto, o descarte de materiais plásticos e o uso de matérias-primas não renováveis constituem um grande passivo ambiental, tornando relevante a busca por novas alternativas. Os polihidroxialcanoatos (PHA), biossintetizados por microrganismos em resposta a estresses ambientais, constituem-se em uma alternativa ambientalmente compatível para a produção industrial de biopolímeros (= plásticos) biodegradáveis. Este trabalho realizou a bioprospecção de cianobactérias, isoladas a partir de tapetes microbianos encontrados nos cristalizadores das salinas na região de Cabo Frio, Rio de Janeiro, em busca de produtores de PHA. As cepas unialgais foram identificadas morfológica e molecularmente com o emprego das regiões do gene codificador da região 16S do RNA ribossomal (rRNA), sendo classificadas no gênero *Eubhalothece*, em sua maioria, e identificadas como *Eubhalothece sp.* Visando ampliar a bioprospecção por produtores de PHA, foram também avaliadas outras 12 cepas de cianobactérias dos gêneros *Arthrospira*, *Spirulina*, *Leptolingbia*, *Synechocystis* e *Synechococcus*, obtidas junto a diferentes coleções biológicas no Brasil. A identificação dos produtores de PHA foi realizada por meio de detecção molecular e microscopia de fluorescência. A cepa da cianobactéria *Arthrospira platensis* BMAK 159, proveniente do Banco de Microrganismos Aidar e Kuchner, foi identificada como produtora de PHA quando cultivada e induzida para acumulação deste polímero com o emprego de acetato como única fonte de carbono. O polímero formado foi extraído e purificado, com produtividade global de 1% (m/m) da biomassa seca, valor típico observado para outras cepas da mesma espécie. A composição monomérica e a pureza do material foram verificadas com o uso de cromatografia gasosa, confirmando a composição de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) para o polímero induzido. O presente estudo constitui abordagem inovadora no Brasil visando a busca por polímeros ambientalmente compatíveis e de amplo uso na sociedade.

Palavras-chave: Biopolímeros; Bioprospecção; Polímeros biodegradáveis polihidroxialcanoatos; polihidroxibutirato.

ABSTRACT

Plastics are essential raw materials to produce final goods that are fundamental in modern society. Their use has revolutionized practically all sectors of human activity. However, the disposal of plastic materials and the use of non-renewable raw materials constitute a major environmental liability, making it relevant to search for new plastic alternatives. Polyhydroxyalkanoates (PHA), biosynthesized by microorganisms in response to environmental stresses, are an environmentally compatible alternative for the industrial production of biopolymers (= biodegradable plastics). This study performed the bioprospecting of cyanobacteria isolated from microbial mats found in the crystallizers of salt marshes in the Cabo Frio, Rio de Janeiro, for the search of PHA producers. The unialgal strains were morphologically and molecularly identified using the 16S rRNA regions, being mostly classified in the genus *Euhalothece* and identified as *Euhalothece sp.*. In order to expand the scope of bioprospecting, an additional set of 12 other strains of cyanobacteria belonging to the genera *Arthrospira*, *Spirulina*, *Leptolyngbya*, *Synechocystis* and *Synechococcus*, obtained from biological collections in Brazil, were evaluated. The identification of PHA producers was performed by molecular detection of PHA biosynthetic genes and fluorescence microscopy. The *Arthrospira platensis* strain BMAK 159, from a biological collection, was identified as a PHA producer when cultivated and induced to accumulate this polymer using acetate. The polymer formed was extracted and purified, and the global yield of PHA was 1% (w/w), a typical value observed for other strains of the same species. The monomeric composition and purity of the material were verified using gas chromatography, confirming the composition of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) for the induced polymer. The present study constitutes an innovative approach in Brazil aiming at the search for environmentally compatible polymers of wide use in society.

Keywords: Biopolymers; Bioprospection; Biodegradable polymers polyhydroxyalkanoates; polyhydroxybutyrate.

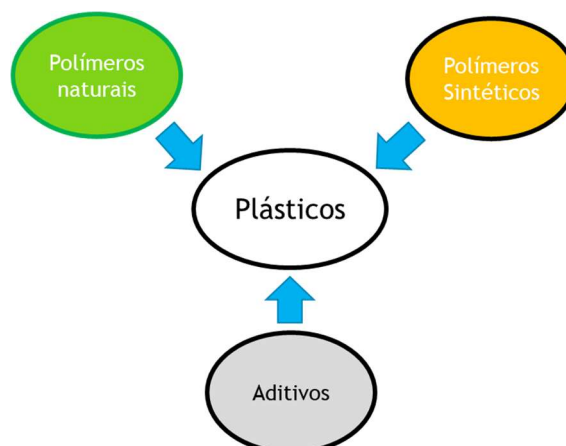
1 INTRODUÇÃO

1.1 A IDADE DO PLÁSTICO

Os plásticos são matérias-primas essenciais à fabricação de diversos tipos de produtos, tais como embalagens descartáveis, peças de veículos e materiais de construção (Millet *et al.*, 2018). Viabilizando diversos aspectos da vida moderna, estes materiais são importantes para a economia de energia nos setores de transporte e armazenamento, na higiene e na segurança de operações médicas, bem como no manuseio e na preservação de alimentos, dentre outros (Andrady *et al.*, 2009).

Formados pela mistura de polímeros e aditivos (Figura 1), como, por exemplo, cargas minerais ou orgânicas, plastificantes, retardantes de chama e biocidas (Brydson, 2016), os plásticos são utilizados em uma extensa gama de aplicações (Millet *et al.*, 2018). Desde a pasta de dentes, que contém um polímero derivado da celulose (Rahman *et al.*, 2021), passando pelas cerdas de Nylon[®] das escovas, o poliéster das roupas que vestimos, e até o tecido e o enchimento dos travesseiros, o dia a dia do ser humano moderno está cercado por materiais plásticos (Andrady *et al.*, 2009).

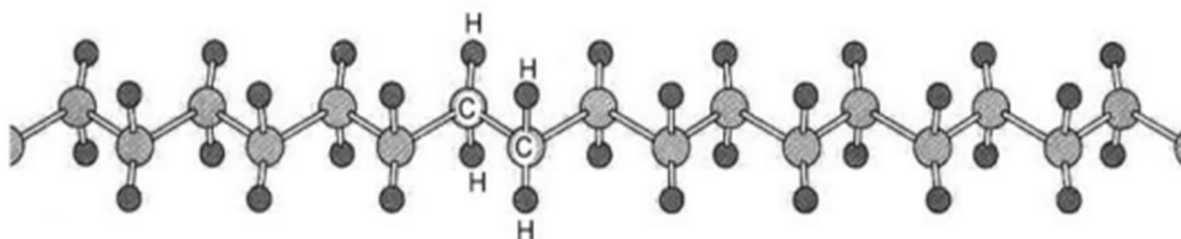
Figura 1: Plásticos como uma mistura de polímeros (naturais ou sintéticos) e aditivos. A extensa gama de polímeros e aditivos, com diferentes propriedades, confere a estes materiais grande flexibilidade de aplicações.



Matéria-prima principal para a fabricação de plásticos, os polímeros são materiais formados por macromoléculas de elevado peso molecular (Mano, 1999), compostas por monômeros que se unem através de ligações químicas covalentes (Figura 2). Estas macromoléculas conferem aos polímeros propriedades físicas e

químicas particulares, como, por exemplo, resistência mecânica, elasticidade, viscoelasticidade, além da formação de estruturas amorfas ou semi-cristalinas no material (Brydson, 2016).

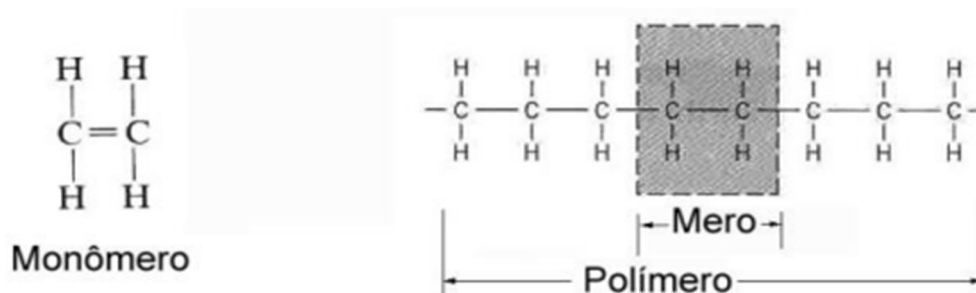
Figura 2: Exemplo de seção de uma molécula polimérica de polietileno, um polímero sintético derivado de hidrocarbonetos (Mano, 1999).



As macromoléculas poliméricas são comuns em seres vivos, tais como os ácidos nucleicos RNA e DNA, os carboidratos, como o amido e a celulose, e as proteínas, como a caseína do leite, dentre outras. Todas estas macromoléculas são exemplos clássicos de polímeros de origem natural produzidos por biossíntese (Gomez *in* do Nascimento *et al.*, 2018).

Os polímeros também podem ser produzidos, por síntese, a partir de produtos químicos derivados do gás natural, petróleo, etanol ou outras fontes. Por meio de reações químicas envolvendo reagentes denominados de monômeros, que servem de base para a formação dos polímeros, é possível produzir macromoléculas poliméricas compostas por unidades repetidas denominadas de meros - Figura 3 (Mano, 1999).

Figura 3: Molécula de etileno, monômero utilizado para a produção do polímero polietileno. Nesta figura é possível identificar o mero- (em destaque), aparecendo como unidade que se repete na macromolécula polimérica (Mano, 1999).



A sociedade moderna faz amplo uso dos materiais plásticos. Nos meios de transporte, como automóveis e aeronaves, a quantidade de plásticos empregada aumenta a cada ano. Nas construções, os plásticos estão presentes desde o momento das fundações até seu massivo uso em acabamentos, variando desde esquadrias de portas e janelas até as tintas de revestimento interno e externo (Andrady *et al.*, 2009). Na agricultura, os plásticos são necessários como embalagens de defensivos e insumos na proteção de lavouras contra geadas (filmes de *Mulch*), na impermeabilização de áreas de solo e, também, na composição de fertilizantes de liberação controlada (Amelia *et al.*, 2019 *in* Kalia, 2019).

Na medicina, os plásticos são utilizados como materiais descartáveis, ajudando na prevenção de doenças infectocontagiosas e mesmo como materiais de uso contínuo como próteses (Romeo, 2020 e North e Halden, 2013) Em equipamentos de emprego militar, os plásticos auxiliam na redução de peso e conferem características essenciais de resistência (Chen *et al.*, 2023) e mesmo fornecem capacidades de supressão de radiação eletromagnética (Ahmad *et al.*, 2019).

No cotidiano, os plásticos estão presentes nas embalagens de produtos de higiene pessoal e cosméticos, alimentos, celulares e computadores além de roupas e calçados. Ainda que atualmente façamos amplo uso de uma extensa gama de materiais, se pudermos definir a humanidade, em termos de um material principal, como foi feito para as idades da pedra, do bronze e do ferro, podemos muito bem considerar que atualmente vivemos na idade do plástico (Yarsley & Couzens, 1945).

1.2 PLÁSTICOS E O MEIO AMBIENTE

1.2.1 Plásticos na proteção ao meio ambiente

No início do século XIX, a grande popularidade do jogo de bilhar incentivou a caça às populações silvestres de elefantes. As presas de marfim destes animais eram a matéria prima para a fabricação das bolas usadas no jogo. Em 1863, foi oferecido um prêmio de 10 mil dólares ao primeiro que conseguisse desenvolver um material que substituísse o marfim. Já em 1869, foi patenteado um material plástico, produzido a partir de celulose, que se assemelhava ao marfim e sendo comercializado por um preço até 3 vezes menor que o original (Beaujot, 2012).

Um estudo de 2010, realizado pela consultoria Denkstatt, estimou que o emprego de materiais plásticos contribuiu para um saldo negativo no balanço de emissões de carbono na atmosfera, que poderia ser de 9 a 15 vezes maior caso o emprego deste tipo de material não fosse possível (Denskatt, 2010). A economia de energia em função do uso de plásticos, inclusive os descartáveis, pode ser percebida quando a demanda energética para a criação de uma simples caneca de cerâmica foi comparada com o uso de copos descartáveis. Um estudo publicado pelo TNO confirmou que, quando os gastos relacionados a lavagens são computados, são necessárias muitas centenas de reutilizações de uma caneca de cerâmica para que o gasto energético para sua produção seja equiparável ao gasto para a produção de um único copo descartável (TNO, 2007).

Outro aspecto relevante, relacionado ao uso de plásticos, é a preservação de alimentos, que influencia na demanda por novas terras agricultáveis (Read *et al.*, 2020) e, por consequência, as taxas de desmatamento (Acheampong *et al.*, 2019). A possibilidade de produzir embalagens plásticas com características de impermeabilidade frente aos gases e vapor d'água, permitiu um maior tempo de prateleira para diversos produtos comercializados, dando a oportunidade de expandir as cadeias logísticas e aumentar o tempo de prateleira, até que um determinado produto seja adquirido. Estas características relacionadas às embalagens plásticas têm como consequência a redução no desperdício de alimentos e custos, aumentando a qualidade e a segurança dos produtos e reduzindo seu preço final ao consumidor (Nilsen-Nygaard, 2021).

Todos estes benefícios relacionados ao emprego de materiais plásticos contribuem a uma grande expansão de seu consumo (Halhladakis *et al.*, 2018). Um resultado deste crescimento do volume de produção é o aumento na quantidade de materiais plásticos descartados que impactam o meio ambiente de forma negativa em função de falhas na gestão do ciclo de vida dos produtos produzidos com estes materiais (Borrelle *et al.*, 2020).

1.2.2 De herói a vilão – o impacto ambiental do uso de plásticos

Derivados em sua maior parte de matérias-primas não renováveis (Millet *et al.*, 2018), os plásticos mais utilizados atualmente, como polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloreto de polivinila (PVC) e polietilenotereftalato (PET), são de degradação limitada (Thompson *et al.*; 2009). Ainda que essa característica seja positiva quando analisamos estes materiais do ponto de vista de suas aplicações, tal aspecto acarreta a sua permanência no ambiente por longos períodos quando descartados (Figura 4). Com tempos de degradação estimados em centenas e até milhares de anos (Chamas *et al.*, 2020), o acúmulo de lixo plástico afeta os microbiomas, flora e fauna em ambientes terrestres e aquáticos, também impactando de forma negativa os serviços ecossistêmicos utilizados pela sociedade (Kumar *et al.*, 2021).

Figura 4: Os grandes volumes de plástico, descartado de maneira não controlada, associados a sua característica recalcitrante contribuem para o acúmulo destes materiais em espaços terrestres (a esquerda) e marinhos (à direita).

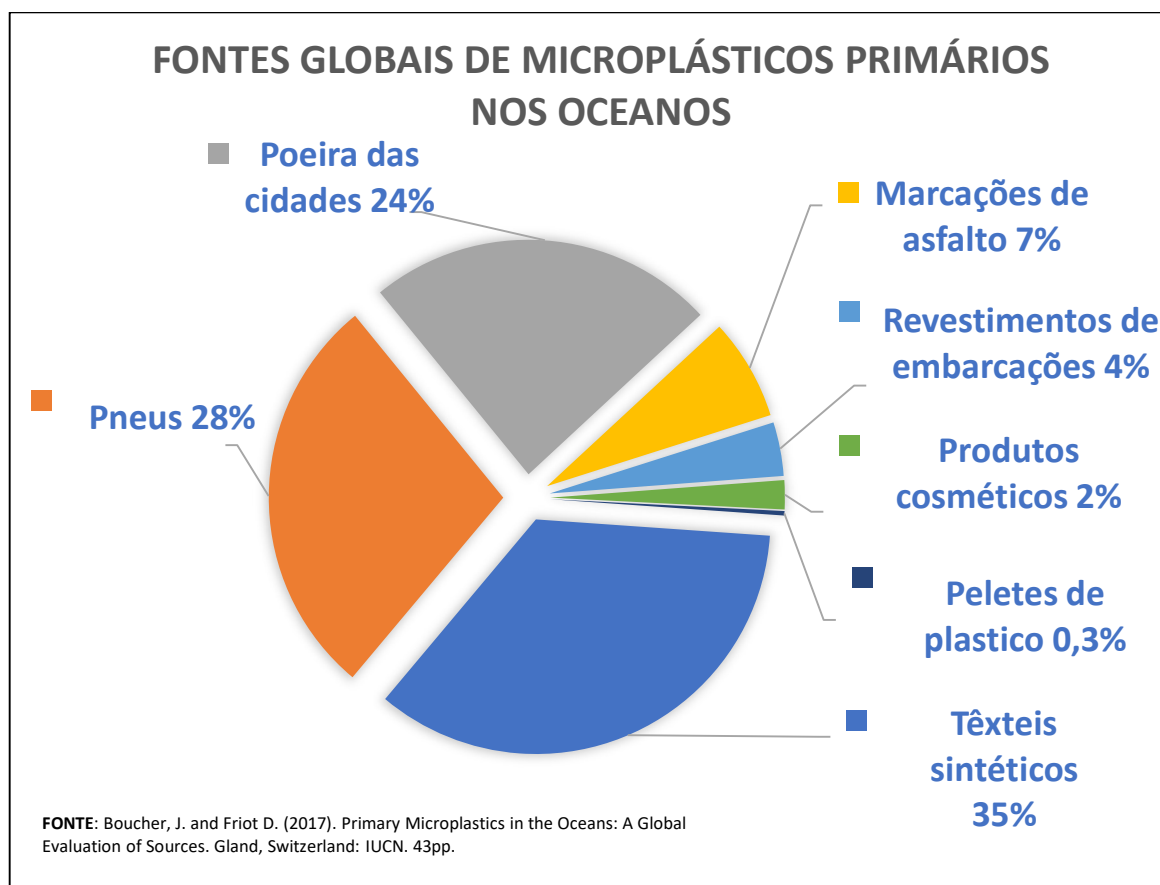


São crescentes os relatos de animais mortos e encontrados com grandes quantidades de plástico em seus tratos digestivos (Provencher *et al.*, 2017). Também são conhecidos os efeitos deletérios sobre a fauna aquática, de resíduos da indústria

pesqueira, como as denominadas “redes fantasma”, partes de redes de pesca descartadas e que vagam por rios e oceanos terminando por aprisionar grandes cetáceos, peixes e tartarugas (Azevedo-Santos *et al.*, 2021). Os animais capturados, impossibilitados de se alimentar, morrem por inanição, devido ao preenchimento de seus estômagos por plásticos, ou são por eles sufocados até a morte (Wilcox *et al.*, 2016).

Outro problema ocasionado pelos plásticos está relacionado a degradação destes materiais, por meio da exposição à radiação solar, abrasão física e variações de temperatura (Kalogerakis *et al.*, 2017). Conhecidos como microplásticos, os materiais formados por estes processos de degradação podem ser ingeridos por animais de menor dimensão, como por exemplo, o zooplâncton, sem serem degradados, passando então a fazer parte da cadeia alimentar (Miller *et al.*, 2020). A Figura 5 a seguir apresenta uma estimativa das principais fontes de microplásticos primários, aqueles que são liberados diretamente no ambiente na forma de microplásticos, que alcançam os oceanos (Boucher *et al.*, 2017).

Figura 5: Fontes de microplásticos para os oceanos (Fonte: Boucher e Friot., 2017).



Como pode ser observado na Figura 5, a maior parcela de microplásticos primários lançados nos oceanos é composta por têxteis sintéticos, microplásticos formados através da degradação de fibras têxteis de origem sintética. Estes microplásticos são produzidos em processos como, por exemplo, a lavagem de roupas, sendo carregados para o sistema de esgotos sanitários e acabam tendo por destino o oceano. Outros materiais que fazem parte do lixo plástico, e que alcançam os oceanos, terminam por produzir microplásticos após processos de degradação, os chamados microplásticos secundários, cujos volumes não são contabilizados na Figura 5 anterior, contribuindo ainda mais para o volume total de microplásticos nos oceanos.

Pesquisas recentes indicaram que o sal de cozinha, produto regularmente consumido na alimentação por seres humanos, possuía contaminação por microplásticos (Lee *et al.*, 2020). Um estudo de 2022, realizado por Leslie e colaboradores, para o estabelecimento de um protocolo de identificação de microplásticos no sangue humano, identificou a presença destes materiais em 9 das 10 amostras de sangue avaliadas (Leslie *et al.*, 2022). Os resultados encontrados por Ragusa e colaboradores demonstraram a presença de microplásticos também na placenta humana (Ragusa *et al.*, 2021).

A ingestão destes materiais e sua introdução na cadeia alimentar, somado aos aditivos utilizados para processamento dos mesmos, como, por exemplo, os ftalatos, podem produzir efeitos de disfunção hormonal (Campanale *et al.*, 2020). Constituem-se assim, em um risco à saúde humana e ao meio ambiente, ainda que seus efeitos não tenham sido completamente identificados (Rahman *et al.*, 2021).

Segundo dados da UNEP (*United Nations Environment Programme*), um total de 5,3 bilhões de toneladas de plásticos foram descartados entre 1950 e 2021 e ainda permanecem no ambiente (UNEP, 2021). Para fins de comparação, se todo este volume de plástico fosse coletado e fundido, esta quantidade de lixo equivaleria a quase 10 vezes o volume total da laguna de Araruama, a maior laguna de água salgada do mundo¹.

¹ O cálculo levou em consideração o volume estimado para a laguna de Araruama, de 690 milhões de metros cúbicos e uma densidade média para os polímeros fundidos de 1300 kg/m³.

Enquanto, atualmente, são produzidas 390 milhões de toneladas de plástico por ano, em 2060 a produção anual estimada destes materiais deverá alcançar a cifra de 1,2 bilhão de toneladas (OECD, 2021), um volume três vezes maior que a produção atual. Por consequência, seu acúmulo no ambiente e os problemas dele advindos tendem a se multiplicar caso não sejam tomadas ações no sentido de reduzir o impacto ambiental provocado pelo descarte de plásticos (OECD, 2021).

Segundo estimativas da OECD, o volume de plástico lançado no meio ambiente deve duplicar até 2060, mesmo considerando a eficácia de políticas adotadas para a redução destes descartes (OECD, 2022). Estima-se que o descarte de macrolásticos e microplásticos duplique entre 2019 e 2060, com um aumento de 19,4 Mt/ano em 2019 para 38,4 Mt/ano em 2060, enquanto a quantidade de microplásticos lançados no meio ambiente deve dobrar, chegando a 5,8 Mt em 2060.

Um levantamento recente, realizado por Ericksen e colaboradores (2023), procurou estimar a quantidade de partículas de plásticos vagando pelos oceanos do planeta. Revisando dados existentes e publicados de um total de 11.777 estações de amostragem para estimar a abundância global de partículas de plástico, o estudo foi capaz de estimar que entre 82 e 358 trilhões de partículas plásticas estão dispersas nos oceanos, com um peso total entre 1,1 e 4,9 milhões de toneladas (Ericksen *et al.*, 2023).

Outro aspecto relacionado ao uso de plásticos está associado à sua forma de produção, baseada em matérias-primas não renováveis (OECD, 2017). Fabricados a partir de petróleo e gás natural, os plásticos classificados como *commodities*, que são produzidos em grande escala, demandam um percentual significativo da produção anual destas matérias primas. Aproximadamente 14 % da produção anual de petróleo e gás natural é utilizada exclusivamente para a fabricação petroquímicos, dos quais a maioria são usados para a produção de plásticos (AIEA, 2018).

Ainda que o emprego de plásticos contribua para a redução nas emissões de carbono (Denkstat, 2010), a não sustentabilidade deste modo de produção contribui para elevar a pegada ecológica de nossa sociedade (OECD, 2017). A busca por alternativas sustentáveis do ponto de vista econômico e ambiental e que eliminem ou reduzam o problema do descarte de materiais plásticos constitui-se algo premente (ONU, 2022). Produzidos por organismos vivos, os biopolímeros surgem como uma

oportunidade de substituição de matérias primas não renováveis, captura de carbono da atmosfera e como uma solução para as questões relacionadas à degradabilidade dos plásticos (Rosenboom *et al.*, 2022).

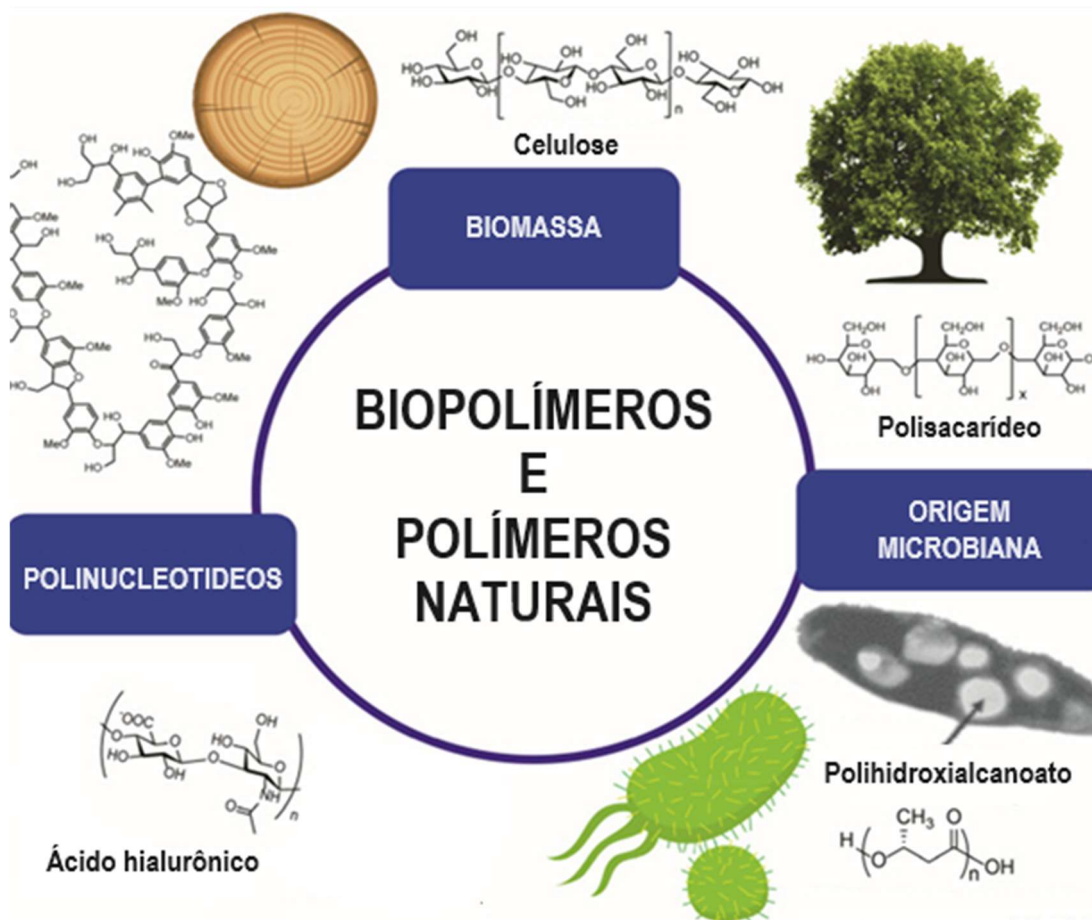
1.3 BIOPOLÍMEROS

Desde a pré-história, a humanidade busca formas de resolver problemas práticos para melhoria de suas condições de vida. Construção de abrigos, utensílios, meios de transporte e ferramentas, são exemplos de necessidades a serem atendidas para a sobrevivência dos seres humanos.

As soluções para os diversos problemas enfrentados demandam o emprego de diferentes tipos de materiais. Peles, bambus e junco eram usados para a construção de abrigos na pré-história (Stavrianos, 1991). Mástiques derivados de resina de árvores e piche, proveniente de exsudações naturais, fixavam pontas de pedra lascada a lanças e flechas (Degano *et al.*, 2019). Evidências sugerem que neandertais, há 200 mil anos, desenvolveram tecnologias para produção de adesivos utilizando resíduos da destilação seca de cascas de árvores (Kozowyk *et. al.*, 2017). A capacidade de utilizar diferentes materiais tem sido chave para a sobrevivência e o sucesso dos seres humanos na Terra (Smith, 1965) e, mais recentemente, também para as pretensões de colonização de outros planetas (Ghidini, 2018).

Dentre os inúmeros materiais utilizados pelos seres humanos para atender às suas necessidades práticas, estão os biopolímeros. Diversos materiais produzidos pelos seres vivos são compostos por macromoléculas e podem ser reconhecidos como biopolímeros (Kumaran *et al.*, 2020). Amido, celulose, quitina, quitosana, ágar, dentre outros, são polímeros naturais cujas propriedades permitiram seu aproveitamento pelo ser humano ao longo da história (Figura 6).

Figura 6: Biopolímeros e polímeros naturais (reproduzida de Kumaran *et al.*, 2020).



Dentre os biopolímeros, um em particular possui características bastante interessantes do ponto de vista das propriedades físico-químicas, quando comparado aos plásticos sintéticos (Gomez *in do Nascimento et al.*, 2017). Similares em termos de propriedades e processabilidade ao polipropileno, um dos polímeros termoplásticos mais utilizados no mundo (OECD, 2017), os polihidroxicanoatos (PHA) podem ser produzidos por biossíntese com o emprego de diferentes matérias-primas orgânicas ou inorgânicas, tornando-os uma opção de polímeros obtidos a partir de matriz renovável.

1.4 POLIHIDROXIALCANOATOS

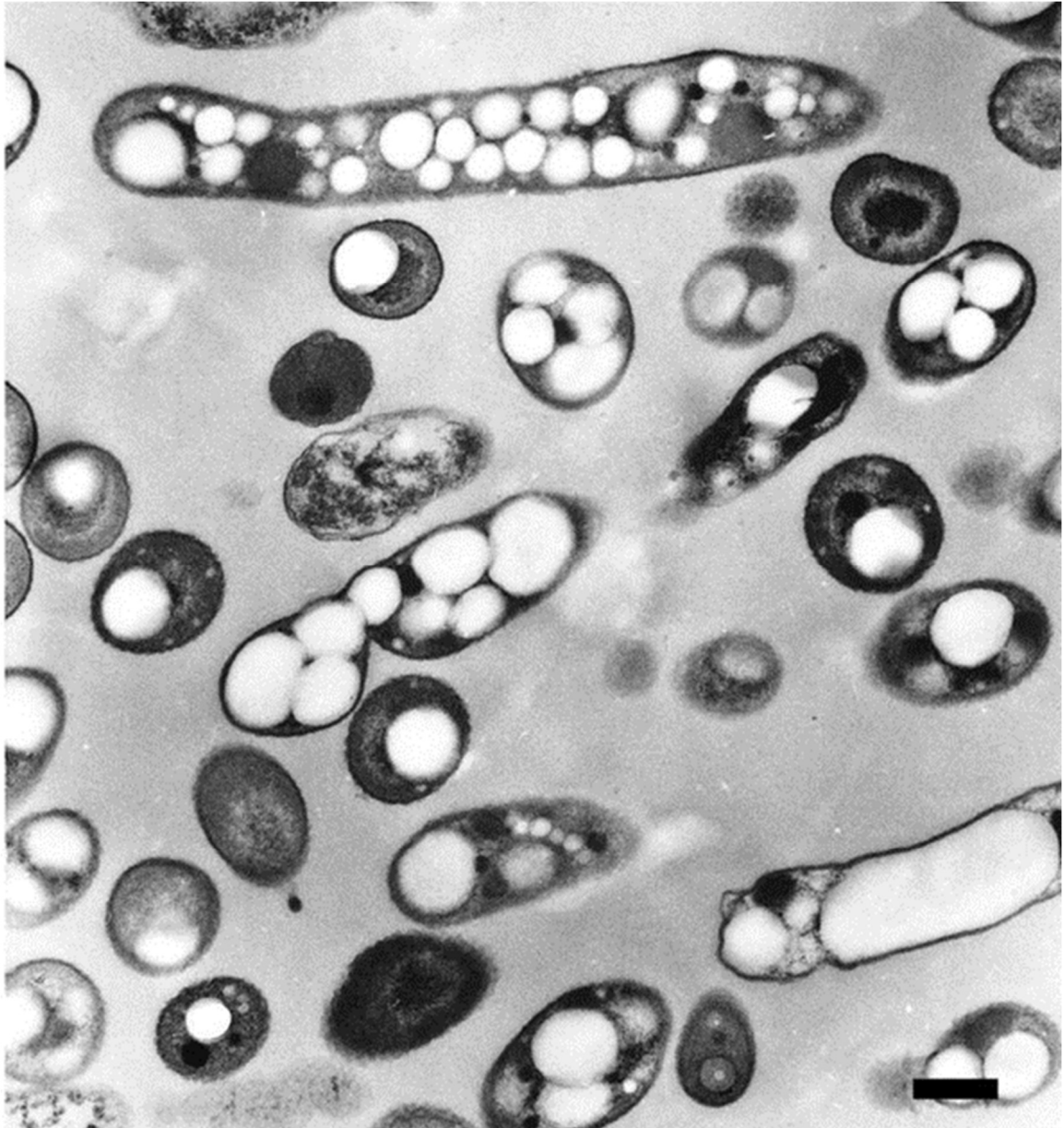
1.4.1 Biopolímeros bacterianos

Dentre os produtos da biossíntese realizada por microrganismos, os polímeros da classe dos polihidroxicanoatos (PHA) são uma oportunidade para solucionar os problemas relacionados à poluição plástica (Shabina *et al.*, 2015). Reconhecidamente biodegradáveis, tanto no meio ambiente terrestre quanto marinho (Suzuki *et al.*, 2021), estes materiais, da classe dos poliésteres, podem ser produzidos de forma renovável, através da fermentação, com o uso de matérias-primas carbonáceas, como, por exemplo, os óleos vegetais (Lopez-Cuellar *et al.*, 2011).

A produção de PHA também pode utilizar resíduos contendo carbono, na forma líquida ou gasosa, como, por exemplo, os despejos sanitários (Colombo *et al.*, 2017), industriais (De Donno Novelli *et al.*, 2021) e gases como o gás de síntese, uma mistura de hidrogênio, gás carbônico e metano, produzida a partir da gaseificação de corretes de efluentes industriais (Amstutz e Zinn in Koller, 2020). Esta flexibilidade no uso de diferentes matérias-primas permite o aproveitamento de materiais que seriam descartados no ambiente (Alexandri e Venus, 2017), utilizando o carbono em um ciclo de valorização econômica conhecido como economia circular (Rosenboon *et al.*, 2022).

Grânulos de material carbonáceo, insolúveis em água, eram observados no interior de microrganismos desde o final do século XIX (Gomez, *in* do Nascimento *et al.*, 2017). A composição química destas inclusões e, ainda, o fato de que tratavam-se de polímeros, já aparecia registrada em publicações anteriores a 1926 (Lenz & Marchessault, 2005). Na Figura 7 são destacados os grânulos de PHA acumulados em uma cepa modificada de *Ralstonia eutropha* H16 capaz de acumular até 80% de PHA em base seca (Soto *et al.*, 2019).

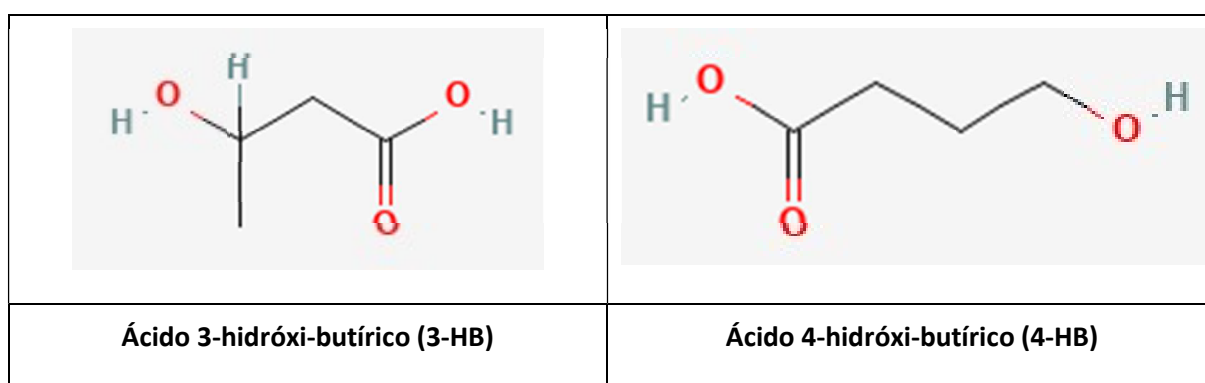
Figura 7: Fotomicrografia eletrônica obtida a partir de cultivo de *Ralstonia eutropha* H16 submetida a restrição de nitrogênio. Os grânulos brancos formados no interior das células são compostos por PHA (Tian *et al.*, 2005).



Foi somente em 1926 que Lemoigne, em seu trabalho com *Bacillus megaterium*, demonstrou que a composição química destes grânulos estava baseada em um polímero formado a partir do ácido 3-hidroxi-butírico (Lemoigne, 1926). Em 1966, Smet e colaboradores, realizando experimentos com *Pseudomonas oleovorans* em octano, observaram a formação do polihidroxi-octanoato, constituindo a primeira observação de um polímero com outro monômero que não o ácido hidroxi-butírico, originalmente identificado por Lemoigne (de Smet *et al.*, 1983).

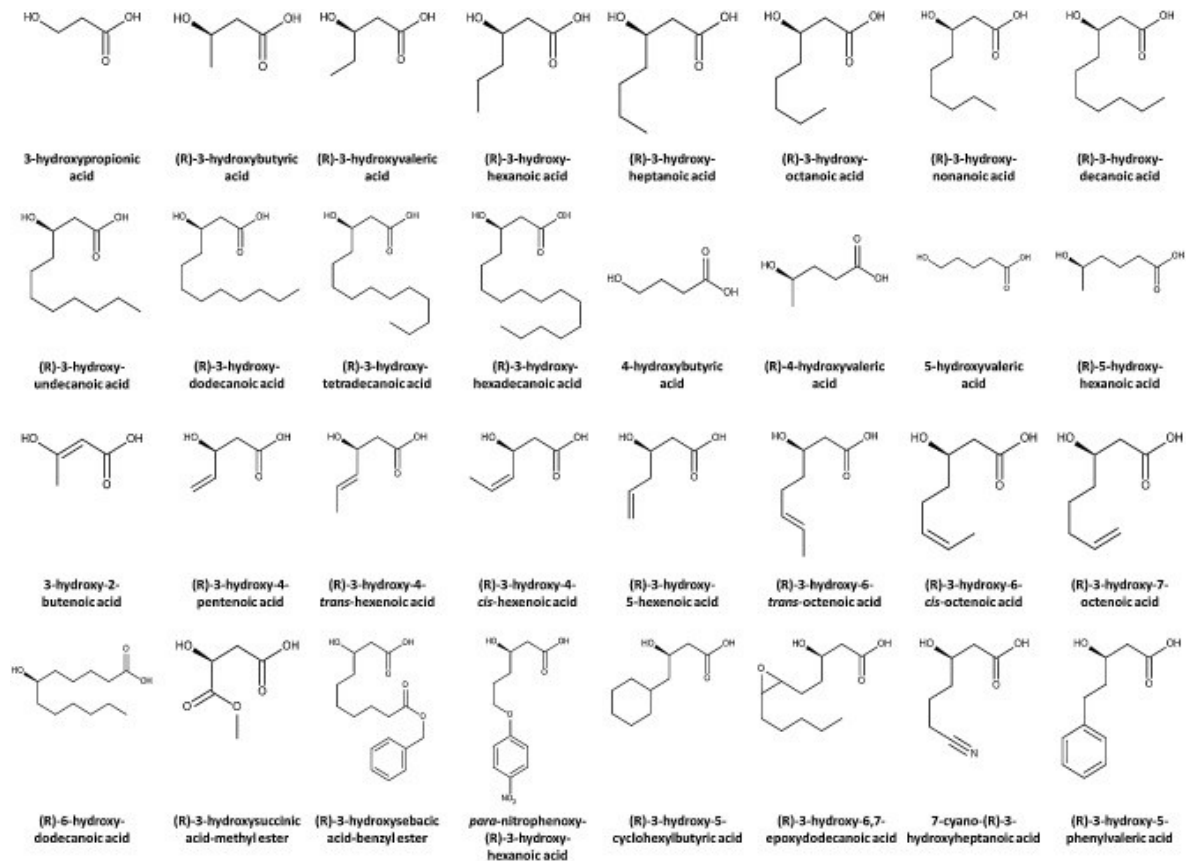
O PHA mais comumente encontrado na natureza é o polihidroxi-butirato, representado pela sigla P3HB, ou mais comumente, PHB. A numeração dada nesta sigla indica a posição da hidroxila, localizada no terceiro carbono, contado a partir do carbono do ácido carboxílico. Também é possível encontrar polímeros derivados do ácido 4-hidroxi-butírico na natureza (Utsonomia *et al.*, 2020), onde a hidroxila terminal aparece no quarto carbono contado a partir do carbono do ácido hidroxílico. A Figura 8 apresenta as estruturas moleculares dos hidroxiácidos relacionados com o P3HB e P4HB, para fins de clarificação.

Figura 8: Estruturas moleculares de dois hidroxiácidos componentes de polihidroxi-alcanoatos.



Steinbuchel e Valentin, em 1995, compilaram uma grande diversidade de PHAs formados por monômeros distintos que não o ácido hidroxibutírico (Steinbuchel e Valentin, 1995). Atualmente, são conhecidos mais de 150 hidroxiácidos distintos, componentes de PHA de origem em microrganismos, dentre os quais se observam derivados insaturados, radicais fenila e inclusive halogenados (Figura 9). A grande maioria dos PHAs com monômeros diferenciados foi identificada em microrganismos cultivados com o emprego de fontes específicas de carbono (Steinbuchel e Valentin, 1995).

Figura 9: Diversidade de hidroxiácidos relacionados à construção dos blocos poliméricos de PHA. Atualmente são conhecidos mais de 150 hidroxiácidos derivados do PHA formando polímeros com grande variedade de propriedades físicas e químicas, variando desde estruturas cristalinas até elastômeros (Reproduzida a partir de Yang *et al.*, 2013).



Os PHA são biossintetizados por diversos organismos quando submetidos a estresse ambiental, como, por exemplo, restrições nutricionais. São acumulados no interior das células e utilizados como reserva de energia e carbono para manutenção do crescimento em períodos de restrição deste elemento. Diversos organismos participantes dos 3 domínios *Archaea*, *Bacteria* e *Eukaria* foram identificados como produtores de PHA (Koch & Forchhammer, 2021). Atualmente, mais de 40 gêneros de bactérias e cianobactérias são reconhecidamente produtores de PHA (Kalia *et al.*, 2007).

1.4.2 Papel fisiológico do PHA em microrganismos

Como visto, os grânulos de PHAs são entendidos como reservas de carbono e energia, acumulados pelas bactérias para uso em momentos de escassez (Anderson & Dawes, 1990). Quando os microrganismos são cultivados sob condições de alta

disponibilidade de carbono, como, por exemplo, em meios de cultura ricos em glicose ou outros açúcares, os organismos que forem capazes de produzir PHAs os acumularão na forma de grânulos insolúveis em água (Segal & Gupta, 2020). Com a depleção dos estoques de açúcares ou outros materiais carbonáceos no meio de cultura, os microrganismos passam a degradar os grânulos de PHA para liberar o carbono e a energia armazenados nos mesmos (Anderson & Dawes, 1990). Isso permite com que os microrganismos sobrevivam e continuem a crescer mesmo quando as fontes externas de carbono são limitadas, constituindo-se em um mecanismo chave para sua sobrevivência (Saharan *et al.*, 2014).

A produção de PHAs também pode auxiliar as bactérias a sobreviver sob outros estressores ambientais, como, por exemplo, o congelamento e o descongelamento (Mravec *et al.*, 2016), alta pressão osmótica, pressão oxidativa, presença de metais pesados e exposição ao ultravioleta (Obruca *et al.*, 2020).

Para as cianobactérias, nenhum papel fisiológico relevante relacionado ao metabolismo do PHA foi descoberto até o momento (Koch & Fochhamer, 2021). Estes organismos apresentam diferentes compostos usados como reserva de nitrogênio e carbono, como a cianoficina e o glicogênio, que têm relação clara como mecanismos de reserva de carbono (Doello *et al.*, 2018; Watzer & Forchhammer, 2018).

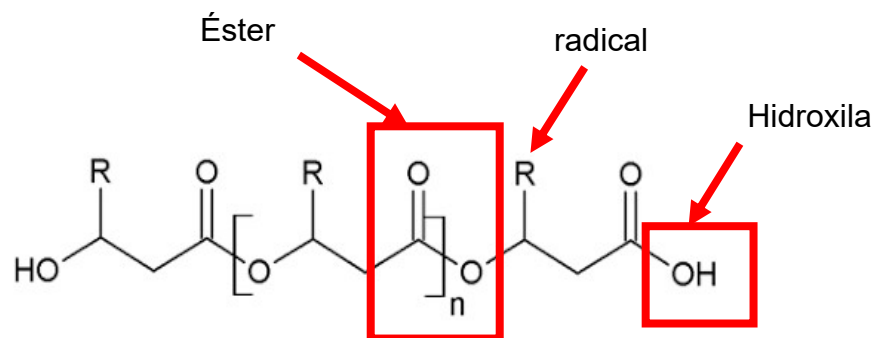
Pesquisas realizadas até o momento não foram capazes de demonstrar a relevância do PHB como composto para armazenagem de energia e carbono em cianobactérias (Klotz *et al.*, 2016; Doello *et al.*, 2018), posto que este papel é bem definido para o glicogênio (Beck *et al.*, 2012). Uma hipótese é de que ambos os compostos, PHB e glicogênio, compõem a armazenagem de carbono da célula, sendo o glicogênio uma armazenagem de uso rápido e o PHB uma armazenagem de uso prolongado (Klotz *et al.*, 2016). Outra possibilidade é de que o PHA atue para controle do estado de oxi-redução do ambiente citoplasmático protegendo a célula de danos em função da falta de doadores ou aceptores de elétrons (Schlebusch & Forchhammer, 2021; Hauf *et al.*, 2013).

1.4.3 Características químicas e físicas dos PHAs

Macromoléculas compostas de cadeias de carbono apresentando o oxigênio como heteroátomo, os PHAs são classificados como poliésteres por conterem um

grupamento éster na cadeia principal (Surendran *et al.*, 2020). Estes polímeros possuem também uma estrutura radicalar que pode ser composta por diferentes grupamentos químicos, além de um grupamento hidroxila localizado nas extremidades da molécula (Yang *et al.*, 2013). A Figura 10 apresenta uma fórmula estrutural genérica de uma molécula de PHA com a indicação dos grupamentos éster e hidroxila, bem como do radical que se repete ao longo da molécula do polímero.

Figura 10: Representação estrutural de molécula genérica de polihidroxicanoatos com radical R. As extremidades da cadeia carbônica principal são flanqueadas por duas hidroxilas. A seção central, delimitada por colchetes, pode conter grande número de repetições, formando a molécula do polímero. Em vermelho, está destacado o grupamento éster que caracteriza os polihidroxicanoatos.



O radical associado à cadeia carbônica dos PHAs pode ser composto por diferentes estruturas, como visto anteriormente (Steinbuchel & Valentin, 1995). O PHA mais comumente encontrado na natureza possui o radical metila (CH_3) e é conhecido como PHB, sigla para polihidroxibutirato, ou poli-3-hidroxibutirato (P3HB).

Outro aspecto relevante é o fato de que, devido a estereoespecificidade da biossíntese enzimática, as unidades monoméricas destes polímeros estão sempre na configuração dextrógira (D-), apresentando carbonos quirais. A presença de centros quirais nestes polímeros é relevante para o emprego de derivados dos PHAs como precursores e intermediários para a síntese de muitos compostos da química fina, como antimicrobianos, vitaminas, compostos aromáticos e feromônios (Ren *et al.*, 2005).

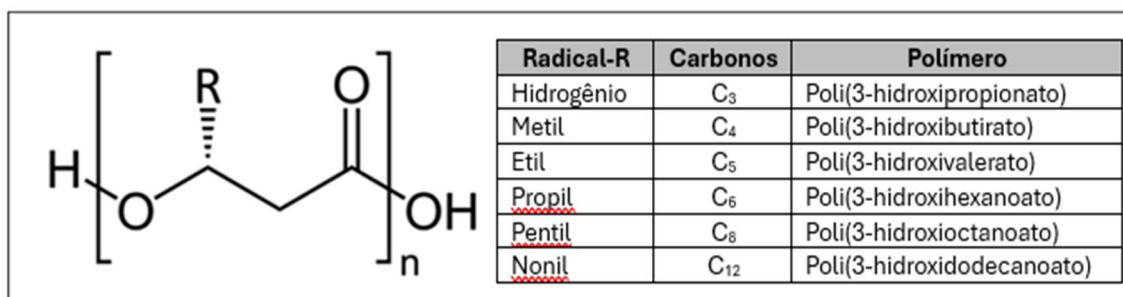
Buscando classificar os PHAs com relação à sua estrutura, definiu-se que aqueles com 3 a 5 carbonos na cadeia principal dão origem aos conhecidos *short chain length*

PHA (*scl*-PHA), ou PHAs de cadeia lateral curta. Nesta classe, encontramos o polihidroxibutirato (PHB) e o polihidroxivalerato (PHV), bem como seus copolímeros (PHBV) que apresentam uma composição monomérica variável (Anderson e Dawes, 1990).

Os PHAs com cadeias contendo entre 5 e 16 carbonos originam os conhecidos *medium chain length* (*mcl*-PHA) ou PHAs de cadeia lateral média. Exemplos importantes destes PHAs são os polímeros polihidroxihexanoato e polihidroxioctanoato (PHH e PHO respectivamente), respectivamente, cujas características são importantes para aplicações tecnológicas uma vez que apresentam melhores propriedades mecânicas em relação aos *scl*-PHA (Reedy *et al.*; 2022). Polímeros com mais de 16 carbonos na cadeia principal são denominados de *lcl*-PHA (*long chain length* – PHA), sendo produzidos por bactérias como *Aureispira marina* e *Shewanella oneidensis*.(Seghal e Gupta, 2020).

A diferenciação quanto ao tamanho da cadeia lateral é relevante quando se observam as propriedades físico-químicas destes materiais e as possibilidades de detecção de polímeros dos dois grupos. A Figura 11 apresenta uma estrutura típica para o P3HA com a indicação de diferentes radicais classificados como *scl*-PHA ou *mcl*-PHA.

Figura 11: Estrutura genérica de uma molécula de PHA. O radical R pode assumir diferentes configurações, dependendo dos substratos utilizados na biossíntese. O quadro reúne alguns exemplos de PHAs em função do R (Reproduzida a partir de Koch e Forchhammer, 2021).



De forma geral, a estrutura química dos PHAs formados por biossíntese microbiana depende dos substratos disponíveis (Brandl *et al.*, 1988; Lageveen *et al.*, 1988; Huisman *et al.*, 1989). Entretanto, dependendo da rota biosintética, os polihidroxialcanoatos de cadeia curta podem ser formados diretamente a partir da

decomposição de carboidratos, sendo sua composição independente das características dos substratos (Koch e Forchhammer, 2021).

O comprimento do radical impacta de maneira significativa as propriedades físicas do polímero resultante. Enquanto a cristalinidade do P3HB é elevada, resultando em um material duro e quebradiço, os polihidroxicanoatos de cadeia média possuem menor cristalinidade e maior capacidade de deformação, propiciando que sejam empregados em uma maior faixa de aplicações (Reddy *et al.*, 2022).

O polihidroxibutirato, P3HB, polímero mais amplamente encontrado na natureza, possui ponto de fusão de 175 °C e uma temperatura de transição vítrea de 4 °C. Esta temperatura é relevante uma vez que é a partir dela que as propriedades plásticas de estiramento e flexibilidade são percebidas. Este polímero também tem uma densidade de 1,25 g/cm³, mais elevada do que as conhecidas poliolefinas derivadas dos hidrocarbonetos. A título de comparação, a Tabela 1 a seguir compara as propriedades do P3HB com as propriedades do polipropileno (PP).

PROPRIEDADE	Unidade	PHB	PP
Ponto de fusão	°C	175	176
Cristalinidade	%	80	70
Peso molecular	Daltons	5	10
Temperatura de transição vítrea	°C	4	-10
Densidade	g/cm ³	1,25	0,9
Módulo de flexão	Gpa	4	1,7
Resistência a tração	Mpa	40	38
Extensão até quebra	%	6	400
Resistência ao ultravioleta	-	Boa	Ruim
Resistência a solventes	-	Ruim	Boa

Tabela 1: Comparação entre as propriedades físico-químicas dos polímeros P3HB e Polipropileno (Fonte: Verlinden *et al.*, 2007 e Hankermeyer e Tieerdema, 1999)

A similaridade de propriedades torna o P3HB um potencial substituto para o polipropileno, um polímero largamente utilizado. A Tabela 2 expressa o potencial de

substituição de alguns polímeros derivados do petróleo por polímeros renováveis (Gomez, *in* do Nascimento *et al.*, 2017).

Polímero	PVC	PEAD	PEBD	PP	PS	PMMA	PA	PET	PC
Amido	-	+	+	+	+	-	-	-	-
PLA	-	+	-	+	+	-	+	+	-
PHB	-	+	-	++	+	-	-	-	-
PHBHx	+	++	++	++	+	-	-	+	-

++ substituição completa; + substituição parcial; - não substitui.

Tabela 2: Potencial de substituição de alguns polímeros não renováveis por similares renováveis (PVC: Cloreto de Polivinila, PEAD: Polietileno de alta densidade, PEBD: Polietileno de baixa densidade, PP: Polipropileno, PS: Poliestireno, PMMA: Polimetilmetacrilato, PA: Poliacrilato, PET: Polietileno tereftalato, PC: Policarbonato. Reproduzido de Brito *et al.*, 2011).

1.4.4 Biocompatibilidade e biodegradabilidade

Um aspecto relevante para a aplicação dos PHAs é a sua característica de biocompatibilidade (Zhao *et al.*, 2003). Um material é considerado biocompatível se não produzir reação nociva ou adversa quando em contato com tecidos vivos (Williams, 2008). Para que um material seja considerado biocompatível, ele deve atender a alguns critérios estabelecidos pela ISO, de forma a exibir uma resposta biológica apropriada como não exibir toxicidade, imunogeneidade, carcinogenicidade, ou apirogenicidade, possuir estabilidade química e física, hemocompatibilidade e fácil degradabilidade (ISO 10993-1:2018).

Além disso, as propriedades e a estrutura da superfície do material também desempenham um papel importante em sua biocompatibilidade. A superfície deve ser lisa e não inflamatória e o material não deve promover crescimento bacteriano ou infecção (Wang *et al.*, 2004). Vale ressaltar que o teste de biocompatibilidade é um processo complexo e multidisciplinar, que geralmente envolve testes biológicos e físicos, além de testes clínicos (ISO 10993-1:2018).

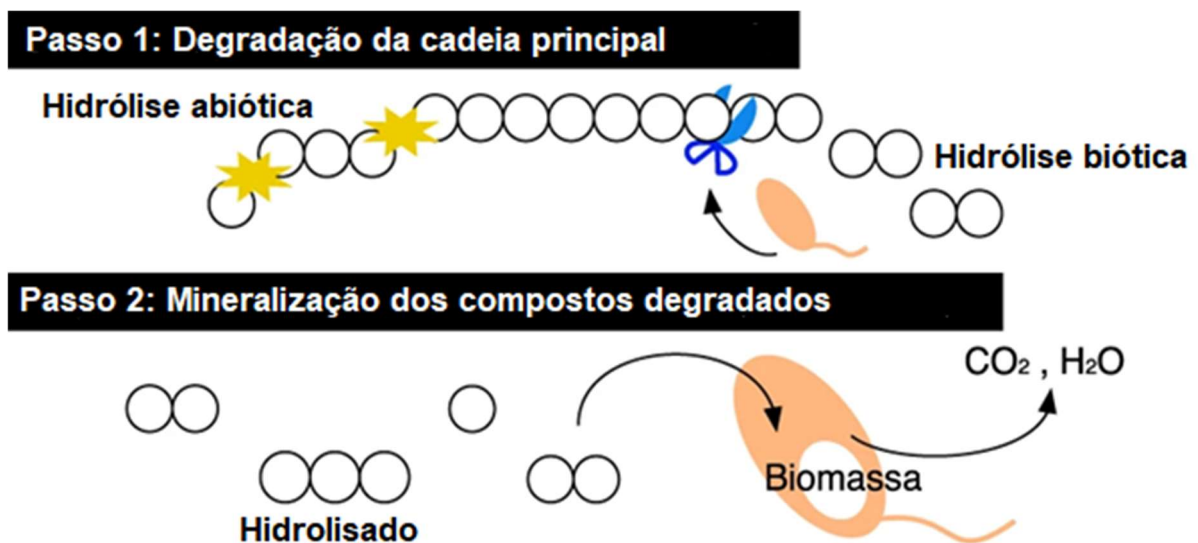
Em termos de biocompatibilidade, verificou-se que os PHAs têm baixa toxicidade e não são imunogênicos (Gadgil *et al.*, 2017). Em 2007, a Organização Americana para Alimentos e Fármacos (do inglês, FDA) aprovou o uso do P4HB para uso em suturas. Em virtude desta aprovação, os PHAs têm sido usados em uma ampla gama de aplicações biomédicas, inclusive como materiais de implante, sistemas de administração de medicamentos (*delivery systems*) e estruturas para cultivo celular

(*scaffolds*) aplicados na engenharia de tecidos (Akaraonye *et al.*, 2010; Hazer *et al.*; 2007). Eles também estão sendo pesquisados como um material potencial para uso em diversos dispositivos médicos, como *stents* para reforço venoso e como material para impressão 3D de implantes médicos (Koller, 2018).

Uma vez liberados no ambiente por conta de ruptura celular, os grânulos de PHAs são expostos a muitos microrganismos capazes de realizar a degradação e o aproveitamento destes polímeros. Microrganismos produtores de enzimas extracelulares degradadoras de PHA podem ser encontrados em ambientes terrestres e marinhos, o que significa que este tipo de plástico pode ser metabolizado e mineralizado em um amplo conjunto de condições (Suzuki *et al.*, 2021; Volova *et al.*, 2015).

O processo de biodegradação dos PHAs ocorre em duas etapas (Suzuki *et al.*, 2021), como ilustrado na Figura 12, em um primeiro passo, o material é fragmentado por processos de hidrólise abiótica e biótica até o ponto em que moléculas do polímero estejam disponíveis no ambiente para serem absorvidas por microrganismos. Na segunda etapa, o material é mineralizado pelos microrganismos através de seu catabolismo, dando origem a dióxido de carbono, metano e água, dependendo das condições de biodegradação (Suzuki *et al.*, 2021).

Figura 12: Processos de degradação de PHAs em ambiente marinho. A biomineralização permite a reintrodução do material ao ciclo biogeoquímico do carbono (Modificado a partir de: Suzuki *et al.*, 2021).



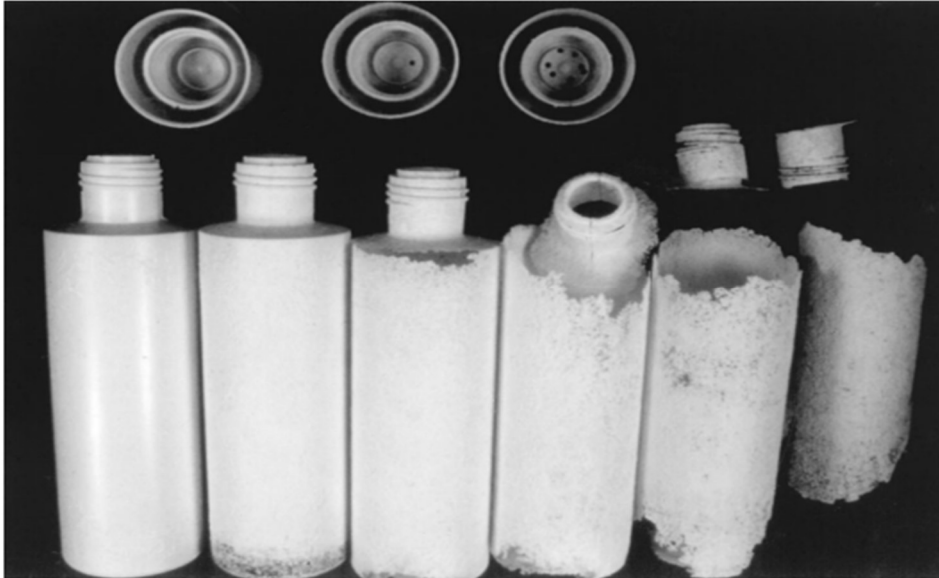
Os tempos de degradação de polímeros não biodegradáveis dependem de processos físico-químicos relacionados à interação destes materiais com o ambiente. Processos físicos como a quebra, o endurecimento e o esfarelamento, e químicos como quebra de ligações, hidrólise ou oxidação são responsáveis pela degradação destes plásticos (Chamas *et al.*, 2020). Ainda que haja bastante variação entre as taxas de degradação esperadas para os diferentes polímeros, fibras e microesferas têm tempos de degradação previstos na faixa de 400 a 1.200 anos, considerando, por exemplo, o polietileno de alta densidade (Chamas *et al.*, 2020).

Enquanto itens fabricados com poliestireno têm meia-vida estimada em mais de 2.500 anos, recipientes para armazenamento de comida feitos com polipropileno, um material que pode ser substituído por PHAs, apresentam meia-vida de 53 anos em meio marinho ou 780 anos quando dispostos na terra (Chamas *et al.*, 2020). Sacolas plásticas produzidas com polipropileno têm meia-vida de 3,4 anos quando lançadas em meio marinho (Chamas *et al.*, 2020). Na medida em que a meia vida representa o tempo para que 50 % da massa do material seja degradada, os tempos para a degradação de uma sacola plástica no mar podem alcançar dezenas de anos.

Com base em uma meta-análise, foi identificada uma taxa média de degradação de PHA variando de 0,04 a 0,09 mg/dia*cm² em ambiente marinho (Dilkes-Hoffman *et al.*, 2019). Usando as taxas obtidas, estes autores estimaram os tempos de degradação de alguns itens comuns. Uma garrafa de PHA, por exemplo, apresenta um tempo de vida na faixa de 1,5 a 3,5 anos, enquanto um filme fino (como os utilizados para a fabricação de sacolas) tem um tempo de degradação estimado na faixa de 0,1 a 0,2 ano.

Tempos de degradação muito inferiores aos observados no ambiente marinho são obtidos quando o ambiente é propício à degradação, como no interior de unidades de tratamento de esgoto. Um trabalho realizado na universidade Georg-August, em Gottingen, na Alemanha, onde garrafas de PHA foram expostas ao ambiente de tratamento, apresentaram extenso nível de degradação já na décima semana após o início da exposição (Figura 13 - Madison & Huisman, 1999).

Figura 13: Degradação de uma garrafa formada por extrusão e sopro com o emprego do polímero PHBV, um PHA composto por monômeros butirato e valerato. As garrafas apresentam o estado de degradação após 1, 2, 4, 6, 8 e 10 semanas (Fonte: Madison & Huisman, 1999).



1.4.5 Aplicações dos PHAs

Como materiais de engenharia, os polímeros da classe dos PHAs encontram aplicações nos mais diferentes campos de atividade. A variedade de monômeros possíveis, as possibilidades de copolimerização e funcionalização para mudança de propriedades, bem como as facilidades relacionadas ao processamento dos polímeros, permitem uma ampla gama de aplicações tecnológicas. A seguir listamos as aplicações mais relevantes desta classe de polímeros por área de uso:

- **Embalagens:** podem ser usados para criar uma ampla gama de materiais de embalagem, tais como garrafas, filmes, sacolas e recipientes que são biodegradáveis e compostáveis (Tripathi *et al.*, 2020; Schwier & Krishnaswamy, 2010).
- **Aplicações biomédicas:** têm sido usados em uma ampla gama de aplicações biomédicas, tais como sistemas de administração de medicamentos (*delivery systems*), materiais para implantes e fabricação de próteses, fios de sutura, *stents* e *scaffolds* para engenharia de tecidos (Ray e Khalia, 2017; Elmowafy *et al.*, 2029; Gregory *et al.*, 2022; Pulingam *et al.*, 2022).

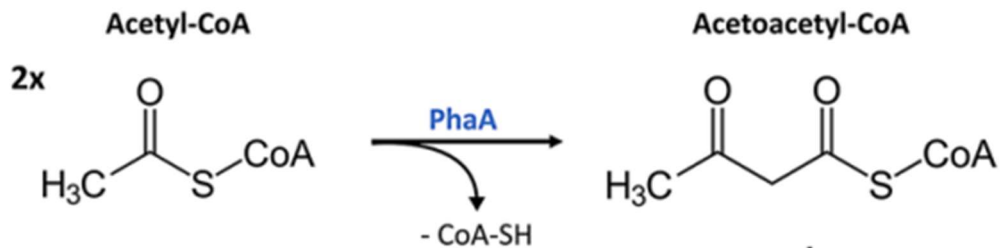
- **Agricultura e pesca:** podem ser usados para criar películas biodegradáveis para a agricultura, como filmes de mulching para cobertura de lavouras (proteção contra geadas), sistemas de impermeabilização de solo e sementeiras que ajudam a reduzir o uso de plásticos não biodegradáveis (Amelia *et al.*, 2019 *in* Kalia, 2019). Além disso, já foram utilizados para desenvolvimento painéis para escape de organismos que venham a ser indevidamente capturados em armadilhas para crustáceos (Bilkovic *et al.*, 2012).
- **Filmes finos, adesivos e revestimentos biodegradáveis:** Alguns tipos podem ser usados como revestimento ou filme em uma variedade de aplicações em que plásticos tradicionais são usados, como embalagens de alimentos, dispositivos médicos e aplicações agrícolas (Lauzier *et al.*, 1993; Vahabi *et al.*, 2019).
- **Impressão 3D:** também estão sendo pesquisados como um material potencial para uso na impressão 3D de implantes médicos e outros produtos (Mehrpuoya *et al.*, 2021).

1.4.6 Biossíntese dos PHAs

Dependendo do microrganismo em questão, foram identificadas diferentes rotas biossintéticas para produção e acúmulo de grânulos de PHA (Koch & Forchhammer, 2021). Tais rotas dependem essencialmente das vias de degradação de carboidratos para a produção do substrato acetil-coenzima-A (Koch & Forchhammer, 2021). Enquanto em bactérias são observadas rotas relacionadas à síntese *de novo* e beta-oxidação de ácidos graxos, em cianobactérias a rota predominante envolve o uso direto de moléculas de acetil-coenzima-A em uma sequência de reações enzimáticas que termina com a formação dos grânulos de PHA no interior do citoplasma (Koch & Forchhammer, 2021).

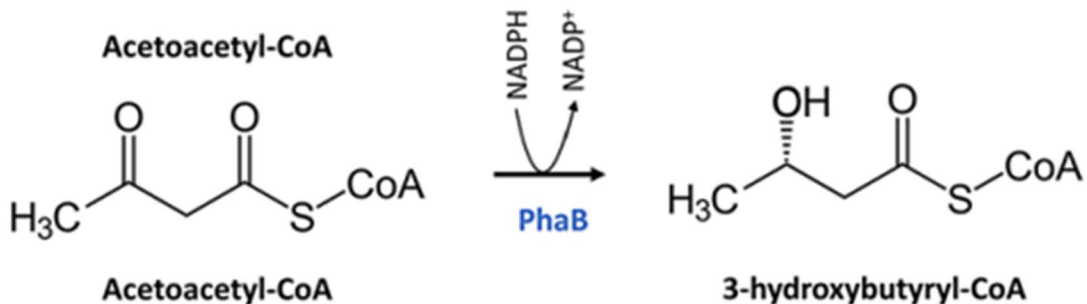
A biossíntese do PHB em cianobactérias, um dos PHAs que apresenta a sua rota metabólica melhor compreendida, começa com a formação de um dímero de acetil-coenzima-A no interior do citoplasma. Catalisadas pela tiolase, acetil coenzima A transferase, também conhecida como PhaA, as duas moléculas condensam-se para formar uma molécula de acetoacetil-coenzima A (Figura 14 - Koch & Forchhammer, 2021)

Figura 14: Condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA pela ação da enzima tiolase PhaA.



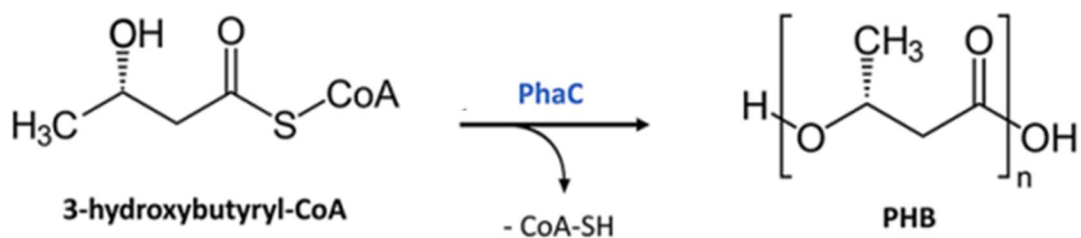
Dispersas no citoplasma, as moléculas de acetoacetil-coenzima A são reduzidas por outra enzima, a acetoacetil-coenzima A redutase (PhaB), dando origem a moléculas de 3-hidroxiacetil-coenzima A, com a consequente oxidação de uma molécula de NADPH a NADP⁺ (Koch & Forchhammer, 2021). A Figura 15 apresenta esta etapa de biossíntese.

Figura 15: Condensação de duas moléculas de acetoacetil-CoA em 3-hidroxiacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase PhaB.



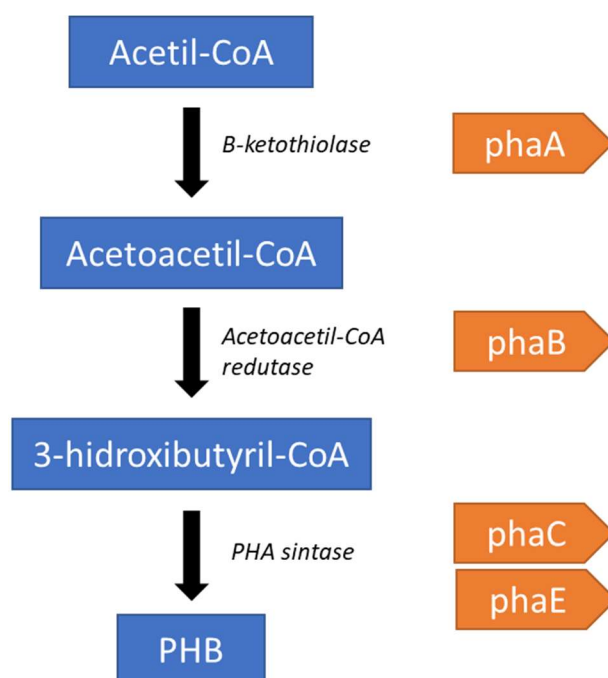
No caso de cianobactérias, uma enzima composta por dois diferentes dímeros, PhaE e PhaC, classificada como uma sintase de classe III (Hein *et al.*, 1998), conecta a molécula de 3-hidroxiacetil-coenzima A à uma molécula polimérica de PHB, dando origem a formação do grânulo do polímero (Figura 16 - Koch & Forchhammer, 2021)

Figura 16: Condensação de moléculas de 3-hidroxiacetil-CoA em PHB pela enzima multimerica PhaE e PhaC.



As enzimas que catalisam as reações de biossíntese de PHB no interior de microrganismos não foram identificadas até 1973, quando Schlegel e Dawes, trabalhando de maneira independente, conseguiram isolar e caracterizar tais enzimas (Volker e Schlegel e Senior e Dawes, 1973). A Figura 17 apresenta o conjunto de reações relacionadas com a biossíntese do PHB e os respectivos genes e enzimas envolvidas com a biossíntese (Carpine *et al.*, 2020). A enzima PHA sintase ilustrada corresponde a uma enzima sintase de classe III, formada como dímero das unidades PhaC e PhaE, característica de cianobactérias (Hai *et al.*, 2001).

Figura 17: Rota de biossíntese do PHB a partir de acetil-CoA (Carpine *et al.*, 2020). Derivado da degradação de carboidratos este metabólito está relacionado a produção de PHB em *Synechocistis* sp. PCC 6803 conforme demonstrado por Koch & Forchhammer, 2020).



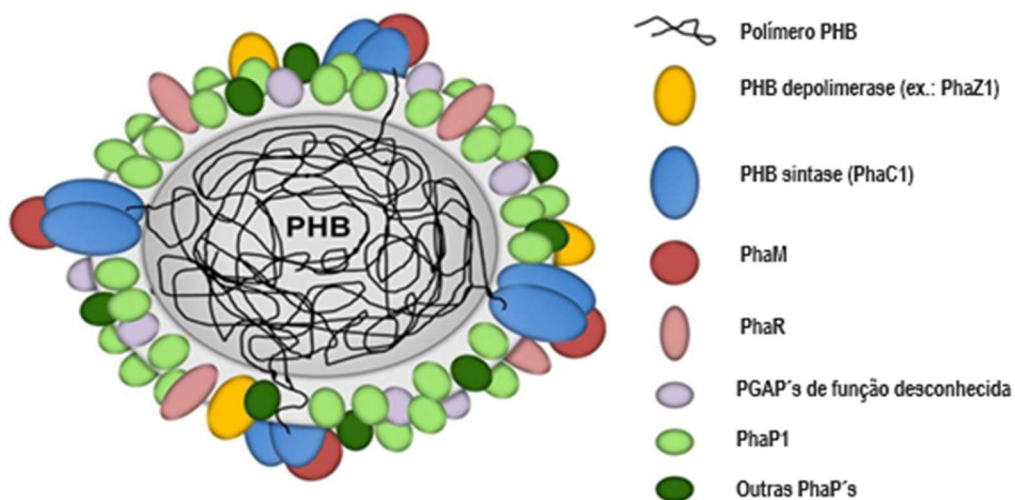
Um aspecto relevante a se observar na rota metabólica de produção do PHB é que a unidade PhaC da enzima PHA sintase é comum aos diferentes organismos produtores de PHA, podendo ser usada como identificadora da capacidade de produção de PHA por determinado organismo (Silva *et al.*, 2016). Com base nesta constatação, a identificação de cianobactérias produtoras de polihidroxialcanoatos pode ser realizada por meio de técnicas de detecção molecular, identificando portadores do gene *phaC* (Hai *et al.*, 2001).

Os grânulos de PHB formados, também conhecidos como carbonossomos (Jendrosseck, 2009), possuem diversas características relacionadas tanto à sua

formação quanto à sua funcionalidade (Jendrossek, 2009). Classificados como pseudo-organelas (Jendrossek, 2009), a superfície destes grânulos esféricos é recoberta por proteínas associadas, denominadas de GAP (do inglês, *grain associated protein*) responsáveis por diversas funções como polimerização, despolimerização, proteção do citoplasma, além de funções regulatórias (Mezzina e Pettinari, 2016).

Desde as primeiras avaliações bioquímicas, acreditava-se que a superfícies dos grânulos de PHB eram recobertas por fosfolipídeos organizados em monocamada. Com o emprego de proteínas marcadoras, foi possível demonstrar que os grânulos não apresentam fosfolipídeos (Bresan, 2016), tendo a observação inicial provavelmente ocorrido em função de contaminação no preparo. A Figura 18 apresenta uma elucidação estrutural destes grânulos, obtida para o microrganismo *Cupriavidus necator*.

Figura 18: Estrutura do grânulo de PHB elucidada para a *Ralstonia eutropha*. Inicialmente compreendido como uma organela recoberta por fosfolipídeos, foi demonstrado que a superfície do carbonossomo é recoberta integralmente por proteínas associadas ao metabolismo do PHB (Fonte: Bresan *et al.*, 2016).



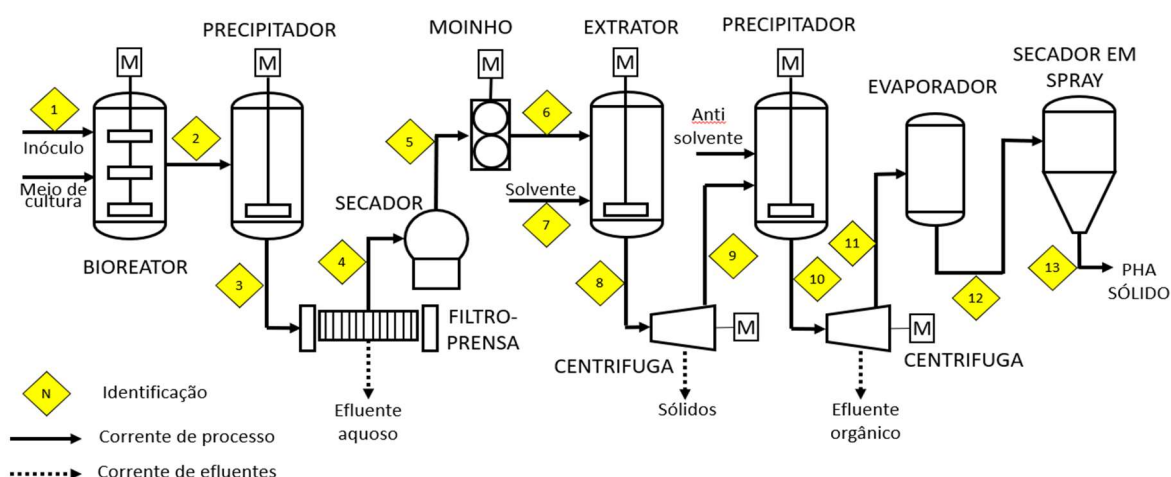
1.4.7 Processo convencional de produção do PHA

Diferentes processos biotecnológicos empregando bactérias quimiotróficas são realizados para a produção dos diversos tipos de PHA (Seghal e Gupta, 2020). De uma forma geral, a produção de PHAs é baseada na fermentação de matérias-primas como óleos vegetais, sacarose, glicose, e mais recentemente, resíduos agroindustriais, biogás e gás carbônico (Seghal e Gupta, 2020).

Cepas de microrganismos dos gêneros *Cupriavidus*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* são comumente empregados para a obtenção dos diferentes tipos de PHA (Chandani *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2016). Atualmente, cepas de *Cupriavidus necator* alcançam uma capacidade de acumular até 80% de polímero em relação à biomassa seca.

A Figura 19 apresenta uma sequência de processos básicos para produção industrial do PHA (Chen, 2015). Segundo Chen (2015), o processo produtivo do PHA por fermentação começa com o crescimento da biomassa microbiana em biorreatores. Uma corrente de processo contendo inóculo e meio de cultura (1) abastece um biorreator onde ocorre o crescimento do microrganismo e acúmulo de PHA.

Figura 19: Fluxograma de processo simplificado da produção de PHAs por fermentação. Nesta representação geral do processo, a etapa de extração é realizada com emprego de solvente. Não estão representadas redundâncias de equipamentos, bombas de processo, correntes de reciclo ou instrumentação (Simplificado com base em Chen, 2015).



Após a etapa de fermentação, a biomassa bacteriana é removida para um precipitador (2), onde ela é precipitada utilizando coagulação induzida ou química. A mistura de biomassa coagulada e o meio de cultura (3) é enviada a uma etapa de filtragem em um filtro-prensa, com a torta (sólidos) sendo encaminhada para secagem e pulverização (correntes 4 e 5, respectivamente).

Para a extração do PHA, a biomassa seca é enviada a um extrator (6), junto com uma corrente de solvente (7), responsável pela extração do PHA do interior da biomassa. Após o processo de extração, a corrente mista com solvente e resíduos de biomassa são centrifugados (8), sendo a fração líquida encaminhada para um tanque

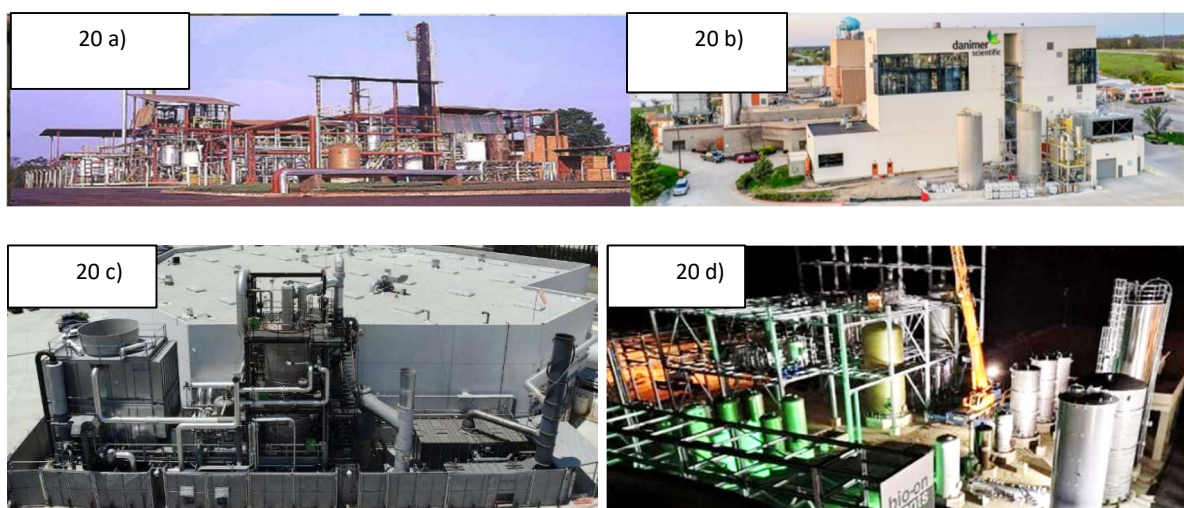
de precipitação (9). A precipitação é realizada com o emprego de um anti-solvente, que pode ser metanol, éter dietílico ou outro produto onde a solubilidade do PHA seja reduzida. O resultado do processo de precipitação é o PHA sólido, sendo o conteúdo do precipitador (10) separado por meio de centrifugação.

De forma a adequar a corrente contendo a mistura de PHA e solvente para secagem (11), esta é enviada a um evaporador que reduzirá a quantidade de solvente. A corrente proveniente do evaporador (12) é enviada ao secador (*spray dryer*), que opera a vácuo, evaporando o solvente e deixando ao final, somente o PHA sólido peletizado (13) e pronto para posterior processamento. (com base em Chen, 2015).

1.4.8 Capacidade de produção instalada

De uma forma geral, as unidades industriais existentes podem ser classificadas como empreendimentos de pequena escala, quando comparadas às grandes unidades de produção de termoplásticos derivados do petróleo (Carpine et al, 2020). A Figura 20 reúne fotografias que mostram algumas das plantas industriais de produção de PHAs atualmente instaladas em diversas partes do mundo.

Figura 20: Unidades de produção de PHA por fermentação ao redor do mundo. 20a.) Biocycle - Brasil ; 20b.) Danimer Scientific - EUA ; 20c.) ; 20d.) BioOn – Itália.



A título de comparação, a produção mundial de polipropileno (PP), um material que pode ser substituído pelo PHB, foi estimada com um volume anual de 76 milhões de toneladas em 2020 (OECD, 2017). Enquanto isso, a produção de todas as fábricas

de PHA no mundo, somadas, alcançou em 2017 um valor de 66 mil toneladas/ano (Carpine *et al*, 2020), quantidade mil vezes menor do que a produção de polipropileno. Mesmo levando em consideração uma taxa de crescimento anual da ordem de 5%, típica para a expansão da produção de polímeros, os valores de produção dos diferentes tipos de PHAs ainda são muito inferiores àqueles observados para o polipropileno atualmente. A Tabela 3 reúne as principais empresas produtoras de polihidroxicanoatos no mundo, bem como as suas capacidades produtivas, com destaque para a planta de produção brasileira pela ex-PHB Industrial, adquirida pela Biocycle em 2017.

Companhia	País	Capacidade (t/ano)	Matéria-prima	Tipo de PHA
Newlight technologies	EUA	23000	Biogás e CO ²	n.i.
Danimer Scientific	EUA	13600	óleo de canola	n.i.
Bio-On	Itália	10000	Beterraba e cana de açúcar	PHB, PHBV
Tianjin GreenBio Materials	China	10000	Açúcares	P(3HB-co-4HB)
Ecomann Biotechnology	China	3000	Açúcares	n.i.
TianAn Biopolymers	China	2000	Açúcar de milho	P3HB, PHBV
Kaneka	Japão	1000	Óleo vegetal	PHH
PHB Industrial S. A.	Brasil	500	Cana de açúcar	P3HB, PHBV
Biomer	Alemanha	500	Amido de milho	P3HB
Tepha Inc.	EUA	< 10	Açúcares e precursores do 4HB	P4HB P(3HB-co-4HB)
PolyFerm Canada	Canadá	< 10	Óleos vegetais e açúcares	PHOHHx PHNHHp
Terra Verdae Bioworks	Canadá	n.i.	Metanol	
Yield10 Bioscience	EUA	n.i.	Açúcar de milho	P3HB
Mango Materials	EUA	n.i.	Metano	PHB
SIRIM	Malásia	n.i.	Óleo de palma	n.i.

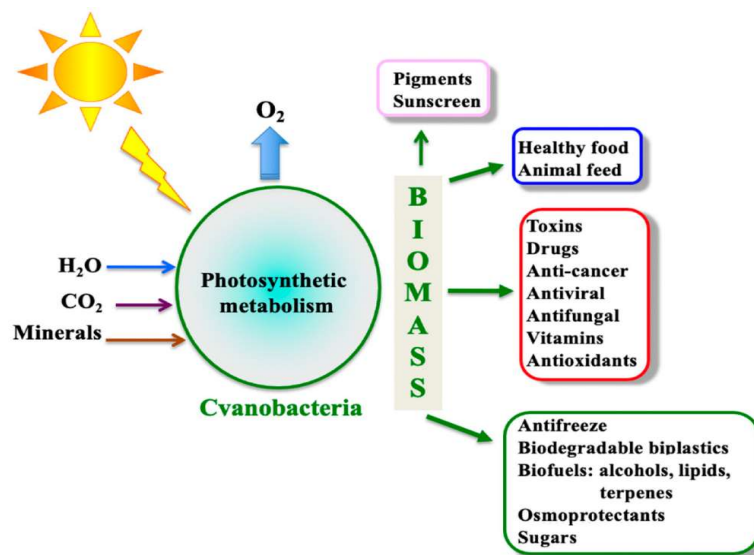
n.i.= não informado.

Tabela 3: Empresas produtoras de PHAs por biossíntese (Fonte: Carpine *et al*, 2020).

1.5 PRODUÇÃO FOTOSSÍNTÉTICA DE POLIHIDROXIALCANOATOS

As cianobactérias são microrganismos capazes de biossintetizar inúmeros compostos com o emprego de fontes minerais (Wijffels *et al.*, 2013). Realizando a fotossíntese oxigênica, estes microrganismos utilizam o gás carbônico da atmosfera, água e energia proveniente da luz solar para produzir compostos necessários à sua sobrevivência (Flores e Herrero, 2014). Muitos dos compostos produzidos pelo metabolismo de cianobactérias podem ser aproveitados para fins industriais. Pigmentos e protetores de radiação ultravioleta, proteínas, lipídios e carboidratos para alimentação, anti-congelantes, plásticos biodegradáveis, combustíveis e moléculas bioativas são alguns dentre os vários produtos que podem ser derivados da biomassa de cianobactérias (Cassieur-Chauvat *et al.*, 2021). A Figura 21 apresenta um esquema geral identificando a formação de produtos de alto valor agregado a partir de matérias-primas simples e encontradas no meio ambiente.

Figura 21: Potencial produção de diferentes compostos de alto valor agregado e suas diversas aplicações a partir de matérias-primas simples e de origem ambiental por cianobactérias (Reproduzida a partir de: Cassieur-Chauvat *et al.*, 2021).



Apesar de terem sido caracterizados por Lemoigne, desde o início do século XX (Lemoigne, 1926), foi somente em 1966 que Carr e colaboradores identificaram a formação de polihidroxicanoatos em cianobactérias (Carr *et al.*, 1966). Cultivando a cianobactéria *Chlorogloea fritschii* em meio com acetato como fonte de carbono reduzido, os pesquisadores foram capazes de demonstrar o acúmulo de PHB nestes microrganismos.

Capon e colaboradores realizaram uma bioprospecção por cianobactérias halofílicas produtoras de PHA no lago Joondalup, oeste da Austrália, e identificaram algumas cianobactérias do gênero *Aphanothece* com capacidade de produção de PHB (Capon *et al.*, 1983). Campbel e colaboradores demonstraram, em 1987, que também a cianobactéria *Spirulina platensis* apresentava capacidade de acúmulo de PHB sem que fosse necessário o acréscimo de compostos de carbono reduzidos (Campbel *et al.*, 1982).

A partir da caracterização molecular das enzimas sintetizantes de polihidroxicarboxilatos presentes em duas cepas de cianobactérias, *Chlorogloeopsis fritschi* PCC6912 e *Synechococcus sp.* MA19, Hai e colaboradores identificaram múltiplas evidências da ampla ocorrência da enzima PHA sintase classe III em cianobactérias (Hai *et al.*, 2001). Por meio de um conjunto de técnicas de detecção molecular (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) degenerados e hibridização *Southern blot*, estes autores foram capazes de identificar 10 cepas de cianobactérias produtoras de polihidroxicarboxilatos. A Tabela 4 reúne exemplos de algumas cepas de cianobactérias atualmente identificadas como produtoras de PHA, bem como informações sobre o substrato utilizado e a quantidade de polímero produzido.

CIANOACTÉRIA	FONTE DE CARBONO	% DE PHB EM BASE SECA DE BIOMASSA
<i>Anabaena sp.</i>	Na ₂ CO ₃	2.3
<i>Arthrospira platensis</i> UMACC 161	CO ₂	1%
<i>Arthrospira subsalsa</i>	Acetato e CO ₂	-
<i>Phormidium sp.</i>	Na ₂ CO ₃	0.007
<i>Phormidium sp.</i> NCCU-104	Na ₂ CO ₃	2.4
<i>Scytonema sp.</i> NCCU-126	Na ₂ CO ₃	1.5
<i>Spirulina platensis</i>	Na ₂ CO ₃	0.5
<i>Spirulina subsalsa</i>	Na ₂ CO ₃	7.0
<i>Synechocystis sp</i> PCC6803	Na ₂ CO ₃	4.7

Tabela 4: Cianobactérias produtoras de polihidroxicarboxilatos (Com base em Carpine *et al.*, 2020).

A produção biotecnológica destes materiais, com o emprego de cianobactérias, permite o aproveitamento do gás carbônico presente no ar ambiente ou concentrado em efluentes gasosos, como, por exemplo, o gás de queima de unidades de geração de energia (Roh *et al.*, 2021). Estas possibilidades permitem a integração da produção de PHA com a captura de carbono da atmosfera, permitindo a integração deste processo a um esquema de economia circular de carbono neutro (Grandíssimo *et al.*, 2020).

Da mesma forma, o uso de efluentes líquidos contendo carbono, como esgoto sanitário e resíduos industriais, permite a reutilização de materiais que seriam descartados, não demandando fontes de carbono de alto valor, como a glicose, ou mesmo competindo com recursos utilizados para alimentação (Grandíssimo *et al.*, 2020).

Além disso, a produção fotoautotrófica de PHA resulta numa série de vantagens competitivas frente à produção com o emprego de bactérias e fermentação. A possibilidade de uso de cianobactérias halofílicas e termofílicas no processo de produção de PHA, permite reduzir o risco de contaminação dos cultivos, uma vez que é possível realizar estes processos em meios onde poucos microrganismos são capazes de crescer (Obulisamy e Mehariya., 2021). Além disso, o uso de espécies marinhas de cianobactérias permite a adoção de água do mar, reduzindo o consumo de água potável, um recurso limitado.

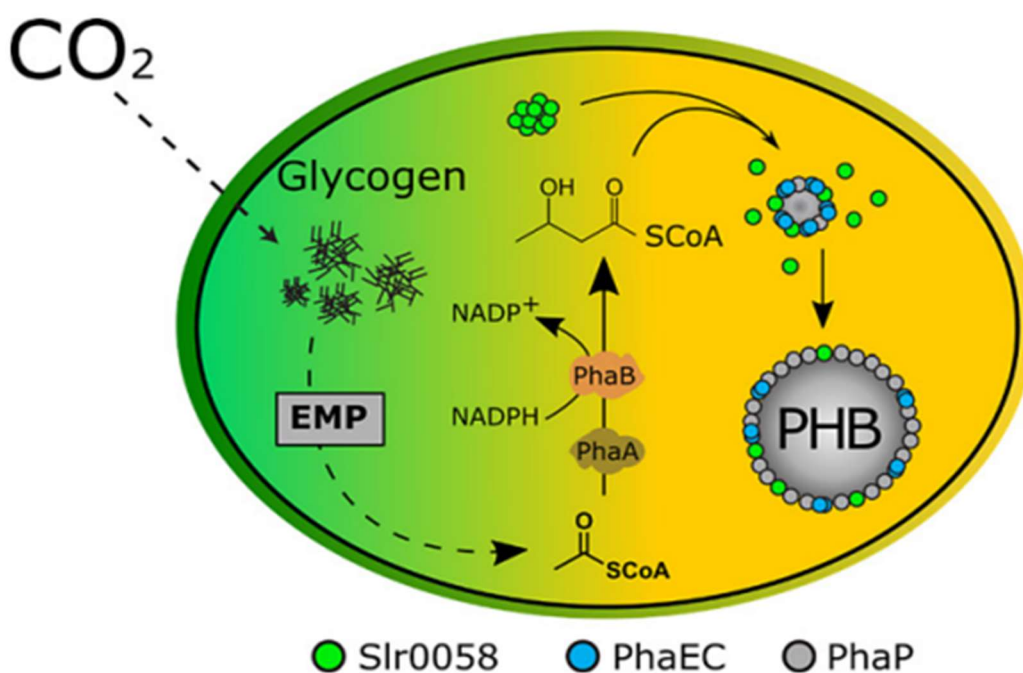
A produção fotoautotrófica de PHA com o emprego de cianobactérias se inicia pelo cultivo da cepa produtora selecionada visando o acúmulo de biomassa. Com o emprego de meios de cultura específicos, as cianobactérias são mantidas em fotobioreatores com períodos de iluminação variável e baixa intensidade de fluxo luminoso ($\sim 60 \mu\text{M}/\text{m}^2$) por períodos que podem variar de 8 a 15 dias.

Após o acúmulo de biomassa no fotobioreator, a recuperação desta é realizada por meio de processos como centrifugação ou filtração. Para o início da etapa de indução, a biomassa recolhida é suspensa em um meio de cultura carente de nitrogênio ou fósforo. No mesmo meio de cultura utilizado para indução, um excesso de carbono, na forma orgânica (ex. acetato) ou inorgânica (CO_2), deve ser mantido. A carência de macronutriente, acompanhada do excesso de carbono, inicia o acúmulo

de glicogênio e PHA no interior das células, em um processo conhecido como clorólise (Koch *et al.*, 2019).

O acúmulo de glicogênio desenvolve-se rapidamente nos primeiros dias de indução. Com o avanço da clorólise, as reservas de glicogênio formadas são convertidas em PHA (Koch *et al.*, 2019). Estudos recentes evidenciaram que a maioria do carbono utilizado para a construção do PHB, na *Synechocysties* sp PCC 6803, é proveniente de metabólitos presentes na célula, em sua maioria derivados da glicólise através do ciclo Embden–Meyerhof–Parnas, (Koch *et al.*, 2019). Entretanto, estes achados não explicam o uso de substratos diversos como valerato para a construção dos grãos de polihidroxicanoatos. A Figura 22 representa o ciclo de conversão de carbono inorgânico em PHA intermediado pelos processos da rota EMP. Na Figura, a proteína Slr0058 atua como promotora para a síntese de PHB.

Figura 22 Conversão de glicogênio intracelular em substrato para a produção de PHB (reproduzido de: Koch *et al.*, 2019).



A produção fototrófica do PHA reproduz o processo de clorólise de maneira controlada, buscando maximizar a produção do polímero e minimizar os tempos de acúmulo de biomassa e indução. De uma forma geral, após um período de acúmulo de biomassa, esta é suspensa em meio de cultura com restrição nutricional,

usualmente de nitrato ou fosfato (Troschl *et al.*, 2017). Pesquisas prévias mostraram que a manutenção de um valor reduzido de nitrato na fase de indução permite aumentar a quantidade de polímero produzido durante a fase de indução (Carpine *et al.*, 2019). Da mesma forma, a restrição de oxigênio, um recurso que estimula o desenvolvimento da respiração celular, permitindo o esgotamento dos acúmulos de glicogênio, conduz a um aumento no acúmulo de polímero (Panda e Mallick, 2007).

O meio de cultura para indução deve ter seu pH controlado e mantido com emprego de tampões orgânicos, uma vez que o acúmulo de polímero é sensível à variação deste parâmetro (Sharma e Mallick, 2005). De uma forma geral, os cultivos em processo de indução são mantidos com pH alcalino com o emprego de tampões orgânicos como TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) (Lourenço, 2008). A escolha do tampão para manutenção do pH depende da cepa utilizada, uma vez que alguns tampões podem ser tóxicos para algumas espécies de cianobactérias, inibindo seu crescimento (Tindall *et al.*, 1978). Outro ponto relevante, é que a presença de tampões pode favorecer o crescimento de bactérias competidoras (Fábregas *et al.*, 1993), levando os cultivos ao colapso.

Além da manutenção de pH em faixa adequada para o acúmulo do polímero, é necessário manter um excesso de carbono no meio de cultura. As quantidades e formas de administração deste excesso de carbono são dependentes da espécie de cianobactéria sendo utilizada (Carpine *et al.*, 2021). De uma forma geral, o teste para identificação de produtores de PHA por meio de indução faz uso do acetato como forma de carbono em excesso livre (Koller *et al.*, 2015).

Após o processo de indução, realiza-se a lise celular para a remoção dos grânulos de PHA do interior do citoplasma. Diversos processos podem ser utilizados para a lise celular, desde a ruptura química da membrana com emprego de hipoclorito até alta pressão, ultrassom ou outros (Pagliano *et al.*, 2021). Um fator importante a ser considerado é que o processo de ruptura celular afeta as propriedades do polímero obtido, sendo importante considerar tais modificações em função da aplicação pretendida (Pagliano *et al.*, 2021).

A recuperação e a purificação do polímero após sua remoção do interior das células podem ser realizados também por meio de centrifugação, com a destruição de

todos os compostos distintos do PHA (Non PHA Carbon Materials – NPCM), processo em que se obtêm grânulos de PHA prontos para uso em aplicações por sistemas de entrega de fármacos (Koller *et al.*, 2013).

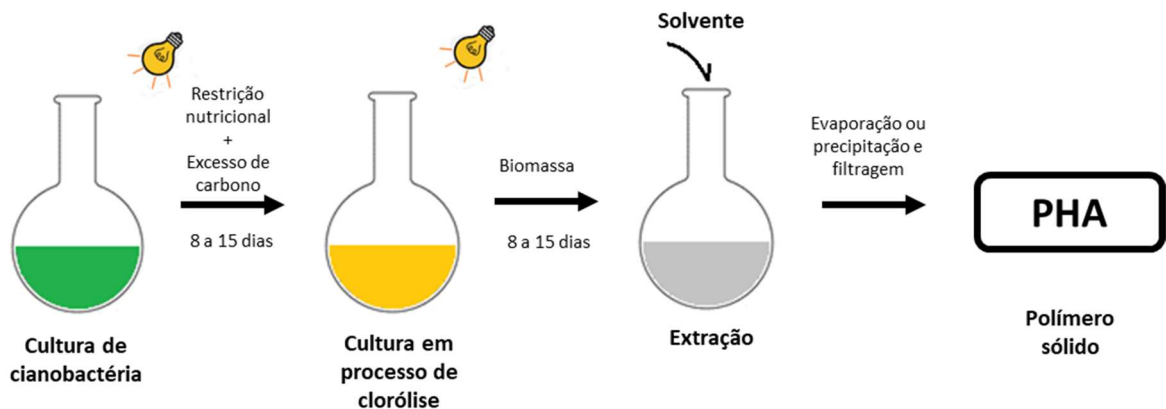
De forma geral, são utilizados solventes para a solubilização do PHA após a ruptura celular e a dissolução de outros compostos NPCM (Koller *et al.*, 2013). Após a extração, processo que pode empregar diversos tipos de solventes, a purificação pode ser feita por meio de sucessivas etapas de reprecipitação, com uso de anti-solventes, e lavagens (Koller *et al.*, 2013). A tabela 5 apresenta a solubilidade de polímeros do tipo polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV) frente a diversos tipos de solventes (Vermeer *et al.*, 2021).

SOLVENTE	SOLUBILIDADE (g/l)
Clorofórmio	98
Metil-etil-cetona (MEK)	59
Ciclohexanona	56
Acetato de etila	51
Tetrahidrofurano (THF)	47
Acetona	43
Dimetil carbonato (DMC)	41
Tolueno	34
Anisol	31
Metil isso butil cetona (MIBK)	24
Acetato de butila	21
Xileno	14
Metanol	12
di-isobutil-cetona (DIBK)	8
Etanol	5
1-Propanol	2
2-Propanol	2
2-Etilhexanol	2
Acetonitrila	2
1-butanol	1
2-butanol	1
Água	1
1-pentanol	< 1
Pentano/heptano	< 1

Tabela 5: Solubilidade de PHB em diferentes solventes (Vermeer et al., 2021).

A Figura 23 apresenta um resumo geral do processo fotoautótrofo para obtenção de polihidroxicanoatos.

Figura 23: Esquema básico da produção fotossintética de polihidroxicanoatos. No processo acima, dois estágios de cultivo são necessários para a obtenção do polímero. Apesar de existirem diferentes abordagens para o processo de extração, o emprego de solventes continua sendo a forma mais simples e comum de recuperação do polímero.



Vários obstáculos para a produção eficiente do PHA com emprego de cianobactérias precisam ser vencidos antes que os engenheiros possam se debruçar sobre o desenvolvimento de plantas de processo para produção de bioplásticos por esta via (Carpine *et al.*, 2020). Enquanto cepas de bactérias são capazes de acumular até 90% de PHA por peso de biomassa seca, cianobactérias selvagens chegam a acumular no máximo valores que alcançam 20% de biopolímero por massa seca (Koch & Forchhammer, 2015).

Mesmo com o emprego de estratégias de engenharia metabólica, as cepas de cianobactérias limitam-se a valores que alcançam os 37% de biopolímero, valor bastante aquém do obtido com o emprego de bactérias (Koch & Forchhammer, 2015). O grande volume de resíduo proveniente da separação do polímero, pode ser utilizado para a obtenção de outros bioprodutos, como proteínas e pigmentos, o que torna a aplicação atraente dentro de um esquema de biorrefinaria fotossintética, onde o conjunto de produtos possa ser aproveitado (Jiang *et al.*, 2016).

Outro obstáculo para a produção fototrófica de PHA está relacionado à taxa de crescimento de cianobactérias, inferior ao observado em bactérias heterotróficas (Drakare, 2002). Ainda que a possibilidade de cultivo extensivo, com o emprego de fotobiorreatores (PBR) do tipo *raceway*, permitam a operação com grandes volumes,

as densidades celulares estão limitadas pelo fotosombreamento, efeito que reduz a penetração de luz no seio do meio de cultura e, conseqüentemente, a taxa de crescimento e densidades máximas alcançáveis (Saccardo *et al.*, 2022).

O emprego de fotobiorreatores fechados, como os fotobiorreatores tubulares ou de placas planas, permite a obtenção de maiores taxas de produção (Janssen *et al.*, 2003). Estes sistemas demandam maiores valores de investimento em capital e custo operacional para a sua implantação e operacionalização, afetando as taxas de retorno dos investimentos e reduzindo a possibilidade de competição destes materiais com similares derivados de matérias-primas fósseis (Chisti, 2008).

A produção de PHA com cianobactérias compartilha alguns desafios também identificados para a produção desses polímeros com o emprego de bactérias quimiotróficas. A Tabela 5 elenca uma série de desafios tecnológicos necessários ao aumento da eficiência de produção de PHA por microrganismos (Wang *et al.*, 2014), que podem ser aplicados também para a rota de produção fotossintética.

TECNOLOGIAS NECESSÁRIAS AO DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PHA	
AREAS DO PROCESSO PRODUTIVO	OBJETIVOS
TECNOLOGIAS CELULARES	Células com alta taxa de crescimento
	Seleção de cepas com alta resistência a condições extremas de salinidade e temperatura
	Aumento da capacidade de acúmulo de PHA intracelular (90 a 95 % da massa seca)
	Aproveitamento de substratos residuários
	Aumento da conversão de substrato em PHA
	Aumento do tamanho celular
	Aumento dos grânulos de PHA intracelular
	Ruptura celular por superprodução de PHA
	Produção de PHA extracelular
PROCESSAMENTO "UPSTREAM"	Crescimento celular em substratos de baixo custo
	Lise celular induzida
	Otimização da densidade celular dos cultivos
	Cultivo em sistemas abertos não estéreis
	Otimização de fotobiorreatores
	Otimização no consumo energético do processo de esterilização de água
PROCESSAMENTO "DOWNSTREAM"	Colheita (Harvesting) com o emprego de floculação
	Aumento da recuperação de PHA com solventes não tóxicos
	Otimização energética do processo de recuperação de PHA da biomassa
	Desenvolvimento de processos úmidos para recuperação de biomassa

TECNOLOGIAS NECESSÁRIAS AO DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PHA	
	Reaproveitamento de biomassa pós extração
	Integração a processos de produção em esquema de biorefinaria.

Tabela 5: Aspectos relevantes do ponto de vista biotecnológico, para a viabilização da produção de polihidroxialcanoatos (Com base em Wang *et al.*, 2014).

Além dos aspectos relacionados com as tecnologias de manipulação celular, outros aspectos relacionados ao processamento *upstream* e *downstream* da biomassa, precisam ser observados, como indicado na tabela. Esterilização de água e matéria-prima para produção de meio de cultura, recuperação de biomassa do meio de cultivo, lise celular, secagem, eficiência de extração e recuperação de solventes, uso de solventes verdes, reciclo e reaproveitamento das correntes de efluentes e resíduos, dentre outros, precisam de atenção para que a produção fotossintética do PHA possa se tornar economicamente competitiva (Price *et al.*, 2022).

1.6 BIOPROSPECÇÃO DE PRODUTORES DE POLIDROXIALCANOATOS

Um aspecto importante relacionado a estabilidade de cultivos de cianobactérias para produção de PHA é a contaminação com outros microrganismos. Um experimento de 3 anos com uma planta piloto para produção fotoautotrófica de PHA utilizando uma cepa de *Synechocystis salina* CCALA192, constatou a contaminação por microrganismos, particularmente ciliados, como sendo um dos fatores que produziram a maior quantidade de interrupções de processo (Troschl *et al.*, 2017).

Uma alternativa para reduzir a contaminação é identificar microrganismos produtores de PHA extremófilos, que em função de condições de incubação e características de seus meios de cultura tenham poucos competidores ou predadores. A halobactéria produtora de PHA *Haloferax mediterranei*, característica de locais de alta salinidade e temperatura, apresenta capacidade de acumular PHB em níveis de até 60% de biomassa seca (Lillo e Rodriguez-Valera., 1990). Outra extremófila, a cianobactéria *Spirulina subsalsa*, foi identificada como produtora de polihidroxicanoatos (Shrivastav *et al.*, 2010). Numa avaliação sobre produção deste polímero em função do aumento da salinidade, foi possível identificar uma correlação positiva para o acúmulo de PHA com o aumento da salinidade (Shrivastav *et al.*, 2010). Este resultado abre espaço para a pesquisa de produtores de PHA em ambientes de elevada salinidade.

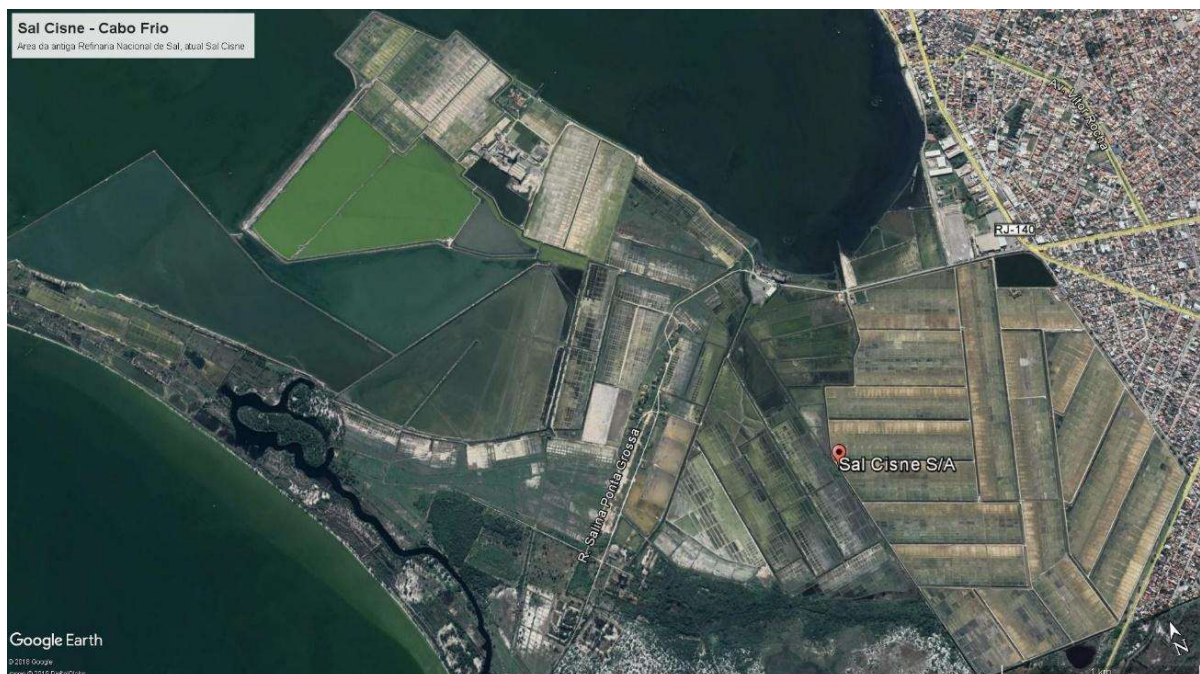
Os achados relacionados à produção de PHA por cianobactérias extremófilas mostram a importância de expandir a pesquisa relacionada a microrganismos extremófilos produtores de polihidroxicanoatos. Um sítio com potencial de apresentar microrganismos extremófilos são os tapetes microbianos de salinas, que reúnem condições extremas de alta salinidade, temperatura e radiação solar.

Melo e colaboradores identificaram nos tapetes microbianos de cristalizadores das salinas da região de Cabo Frio, microrganismos do gênero *Aphanothece* (Melo *et al.*, 2010), ambientados a condições de alta salinidade, temperatura e intensidade de radiação solar. A literatura indica que microrganismos deste gênero já haviam sido identificados como produtores de PHA (Capon *et al.*, 1983). Com base em tais achados, a busca por produtores de PHA nestes locais pode apontar cianobactérias com capacidade de sobrevivência em condições extremas, permitindo o estabelecimento de condições de processo que reduzam o problema da contaminação

(Obulisamy e Mehariya, 2021). Além disso, a exploração de produtores de PHA dentre cianobactérias marinhas tem o potencial de identificar novas cepas que podem ser utilizadas em esquemas de produção de biopolímeros.

O processo de produção de sal é desenvolvido por meio da evaporação da água salgada proveniente do mar ou de uma lagoa hipersalina. No caso das salinas da região de Cabo Frio, a água utilizada no processo é obtida a partir da laguna de Araruama, adjacente às instalações da empresa; A Figura 24 apresenta uma vista aérea indicando a área ocupada pelas salinas da empresa Sal Cisne®.

Figura 24: Área da Sal Cisne apresentando as áreas de salinas (reservatórios de evaporação) e unidade industrial.



A água da laguna de Araruama, com densidade de 5 °Bé (salinidade equivalente de 53,6%) é admitida na área da salina em tanques de grande volume. Nestes reservatórios, a água é mantida por determinado tempo até atingir uma salinidade de 7 °Bé (salinidade equivalente de 75,04%), o que ocorre em função da evaporação natural. A salmoura pré-concentrada é enviada para tanques de concentração, onde a densidade alcança valores na faixa de 16 a 24 °Bé (salinidade equivalente de 75,04%), sendo a salmoura então encaminhada para os tanques cristalizadores. Usualmente, nos tanques cristalizadores, com lâmina d'água variando entre 2 e 2,5 cm, a densidade alcança de 25 a 30 °Bé (salinidade equivalente de 75,04%), ocorrendo então a precipitação do cloreto de sódio. (Baeta-Neves e Casarin,

1990). Nas salinas da empresa Sal Cisne, em função do uso de sistema de evaporação, a precipitação do cloreto de sódio se dá nas instalações da refinaria de sal, sendo a salinidade máxima alcançada nos tanques cristalizadores, inferior a necessária para a precipitação do cloreto de sódio.

O processo de cristalização fracionada empregado, proporciona a formação de depósitos minerais no fundo destes tanques, formando um ambiente propício ao crescimento de microrganismos (Javor, 1997). Formados no fundo dos tanques cristalizadores, os tapetes microbianos são estruturas organo-sedimentares laminadas, que se desenvolvem sobre superfícies sólidas (Sørensen *et al.*, 2005) A Figura 25 apresenta um exemplo de tapete microbiano formado no fundo dos cristalizadores.

Figura 25 Tapetes microbianos formados no fundo de tanques cristalizadores de sal.



No artigo **“Isolation, identification, and unialgal cultivation of cyanobacterial of microbial mats from salt crystallizers for biotechnological bioprospection”**, capítulo 4 deste trabalho, são apresentadas as atividades realizadas para amostragem, isolamento e identificação morfológica e molecular de cianobactérias isoladas a partir de tapetes microbianos. Aspectos relacionados à importância da manutenção de cepas unialgais para fins de prospecção biotecnológica são discutidos.

No artigo **“Bioprospection of marine and hypersaline cyanobacteria for polyhydroxyalkanoates production and polymer characterization”**, apresentado no capítulo 5 deste trabalho, será descrita a bioprospecção, para identificação de cianobactérias produtoras de PHA dentre as cianobactérias isoladas a partir dos tapetes microbianos das salinas e apresentadas no capítulo 4 e um conjunto de cianobactérias obtidas a partir de coleções de cultura no Brasil. A prospecção de microrganismos produtores de polihidroxialcanoatos tem por objetivo identificar cepas com potencial de produção destes polímeros, bem como obter as características essenciais do material produzido. Neste capítulo, a produção de PHA a partir de microrganismo identificado como produtor do polímero será apresentada e procedimentos relacionados à caracterização do material produzido, como cromatografia gasosa, são demonstrados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e identificar polímero biodegradável do tipo poliéster a partir de microrganismos fotossintetizantes de origem marinha, com ênfase para cianobactérias isoladas a partir de cristalizadores de salinas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar microrganismos produtores de PHA a partir de amostras ambientais e microrganismos isolados provenientes de bancos de microalgas e cianobactérias.

Identificar os genes produtores de PHA nos microrganismos isolados e qualificar a classe da enzima sintetizante, bem como avaliar as diferenças estruturais da mesma frente a outras já identificadas.

Cultivar e induzir a produção de polihidroxialcanoatos das cepas identificadas como produtoras para obtenção de polímero.

Obter a composição monomérica do polímero obtido.

3 HIPÓTESE

Existem microrganismos fotoautotróficos produtores de biopoliésteres entre os microrganismos presentes nos tapetes microbianos de cristalizadores de salinas da região de Cabo Frio bem como entre os oriundos de coleções de cultura obtidos para os propósitos do presente trabalho.

4 ARTICLE 1: ISOLATION, IDENTIFICATION, AND UNIALGAL CULTIVATION OF CYANOBACTERIA FROM MICROBIAL MATS FROM SALT CRYSTALLIZERS FOR BIOTECHNOLOGICAL BIOPROSPECTION

Abstract: Cyanobacteria are photosynthetic microorganisms known for producing bioactive compounds and renewable materials. By using solar energy and simple raw materials, these microorganisms have the potential to be a platform for the development of biotechnological processes integrated into the circular economy to produce renewable goods. The search for new biotechnological products demands the assurance of reproducibility of research results. The use of crude extracts from environmental samples for the prospecting of biological activities and bioproducts subjects the research to the unknown sources of production of identified compounds. In this context, the isolation and cultivation of microorganisms constitute an important step for ensuring the quality of biotechnological evaluation processes, as well as for the establishment of pipelines to produce viable natural products. In the present study, we isolated, identified, and cultivated halophilic benthic microorganisms from microbial mats collected in salt crystallization ponds in the Cabo Frio, Rio de Janeiro. The microbial isolation was performed by the manual cell sorting technique, resulting in a total of 6 isolated strains. For identification purposes, classical taxonomic evaluation was performed based on taxonomic keys, and additional 16S rRNA gene sequencing made it possible to evidence the phylogenetic position of the isolated microorganisms at the species level. Most of the isolated strains were molecularly identified in the genus *Eubhalothece*.

Keywords: Solar saltern microbiology; algal mats; halophylic cyanobacteria; biotechnological prospection.

4.1 INTRODUCTION

Cyanobacteria constitute a source of a diverse array of bioactive compounds (Singh *et al.*, 2019) and materials of biotechnological potential, such as biofuels, biopolymers, platform chemicals, proteins, carbohydrates, and lipids (Wijffels *et al.*, 2013). The ability of these microorganisms to perform photosynthesis using light and simple inorganic compounds, including carbon dioxide, establish them as a potential biotechnological platform for producing materials in a renewable way, within a circular economy perspective (Grandíssimo *et al.*, 2020).

Usually found in environments with adverse conditions for the development of other living organisms, extremophilic cyanobacteria have potential utility for various biotechnological purposes (Genuário *et al.*, 2019). Capable of surviving and thriving under extreme environmental conditions, such as high salinity, extreme alkaline environments, low and high temperature or high levels of solar radiation, these organisms have been targeted as a source for research on bioactive compounds from its secondary metabolism, such as polyketides, alkaloids, terpenes and polyphenols, among others (Carpine and Sieber, 2021).

An environmental site of potential interest for bioprospecting extremophilic microorganisms are the microbial mats formed in hypersaline environments of solar salterns (Javor, 1997). At the bottom of crystallizer ponds, in a salinity range between 26 °Bé and 30 °Bé, a microbial ecosystem, vertically stratified and exchanging mass and energy, grows associated with mineral sediments (Javor, 1997). The microbes found at the top layer of those microbial mats are mainly photosynthetic microorganisms, among cyanobacteria and diatoms, involved in a mucilaginous layer secreted by the organism itself (Al-Deen and Al-Deen, 1972).

A species of cyanobacteria *Aphanothece halophytica* is usually found in those ponds, thriving among high alkalinity and salinity (Javor, 1997). Responsible for the viscous mucilaginous matrix that characterize the orange top layer of those microbial mats, these cyanobacteria have a history as a source of multiple biotechnological byproducts (Zheng *et al.*, 2006, Miriam *et al.*, 2017, Taikhao e Phunpruch, 2015). The production of exopolysaccharides by these species is a matter of interest for cancer research, since these materials are known to induce HeLa cell apoptosis, a model used for cancer research (Ou *et al.*, 2014).

The exopolysaccharides produced by *A. halophytica*, when subjected to environments of high salinity, exhibit biotechnological interest. To reduce sedimentation over microbial mats, which may hinder the light capture of photosynthetic organisms, the polysaccharide secreted by this species inhibits sedimentation of clay (Chen *et al.*, 2010), what can be used for removal of harmful algal blooms (Anderson 1997, Sengco *et al.* 2001). Another property of the secreted polysaccharides is related to their capacity to capture multiple ions, including heavy metal ions, a chelant property that can be used for remediation purposes and can be modulated by pH changes (Laloknam *et al.*, 2009).

Recent studies with this species have explored its ability to produce hydrogen under nitrogen deprivation (Ananyev *et al.*, 2012). Using a two-stage production scheme involving cultivation and hydrogen production induction, it was possible to produce hydrogen gas (H₂) in anaerobic conditions (Ananyev *et al.*, 2012). The production of hydrogen using cyanobacteria enable the development of devices driven by solar energy and constitutes one of the options for the production of renewable energy in large scale (Sakurai *et al.*, 2015).

The Araruama lagoon, located in Cabo Frio, Rio de Janeiro, southeast Brazil, is a high salinity body of water. Mostly isolated from the ocean water intakes, the salinity of this lagoon reaches values between 46 to 56 (Kjerfve *et al.*, 1996). Surrounding the Araruama Lagoon, multiple companies explore the high salinity waters to extract sodium chloride using solar salterns as a process. Reaching salinities as high as 300 g/L, the solar saltern ponds form multiple microbial mats that can be explored for research purposes (Javour, 2002).

The cyanobacteria *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 and *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, 1849 were isolated from the microbial mat of the salinas of Arraial do Cabo (Melo *et al.*, 2010). In the same region, it was identified the same cyanobacterium in sediments from the Pitanguinha lagoon, adjacent to the Araruama lagoon (Silva *et al.*, 2007). However, in a survey to verify the cyanobacterial diversity in microbial mats from the Araruama lagoon, using PCR-DGGE and pyrosequencing techniques, it was not found the presence of this species in the sampled points, not confirming the presence of *A halophytica* in the Araruama lagoon through molecular means (Ramos *et al.*, 2017).

An important aspect of research in life sciences and biotechnology is the reproducibility of the results of a given study. A survey indicated that over 60% of researchers were not able to reproduce their own work (Baker, 2016). Among the various factors that affect the reproducibility of scientific research, the availability of strains of microorganisms verified in terms of morphological and genetic characteristics are a central factor to improve data integrity and assay reproducibility (ATCC).

Considering the issue of experimental reproducibility and data integrity, which directly affects the set of conclusions obtained from a given study, a fundamental step for the bioprospecting of natural products consists of isolating microorganisms for research development (Dale *et al.*, 2006, Sekurova *et al.*, 2019). Several techniques assist researchers in this issue, such as plating using general or specific solid media (Ripka, 1988, Ferris, 1991) or employing flow cytometry equipped with cell sorting devices (Poniedziałek *et al.*, 2017).

For microorganisms that have slow growth in solid media, an option for isolation and development of monoclonal cultures consists of using manipulators for individual cell selection and separation (Ripka, 1988). It can be performed manually under inverted microscope, using micropipettes and subsequent passages until a single cell is isolated (Lourenço, 2008), what it accessible to laboratories with limited resources.

After the isolation, the morphological and molecular identification of the microorganisms are essential steps to establish a tool for verification of scientific work (ATCC). The classical taxonomy approach to identify microorganisms based on key morphological traits constitutes the basis of the identification, followed by the genetic identification using the 16S rRNA (Sandle, 2016). For cyanobacteria, a group known by large structural plasticity, those techniques need to be complemented by a polyphasic approach to cover phenotypic characteristics not readily available, like biochemical characteristics (Komárek, 2016).

To molecularly identify isolated microorganisms, the use of 16S rRNA gene information is a basic tool. Generic primer pairs, like 27F/1492R allow the identification of most microorganisms (Weisburg *et al.*, 1991) based on the nearly full length of 16S rRNA gene to be amplified. Due to their generalist characteristic, these primers allow for amplification of this region for all microorganisms present in a sample, which may reduce the quality of the results observed in non-axenic samples, but may be used to validate the purity of cultures (Heck *et al.*, 2016). For these cases, the use of primer

pairs previously developed for amplification of the 16S rRNA of cyanobacteria, allows the identification of organisms with quality higher than the one considering the use of generic primers pairs (Nubel *et al.*, 1997).

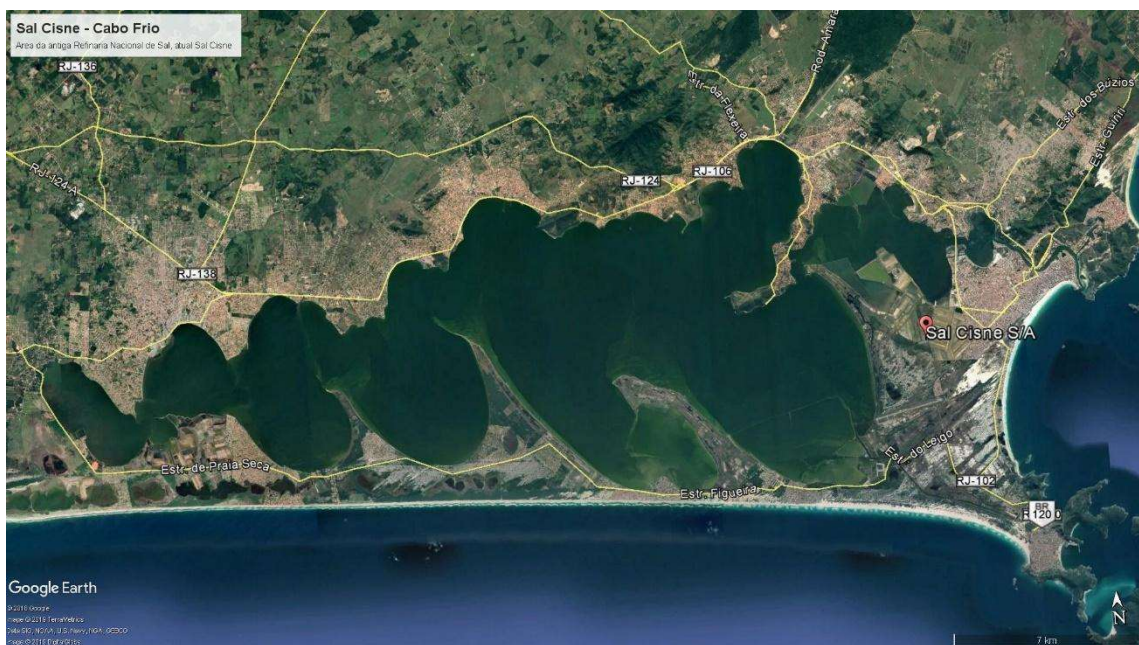
In this study, we present the isolation process to establish monoclonal cultures of cyanobacteria sampled from hypersaline environments of solar salterns in the region of Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brazil. Applying a manual cell sorting methodology and classic culture media we sort a set of 6 monoclonal cultures and molecularly verify the presence of *A. halophytica* at Araruama lagoon. The morphological and molecular identification of the isolates were developed, and the general aspects of culture conditions were evaluated.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Sampling site

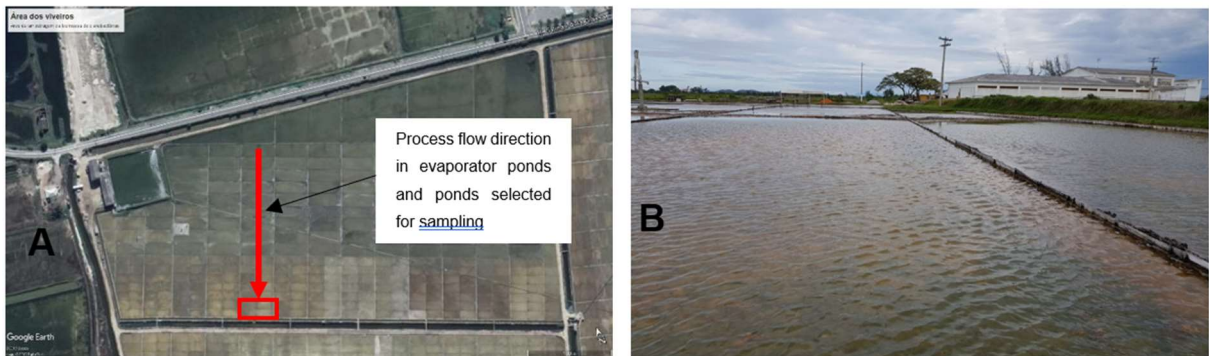
The samples were collected from the microbial mats formed on the bottom of the crystallizer ponds of the Sal Cisne[®] company (22°53'45.8"S and 42°03'20.5"W), in Cabo Frio, Rio de Janeiro, Southeast Brazil (Figure 26). Located adjacent to the Araruama lagoon, the company can collect saltwater from this body of water. The company's salt salterns operating through a process of progressive evaporation, with salinity ranging from 50 in the intake to 300 in the salt crystallization ponds, produce sodium chloride brine.

Figure 26: Sampling site highlighting the location where the microbial mats were collected (source: Google Earth).



The microbial mats give an orange coloration to the tanks with higher salinity, which is characteristic of the microorganisms present at the surface layer and their biochemical profile (Figure 27).

Figure 27: Sal Cisne® company crystallizer ponds. B. Detail of the crystallizer ponds.



The sampling site was selected based on the previous report of the occurrence of *Aphanothece halophytica* in crystallizer ponds (Melo *et al.*, 2011) which described this cyanobacteria species as dominant in microbial mat. The ponds selected for sampling were the last ones of the process flow as shown in Figure 2A (highlighted in red). Figure 2B shows a view of one crystallizer pond.

4.2.2 Sampling and sample processing

The surface material of the microbial mats was sampled and placed in sterile Falcon tubes. The Figure 28 shows the general aspect of the orange layer of the microbial mat sampled from the selected crystallizer ponds. The detail shows a scheme for the microbial mat stratification, including the top layer that contains the targeted microorganisms.

Figure 28: Cross section of the microbial mat, sampled from the bottom of the crystallizer. The surface layer, which is orange in color, was sampled to obtain cyanobacteria isolates.



To acclimate the material to the culture conditions, the samples were kept on shelves illuminated by 6.500k daylight LED lamps, with an intensity of $20\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ and 12h/12h dark:light photoperiod, in a temperature-controlled room at 20 °C. After a period of 1 week, a fraction of approximately 5 cm³ of material was transferred to a Falcon tube containing 50 mL of a sterile F/2 Guillard culture medium (Appendix A) prepared with seawater of salinity 35. The subsampled materials were kept under culture conditions for a period of two weeks.

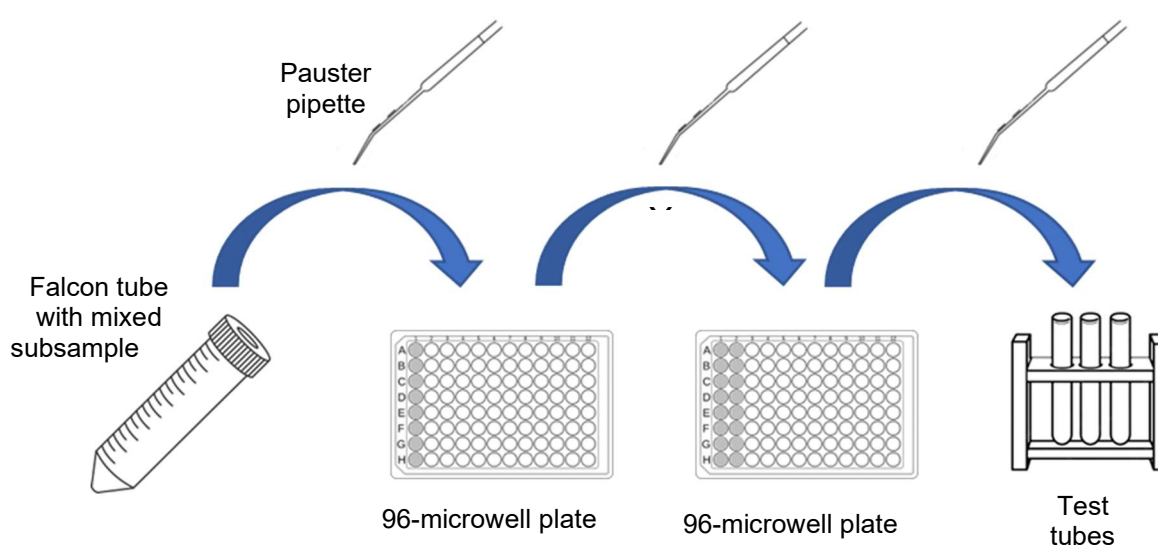
4.2.3 Cyanobacterial isolation

After the acclimation period, the Falcon tube containing the material was agitated using a vortex mixer and a volume of a few drops was sampled and transferred to microwells in a sterile 96 flat bottom microwell plate. The microorganisms present in the microwells were evaluated using an inverted optical microscope using magnifications of 20 and 40X.

The isolation of microorganisms present in the sampled material was performed using the sequential dilution and micromanipulation using a Pausteur micropipet technique (Ripka, 1988). Based on morphological information, cyanobacteria cells were identified and transferred to an adjacent well using a Pasteur micropipette with a recurved tip. The new micro well volume was filled with Guillard F/2 medium without

silicon supply to reduce the diatom's growth. The well plate was covered with the lid and partially sealed to reduce dehydration. This procedure was repeated on a weekly basis, until it was possible to guarantee two or three passages with a single cell. After a period of 6 to 8 weeks, the contents of the wells were verified, and a single cell was transferred to a test tube containing 5 mL of culture medium. The Figure 29 depicts the sequential procedure applied for isolation.

Figure 29: Procedures used for isolation of slow-growing cyanobacteria from microbial mats subsample. All transfers were done under inverted microscope and manual manipulation. The n variable indicates the number of passages needed for unialgal isolation.



The test tubes were kept on the shelves for a period of 2 months until biomass growth was visible to the naked eye. After biomass growth, the contents of the test tubes were dispersed using manual agitation and a volume of approximately 1 mL was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks with 150 mL of culture medium to increase biomass volume. A daily manual agitation was done in order to resuspend the cultures.

4.2.4 Extraction and quantification of genomic material

The genomic material used in the molecular detection analyses was obtained using the modified CTAB 2% method (Doyle & Doyle, 1987), with polyvinylpyrrolidone (PVP-8000) being used as co-adjuvant (Bipin *et al*, 2014). An amount of cyanobacteria culture (1,0 mL) was added to a 1.5 mL Eppendorf tube and centrifuged twice for 5 minutes at 4,000 rpm to separate the culture medium from the cell mass. After removing the supernatant, 800 μ l of a lysis buffer containing 2% CTAB, 100 mM Tris-

HCl, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.2 % B-mercaptoethanol and 0.5-1.0 % PVP, was added to the tubes. The tubes were vortexed to homogenize the mixture and transferred to a dry bath being kept for 60 min. at a temperature of 65 °C. During heating time, the tubes were agitated using a vortex to optimize the contact between the lysis buffer and the culture cells.

After heating, the tubes were cooled to room temperature and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min. At the end of centrifugation, 800 µL of a mixture of chloroform and isoamyl alcohol (24:1) was added to the tube, which was shaken for 1 min. and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes. After centrifugation, the inorganic phase was transferred to a new tube, with the addition of 500 µL of ice-cold isopropanol, followed by gentle agitation. The tubes were kept refrigerated for a period of 3 h and centrifuged at 10,000 rpm for 13 minutes. The supernatant was removed, and the formed pellet washed gently with cold ethanol. After further centrifugation at 10,000 rpm for 3 min. and removal of the supernatant, the pellet was washed with 80 % ethanol and centrifuged again. After centrifugation, the supernatant was removed. The tubes were left open for solvent evaporation at room temperature. After removal of the solvent, the tubes were filled with 100 µL of ultrapure water to resuspend the DNA pellet.

The product of the extraction process was submitted to evaluation using an electrophoresis apparatus with a 1.5 % agarose gel to verify the presence of degradation residues. A sample of 3.0 µL of the resuspended DNA was mixed with 1 µL of GelRed® Dye and 1µL of loading dye. The mix was added in the electrophoresis gel well and the run was done during 30 minutes. with 80V.

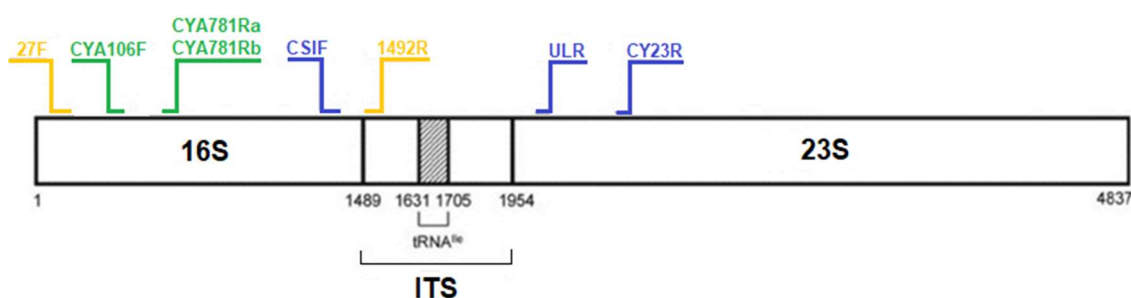
A NanoDrop® ultraviolet spectrophotometer (Thermo Scientific) was used to verify the quality of the extracted material by analyzing the 260/280 and 260/230 ratios to check for the presence of protein and carbohydrate contaminations in the obtained sample. A 1.0 µL of resuspended DNA was sampled with a pipette and used for measurements. This same equipment was applied to quantify DNA for standardization using ultrapure water.

4.2.5 Morphological and molecular identification of cyanobacteria isolated from the microbial mats

All the isolated strains were morphologically evaluated for complete taxonomy identification. The process involved the set up of microscope slides for each of the isolated microorganisms and the use of an optical microscope, with a 40X magnification objective. The MicroCapture® software was used to take pictures of the slides content and measure the cell dimensions. To identify isolated microorganisms in unialgal cultures, a classification system of Cyanophytes was followed (Komarek and Anagnostidis, 1999), considering only microorganisms of the Chroococcales order since all isolated microorganismos belong to this order.

The molecular identification of the microorganisms isolated from the microbial mats was performed using specific primers for amplification of the 16S rRNA region. For amplification of the 16S rRNA coding genes, two pairs of primers were used. The 27F/1492R primer sequences were developed to amplify this region of the genome of bacteria in general (Lane, 1991). The primers Cya106F/781R(a/b) were designed specifically for amplification of this region in cyanobacteria, for greater specificity in amplification (Figure 30 - Nubel *et al.*, 1997). The Figure 30 shows the coverage of those primers in the specific region of DNA containing 16S rRNA amplified regions.

Figura 30: Regions amplified by the primer pair Cya106F/781R. The pair of primers set 27F/1492R was evaluated in this study but due to the non axenic nature of cultures the sequences had low quality values. (Modified from Nubel *et al.*, 1997).



For Cya106F/781R(a/b) primers amplification the PCR reactions was set using a 0.2 mL microtube. In a microtube, 11.1 µL of ultrapure water, 12.5 µL of GoTaq Green Master Mix PROMEGA, 1.0 µL of template, 0.2 µL of each of the primer were added. After mixing, the tubes were placed in a 96-well Veriti thermal cycler from Applied Biosystems. The PCR equipment was programmed to perform 1 denaturation cycle of 5 minute, followed by 30 cycles of 30 sec. at denaturation, 30 seconds. at annealing, and 2 minutes at extension, with temperatures of 95 °C, 54 °C, and 72 °C respectively.

At the end of the cycle a 10 min, an extension step at 72 °C completed the PCR process.

To verify the presence of amplicons in the PCR reacted samples with all sets of primers, a 2.5% agarose gel electrophoresis was performed in the TBE buffer. A 2 µL aliquot of the PCR-reacted sample was mixed with 1 µL of GelRed fluorescent dye. To perform the electrophoretic run, a 20 cm long tank was used in conjunction with a power supply set to apply 80V for 30 minutes. After the run, the gel was developed using a transilluminator with a UV lamp. The images were registered using the software of the transilluminator.

The samples that presented production of amplicons were conducted to the purification process for subsequent sequencing. With the use of a 20% polyethylene glycol salt solution, the reacted material was purified to separate the reaction residues (reference). After purification, the purified product was evaluated using a spectrophotometer to verify the quality of the PCR product. With the use of the same equipment, the DNA was quantified for subsequent standardization and sequencing. The samples were sequenced using a Sanger sequencing with extended mode at the Carlos Chagas Brazilian Center of Physics Research.

4.2.6 Phylogenetic analysis

The files with sequenced data from 16S rRNA genes were treated to remove low-quality reads using Unipro E-Gene software (Okonechnikov *et al.*, 2012) and the treated sequences were aligned. A consensus sequence was assembled. The consensus sequences of all isolates were multiple aligned with sequences from other microorganisms retrieved from the NCBI database (Table 6) for phylogenetic analysis using the software MEGA 11. The sequences were selected based on the similarity, coverage value and e-value from BLAST.

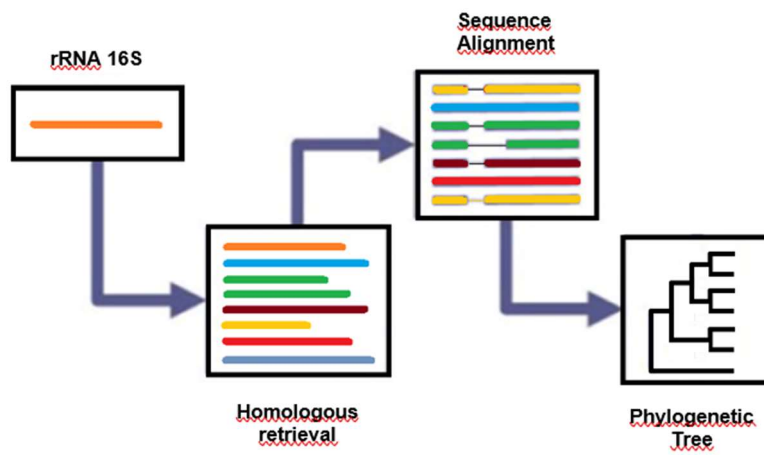
ORGANISM	GenBank ACCESSION NUMBER
<i>Gloeotheca</i> sp KO68DGA	AB067580.1
<i>Aphanothece sacrum</i>	AB094350.1:2-323
<i>Synechococcus</i> sp HOG	AF448075.1
<i>Cyanothece</i> sp strain PCC 7418	AJ000708.1

<i>Aphanothece</i> sp strain ATCC 43922	AJ000721.1
<i>Aphanothece nidulans</i> strain KCTC AG10041	AY121353.1:2-647
<i>Aphanothece naegelii</i> strain KCTC AG10042	AY121354.1:2-647
<i>Synechococcus</i> sp BE0807F	FJ763770.1
<i>Aphanothece stagnina</i> strain H5	FR848374.1:1-427
<i>Aphanothece microscopica</i> CCY 153	FR873836.1
<i>Aphanothece microscopica</i> CCY 153	FR873836.1:13-366
<i>Aphanothece cf. salina</i> LEGE 06149	HQ832898.1:6-365
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	NR_074309.1
<i>Microcystis aeruginosa</i> strain NIES-843 16S	NR_074314.1
<i>Halothece</i> sp PCC 7418 strain PCC 7418 16S	NR_102451.1
<i>Synechococcus rubescens</i> strain SAG 3.81 16S	NR_125481.1
<i>Synechococcus moorigangaii</i>	NR_177752.1
<i>Euhalothece</i> sp. 16S rRNA gene, strain MPI 95AH13	AJ000710.1
<i>Euhalothece</i> sp. 16S rRNA gene, strain MPI 96N304	AJ000713.1
<i>Euhalothece</i> sp. 16S rRNA gene, strain MPI 95AH11	AJ000717.1
<i>Euhalothece</i> sp. 16S rRNA gene, strain MPI 96P402	AJ000722

Table 6: Cyanobacterial 16S rRNA gene sequences used for the phylogenetic analyses.

The multiple alignment was used to construct a phylogenetic tree using the Jukes-Cantor model. Bootstrap resampling was set to 1000. One phylogenetic tree for 16S were assembled. The Figure 31 shows the sequence applied for data analysis and phylogenetic inference.

Figure 31: Structure of the phylogenetic analysis applied in this work to identify the isolated cyanobacteria samples.



4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 General aspect of the organisms from microbial mats

The sampling of biological material in the crystallizer tanks was carried out during the rainy season. During the collection, measurements with a densimeter indicated a salinity of 11.5 Baumé, a value much lower than the maximum of up to 24 Baumé observed for these tanks.

Under microscopy, the orange and gelatinous-looking material obtained from the surface layer of the microbial mats contained a variety of microorganisms, such as cyanobacteria, diatoms and ciliates.

Multiple organisms were isolated from the material sampled from the surface of the microbial mats. Although some crystallizer ponds present floating blocks of biomass, the collection and separation of the material adhered to the surface of the mats in areas with greater layer thickness was chosen. The choice of mats with thicker layers was due to the greater ease of visual separation of the different layers.

4.3.2 Isolation and culturing

The direct cell sorting process has been adopted in favor of other methodologies, such as solid media plating, due to its simplicity of execution and practicality. Since some cells do not produce colonies on solid media with the same efficiency as they do in liquid media (Thiel *et al.*, 1989), it appears as a good choice to isolate unknown cyanobacteria strains. The isolation resulted in a total of 12 strains of colonial benthic cyanobacteria, surrounded by a mucilaginous matrix. Only 6 strains exhibited significant growth in the first month of cultivation, comprising 5 isolates from *Aphanotece halophytica* and 1 isolate identified as *Synechococcus* sp. (Table 7).

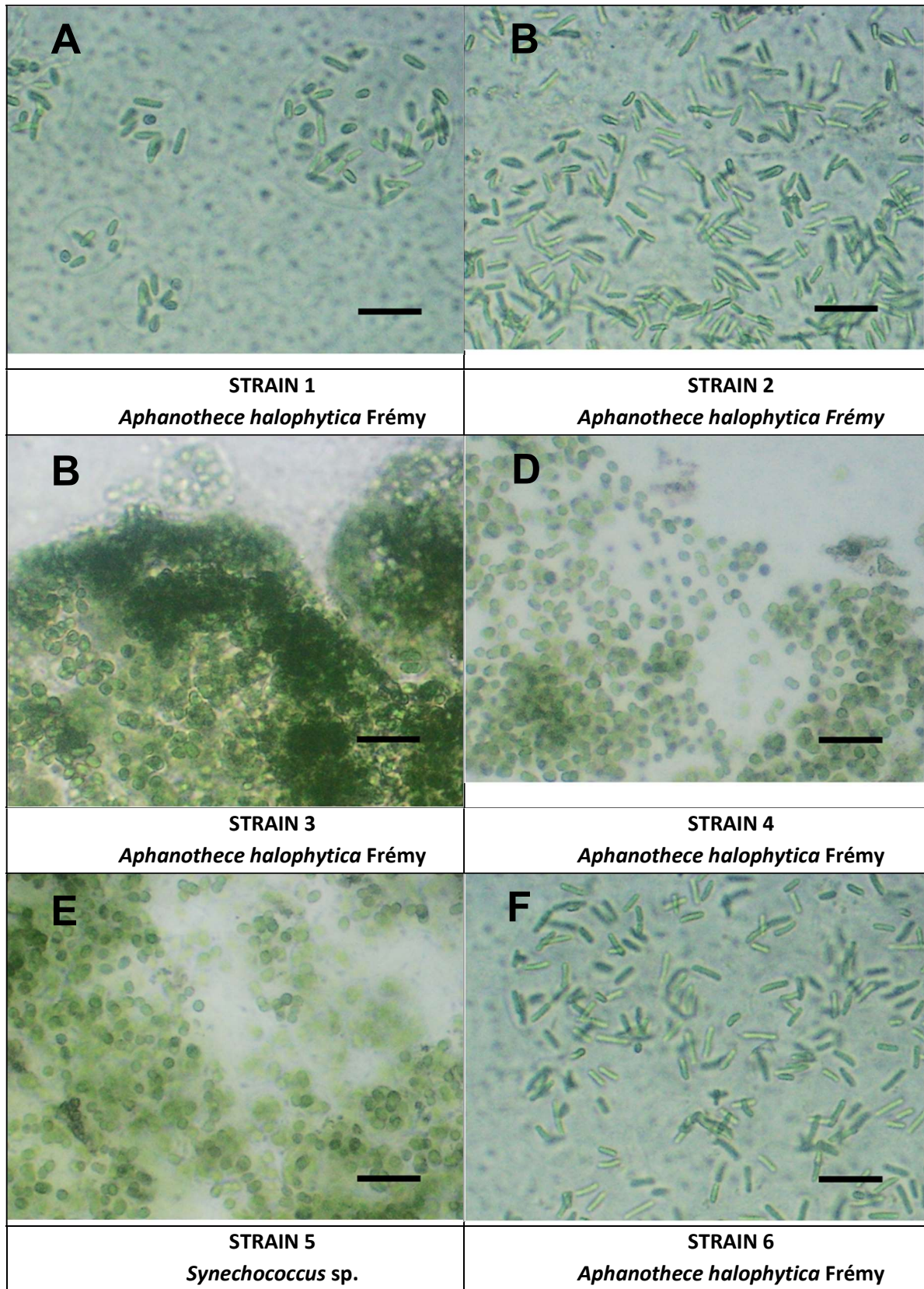


Table 7: Strain isolated from microbial mat. (Scale bar: 20µm)

The table below summarizes general morphological aspects of each strain.

Microorganism	Cell morphology	Mucilage	Cell size (\emptyset or length x width; μ m)	Figures
Strain 1	<i>Bacillus</i> , green/pale green	Present. Hyaline, non lamelated	$7 \pm 1 \times 3 \pm 1$	34 A
Strain 2	<i>Bacillus</i> , green/pale green	Present. Hyaline, non lamelated	$10 \pm 2 \times 2 \pm 1$	34 B
Strain 3	Round and slightly enlogates, green/pale green	Present. Hyaline, non lamelated	5 ± 1	34 C
Strain 4	Round and slightly enlogates, green/pale green	Present. Hyaline, non lamelated	6 ± 2	34 D
Strain 5	Round cells, olive green/blue	Not detectable	6 ± 2	34 E
Strain 6	<i>Bacillus</i> , green/pale green	Present. Hyaline, non lamelated	$11 \pm 2 \times 3 \pm 1$	34 F

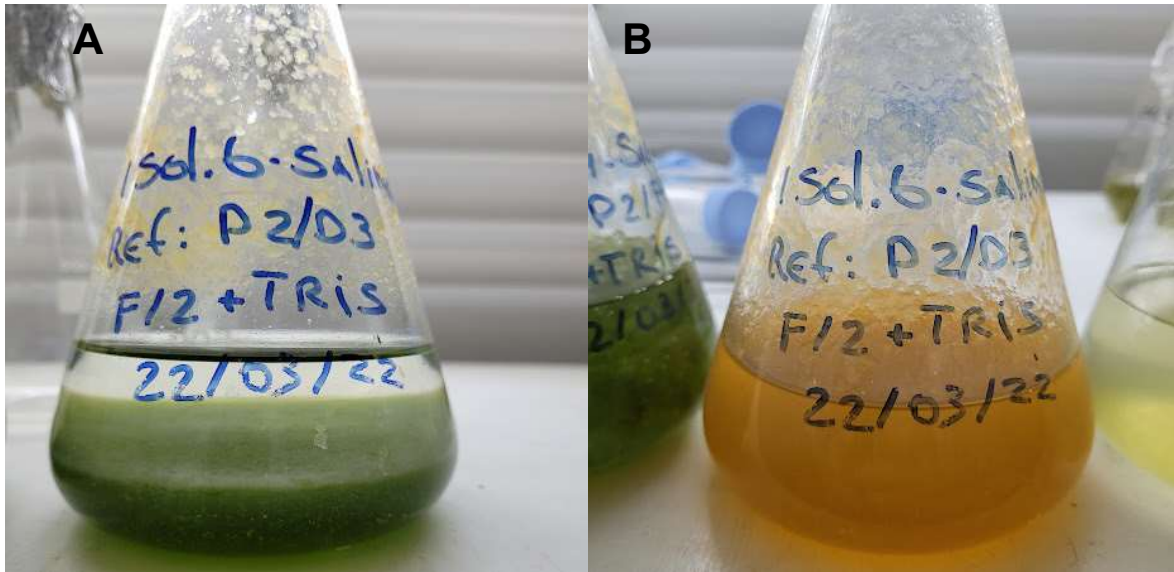
b : Mean \pm standard deviation (n=20)

Table 8: Summary of morphological and phenotypical aspects of isolates.

The thick mucilaginous matrix of extracellular polysaccharides (EPS), characteristic of the sampled material, was produced in small amounts by the isolated microorganisms during cultivation. The colonies formed were scattered and exhibited diameters between 1 mm to 3 mm. Environmental factors are associated with extracellular production of EPS in cyanobacterial cultures, but experimental evidence has associated it with high salt content (Javor, 2002), and phase of the culture (stationary or declining), probably due to phosphate limitation (Strycek *et al.*, 1992), which may have happened in our study, but we did not measure the levels of these elements to make any statement in this direction.

The orange color, characteristic of the biological material during sampling, changed to a dark green color for the vast majority of the isolated cyanobacterial culture. This change presumably indicates replacement in the production of carotenoid pigments by chlorophyll and phycobilins, as previously observed (Jaiswal *et al.*, 2018). During the stationary and declining phase of the cultures, the change of color to orange appears to indicate the reversion of this process. The Figure 32 shows a culture in exponential phase and declining phase with a 6 month spam.

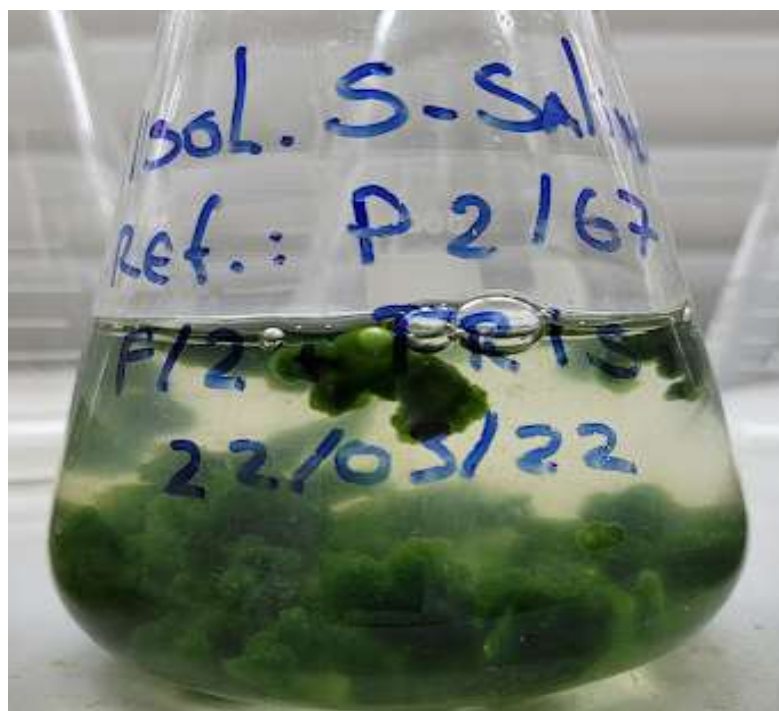
Figure 32: Culture of isolate 6 (*Aphanothece halophytica*) with 6 months of difference. A. Stationary phase. B. Declining phase.



The phenomena of suspension of cyanobacteria isolated from such samples was observed during abrupt variations of temperature and lighting. We suppose that This behavior may be related to the formation of blooms of cyanobacteria in these communities.

The culture related to strain 5 did not show visible production of exopolysaccharides like observed in the other cultures (Figure 33).

Figure 33: Culture of isolate 5.

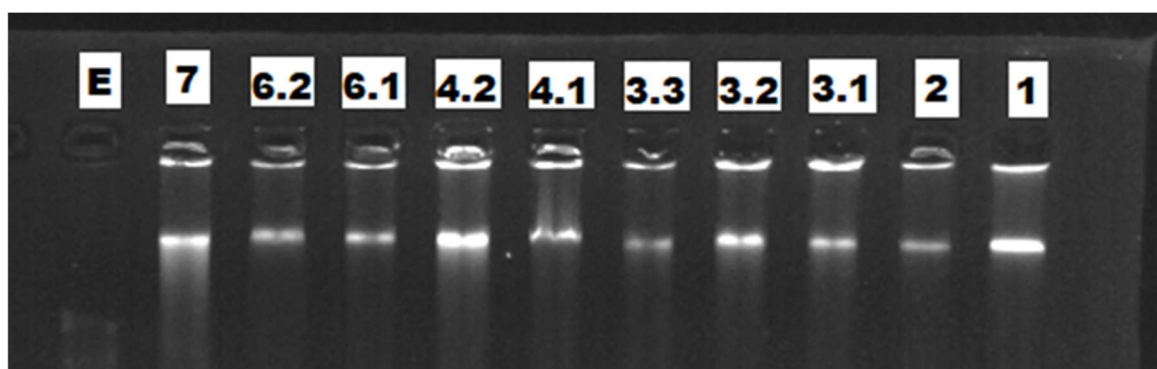


The EPS produced by cyanobacteria can be observed adhered to the walls of the Erlenmeyer flasks as shown in Figure 32, while not present in the culture flask of Figure 33.

4.3.3 Extraction, quality check and quantification of genomic material

The degradation of extracted genomic material from cyanobacteria in hypersaline environments is known to be accelerated by the presence of phenolic compounds (Bhardawaj *et al.*, 2019). To obtain good quality genetic material, we used polyvinylpyrrolidone (PVP) in our study. PVP forms complexes with the molecules of the phenolic compounds through hydrogen bridges, thus protecting the genomic material from degradation (Heikrujam *et al.*, 2020). However, we observed that high levels of PVP, between 1.5 to 2.0 %, resulted in gel formation, which hindered the extraction of DNA. This occurrence is probably related to abundance of exopolysaccharides in the mucilaginous matrix of the cyanobacterial colonies. Therefore, we limited the proportion of PVP to 1.0% for the extraction of genomic material from all cyanobacteria. The electrophoresis allowed the previous evaluation of the extraction results, presenting good quality genomic material (Figure 34).

Figure 34: Genomic DNA from cyanobacteria isolated from microbial mats. Despite some degradation observed, the general good quality of the extracted material allowed genetic analyses. Strain 5 extracted DNA was done separately. Strain 7 is a positive control of *Spirulina subsalsa* used for quality checking purposes. (E=Reference ladder. 1 to 7 are isolates. 3.1, 3.2, 3.2, 4.1, 4.2, 6.1 e 6.2 are extraction replicas.)



The quality of extracted genomic material evaluated the UV absorption at 260/280 and 260/230. Values 1.63 and 1.89 at 260/280 and 1.81 and 2.03 at 260/230, in

conjunction with electrophoresis data, showed that CTAB protocol with the use of PVP in the range of 0.5%-1% produced good results for DNA extraction.

4.3.4 Morphological and molecular identification of cyanobacteria from microbial mats

The microorganisms isolated from the microbial mats were identified as representatives of two genera and three species, based on the colonial characteristic, mucilage appearance and cell morphology, in addition to dimensions, cell division plane and cell content (granularities).

The microorganisms of the strains 1, 2, 3, 4 e 6 were identified as belonging to the species *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933, order Chroococcales, family Synechococcaceae, sub-family Aphanothecoideae. Under cultivation conditions, individuals of this species showed the formation of colonies with multiple, green and olive-green colored cells surrounded by mucilaginous, hyaline and non-laminated mucilage. *Aphanothece halophytica* is known to present celular polymorphism (Dor and Hornoff., 1985). The morphological differences observed for strains 3 and 4 may be understood based on this knowledge.

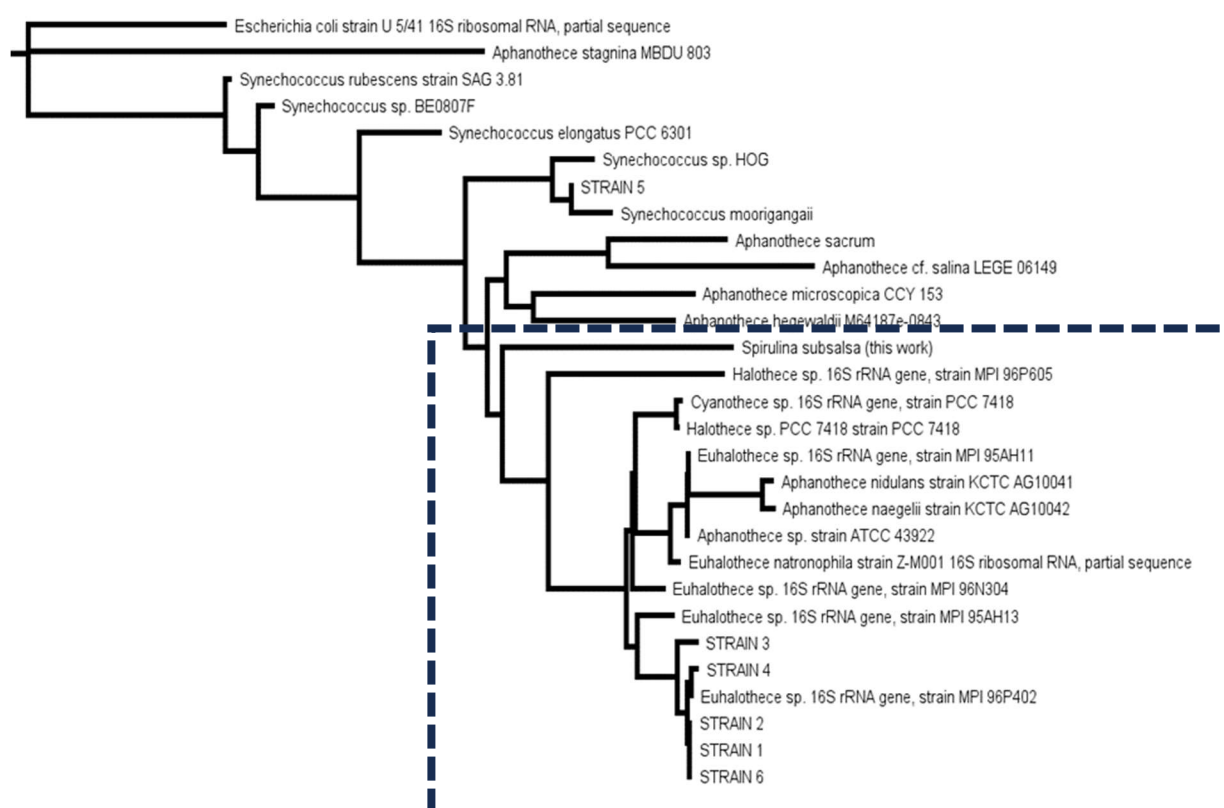
The application of the primers for amplification of the 16S rRNA region, reinforced the taxonomic classification of cyanobacteria isolated at the species level. A polyphasic approach to identification, including sequencing of ITS and functional genes, may help to compose a better description of a given species (Komárek, 2016). However, the use of taxonomic keys for the identification of microorganisms remains necessary as a useful tool of classical taxonomy for identifying genera of cyanobacteria (Komárek, 2016).

Based on the quality of the sequences of rRNA 16S obtained in our study, we can state that the pair of primers *Cya106F/781R(a/b)* was a robust method for molecular identification of the cyanobacterial strains. During this study we also applied the same methodology for 16S rRNA amplification and amplicon sequencing by the use of the universal pair of primers *27F/1492R* (Lane, 1991), with very low quality readings. This may be due to the non axenic nature of unialgal cultures obtained by micropipette.

4.3.5 Phylogenetic analysis

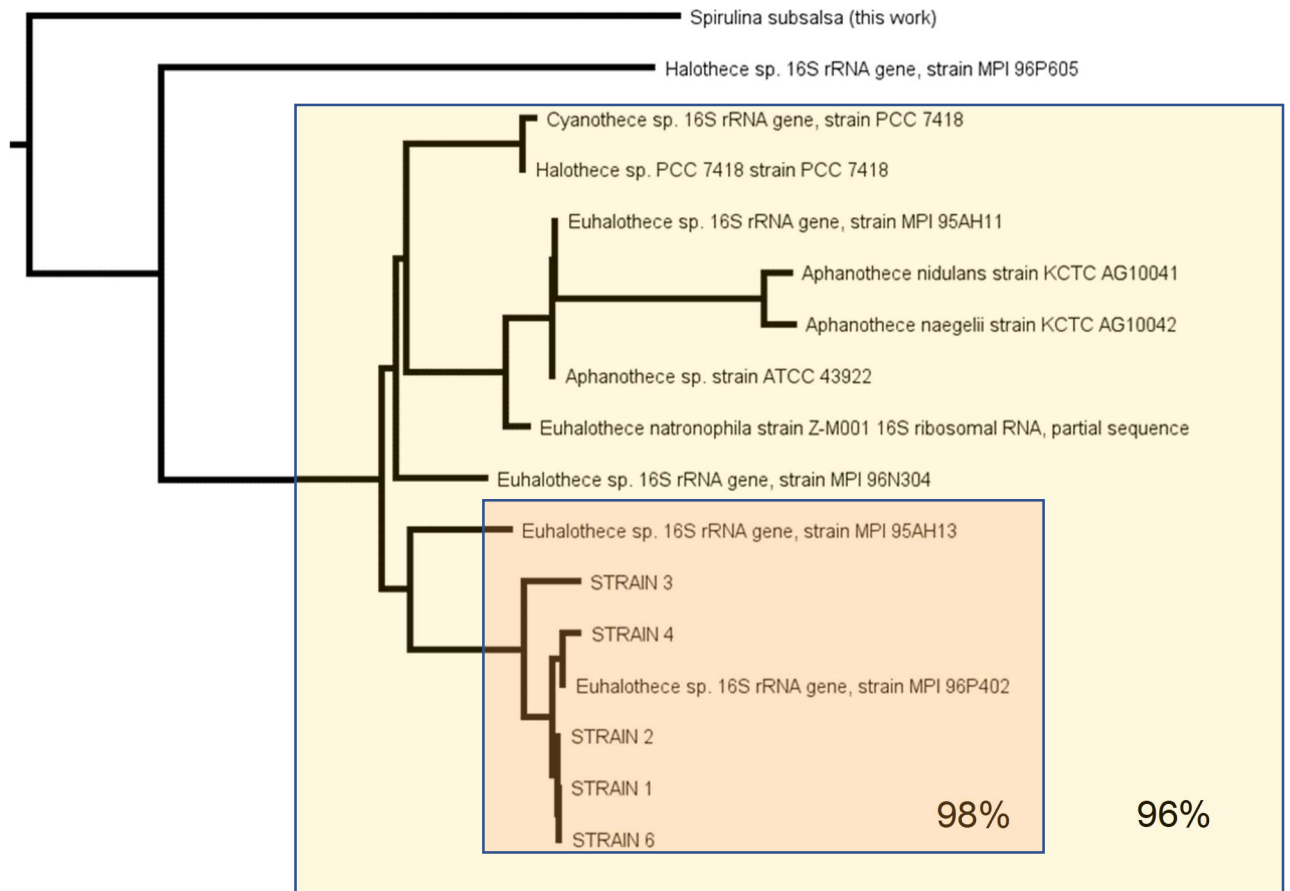
The result of the phylogenetic analysis is shown in Figure 35. The tree was built using the sequences retrieved as a reference from GenBank and the sequences obtained in this study.

Figure 35: Phylogenetic tree with microbial mat cyanobacteria (rRNA 16s). The clade related to the *A. halophytica* strains isolated in this study appear highlighted. The type strains ATCC 43922, PCC 7418 are ***Aphanothece halophytica*** strains.



According to the classification based on morphological traits, the strains 1, 2, 3, 4 and 6 presents highly degree of similarities. It's important to note that the Euhalothece strains, described by Garcia Pinchel and collaborators (1998), are grouped together, inside the extremely halotolerat cluster, that appear more clarified in the Figure 36, that shows part of the Figure 35.

Figure 36: Detail from figure 35. Extremely halotolerant cluster including the isolates from this study.



In the phylogenetic tree, the isolates 1 and 6 appear on the same branch, indicating a close degree of relatedness between these two strains. Morphologically, both cyanobacteria exhibit similar characteristics, such as size, width, shape, and cell content. Strain 2 is phylogenetically related to strains 1 and 6, sharing a common ancestor. Notably, the cyanobacteria observed in strain 1 exhibit smaller cell size compared to those of strains 2 and 6, while keep morphological similarities. Strain 3 and 4 shows distinct cell morphology and smaller size, but are molecularly related to strains 1, 2, and 6. As noted by Baeta Neves (1993), cyanobacteria from solar salterns present a high degree of plasticity what is in accordance with the distinct morphotype observations.

A clade may be identified based on a common ancestor for all isolates and the strains *Aphanothece* sp ATCC 43922 and *Cyanotheca* sp 16S rRNA gene, strain PCC 7418, type cultures of *Aphanothece halophytica*. The clade related to the strains of *Aphanothece halophytica* appear highlighted. The operational taxonomical unit (OTU) is equal to 96% while the group of isolates and appear with 16S rRNA gene identity:

98,7% as accepted threshold. Based on the molecular similarity and the morphological observations we can state that those isolates aren't identified as *Aphanothece halophytica* Fremy 1933 and may be molecularly identified as *Euhalothece* sp.

Strain 5 appears separately from the *Euhalothece* group, more closely related to microorganisms with sequences related to *Syneccococcus*. The culture of this cyanobacteria displays markedly different responses to cultivation, particularly related to the mucilage production. While the cultures of strain 1, 2, 3, 4 and 6 produce visible mucilage, strain 5 did not produce it at all.

According to our results, we might point out that isolation would be an essential route to a robust and reproducible investigation as the starting point of any bioprospecting study. However, since the isolation reduces the capacity to screening for a wide for wide variety of microorganisms, the research needs to be pointed toward the development of high throughput tools, joining molecular and morphological identification with molecular detection and genome mining (Sekurova *et al.*, 2019).

For the case of cyanobacteria from hypersaline environments, such as like the solar saltern microbial mats, the application of a simple method like CTAB improved with PVP used here contributes to scale the prospection work, while holding hold the costs low. The use of cyanobacteria specific primers allows the identification and avoid the need of laborious work toward the development of axenic cultures. However, the development of unialgal cultures, preferably monoclonal, appears to be a necessary strategy for the development of bioprospecting studies that aim to identify microorganisms able for industrial application.

The use of 16S rRNA solely is not sufficient to completely discriminate cyanobacteria in some cases. A more detailed study taking into account the comparison of other sequences like the internal transcribed spacer (ITS) and a functional gene like the phycocyanin operon (cpcBA-IGS) may help to clarify the proximity between our strains and *Euhalothece* strains used for comparison purposes in this work.

5 ARTICLE 2: BIOPROSPECTION OF MARINE AND HYPERSALINE CYANOBACTERIA FOR POLYHYDROXYALKANOATES PRODUCTION AND BIOPOLYMER CHARACTERIZATION

Abstract: Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable and biocompatible polymers synthesized by cyanobacteria and accumulated as granules in the cytoplasm of their cells. Mainly produced under adverse environmental conditions, the ability to generate biodegradable polymers from different carbon sources and store it as an energy reserve exhibits enormous interest to enable environmentally friendly products for a circular economy. In this study, a total of 17 marine cyanobacteria belonging to the genera *Euhalothece* (from microbial mats of crystallizers tanks), and *Arthrospira*, *Leptolyngbya*, *Synechococcus* and *Synechocistis* (from biological collections) were evaluated for their ability to produce PHA using molecular detection tools, fluorescence microscopy and gas chromatography coupled with mass spectrometry - CG-MS. Among all strains evaluated, only the species *Arthrospira platensis* exhibited the ability to produce PHB when induced with acetate as carbon source. The use of this technique, combined with fluorescence microscopy and gas chromatography allowed the accurate checking of the PHA producing capability of the studied cyanobacteria species.

Keywords: PHB; *Arthrospira platensis*; fluorescence microscopy, gas chromatography, primers.

5.1 INTRODUCTION

The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) estimate that the amount of plastics accumulating in rivers and oceans is about 139 Mt, and this volume discarded in the oceans will double by 2060, even if waste treatment measures are implemented (OECD, 2017). Because it has recalcitrant characteristics, their degradation times can exceed 2.500 years (Chamas *et al.*, 2020), which favors their bioaccumulation and biomagnification along food chains, particularly in the form known as microplastics (Miller *et al.*, 2020). Due to the global environmental impact caused by the use of plastics and its derivatives, the search for more environmentally compatible alternatives is necessary (OECD, 2017).

Detected in human blood (Leslie *et al.*, 2022) and placenta samples (Ragusa *et al.*, 2021), plastic materials also represent other risk to human health, particularly because of the associated chemical additives (Campanale *et al.*, 2020). The production of these materials contributes negatively to expanding the carbon footprint associated with human activities. Responsible for 3.4% of greenhouse gas emissions throughout its life cycle (OECD, 2017), the production of plastics requires large amounts of non-renewable raw materials. Current estimates indicate that by 2050, around 25% of annual oil and natural gas production will be used to produce plastics (OECD, 2017).

Unlike plastics, the biopolymers produced by various microorganisms are renewable raw materials and can be used on a large scale for different activities (Kaplan, 1998). Among the biopolymers, the polyhydroxyalkanoates (PHA) can be produced in a renewable way, with the use of microorganisms, including cyanobacteria (Koch e Forchhammer, 2021). Known as biopolyesters, this class of polymers presents similarity with non-biodegradable plastic materials, such as polypropylene (Gomez, *in do Nascimento*, 2017) being an option for the substitution of those materials.

Originally identified in bacteria (Lemoigne, 1926), polyhydroxyalkanoates (PHA) comprises one class of polymers which accumulate in cells as carbon storage and energy reserve material (Koch e Forchhammer, 2021). When subjected to adverse environmental conditions (= stress) and under the presence of excess carbon, producer organisms accumulate these polymeric materials in the form of granules known as carbonosomes dispersed in the cytoplasm (Koch e Forchhammer, 2021).

Produced by organisms from the three domains, *Archea*, *Bacteria* and *Eukarya*, the biotechnological production of these polymers employs bacteria from different genera and different carbon sources, including agricultural raw materials and agro-industrial waste (Sathya *et al.*, 2018).

Water-insoluble granules of carbonaceous material have been observed inside microorganisms since the late 19th century (Gomez *in Nascimento et al.*, 2018), but the chemical composition of these inclusions was only characterized in 1927 and identified as polyhydroxyalkanoates – PHA (Lenz and Marchessault, 2005). Despite being highly refringent and visible using phase contrast microscopy, PHA granules are easily confused with other cellular inclusions, such as polyphosphate and glycogen granules (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). The use of soluble dye, such as Sudan Black B, allows to mark such inclusions and facilitates the confirmation of their presence inside cells (Okuzumi *et al.*, 1994; Halami *et al.*, 2008). Currently, fluorescent dyes with high specificity for PHA identification, such as Nile Red, are currently used in the identification of these inclusions (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). The high specificity and high sensitivity of such dyes (Serafim *et al.*, 2002; Hupfer *et al.*, 2008) has allowed applications related to the rapid quantification of PHA in the biomass of producing microorganisms (Alves *et al.*, 2017) or the employment of flow cytometry for bioprospecting of PHA producers (Tyo *et al.*, 2006).

Other methods applied to the identification of PHA producers using microscopy require isolation, cultivation, and induction steps to accumulate these polymers inside the organisms (Koch e Fochhamer, 2021). This set of activities, besides being laborious, demands a larger amount of time and can also produce negative results (Solaiman *et al.*, 2005, Shamala *et al.*, 2003 and Sasidharam *et al.*, 2016). Seeking to overcome these difficulties, the bioprospecting of PHA has incorporated the molecular detection of potential producers (Montenegro *et al.*, 2017).

In the application of molecular detection, the gene encoding a protein of the biosynthetic metabolism pathway must be detected by means of PCR in the genomic material. In the case of PHA, the known biosynthesis routes allow the identification of a protein fragment necessary for the formation of the polymer, PhaC, a subcomponent of PHA synthase, a protein responsible for the coupling of polymer monomeric units to produce the polymer chain (Steinbuchel and Hein, 2001).

Several primer pairs have been developed for the detection of the PhaC gene related to the four types of known PHA synthase (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). The development of primer pairs uses conserved regions of reference sequences from different microorganisms to increase the likelihood of identifying microorganisms carrying a particular gene (Lima and Garcês, 2006). This process leads to primers containing degeneracies capable of expanding the possibility of primer annealing with sequences present in the DNA template. For example, a degenerate primer set was developed for application to bioprospecting of polyhydroxyalkanoates based on 218 microorganisms from different genera (Montenegro *et al.*, 2017). Similarly, to identify the prevalence of genes encoding the enzyme pHA synthase in cyanobacteria, it was developed suitable primers for the detection of PHA producers (Hai *et al.*, 2001). In addition, a set of specific oligonucleotides was developed to identify cyanobacteria producers of the genus *Synechocistis* using Colony PCR (Lane and Benton, 2015).

Although molecular detection is highly sensitive for the detection of PHA producers, the confirmation of producer organisms requires the induction of the polymer accumulation and its further detection (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). Gas chromatography techniques allow rapid identification of the monomeric composition of PHA, as well as the quantification of each of the monomers, allowing for a greater understanding of the structure of the polymer produced (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). The application of this technique requires a derivatization reaction, comprising the hydrolysis and transesterification of the polymer in acid or alkaline media to produce volatile compounds that can be separated using the chromatographic methods (Braunegg *et al.*, 1978). Once derivatized, the esters related to the polymer monomers can be identified and quantified by gas chromatography equipment (Braunegg *et al.*, 1978). Also, different strategies can also be employed for derivatization, including alkaline or acid transesterification or a sequential treatment involving alkaline hydrolysis followed by acid transesterification for improved quantification (Cui *et al.*, 2007).

The use of gas chromatography with a flame ionization detector (FID) allows for a highly sensitive analysis to detect the presence of PHA (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015), since low amounts in the range of 10 µg/L of this chemical can be detected by this technique (Braunegg *et al.*, 1978). However, a disadvantage of this

technique is the need for standards, to enable the comparison of retention times associated with chromatographic peaks, and those identified in the samples (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015).

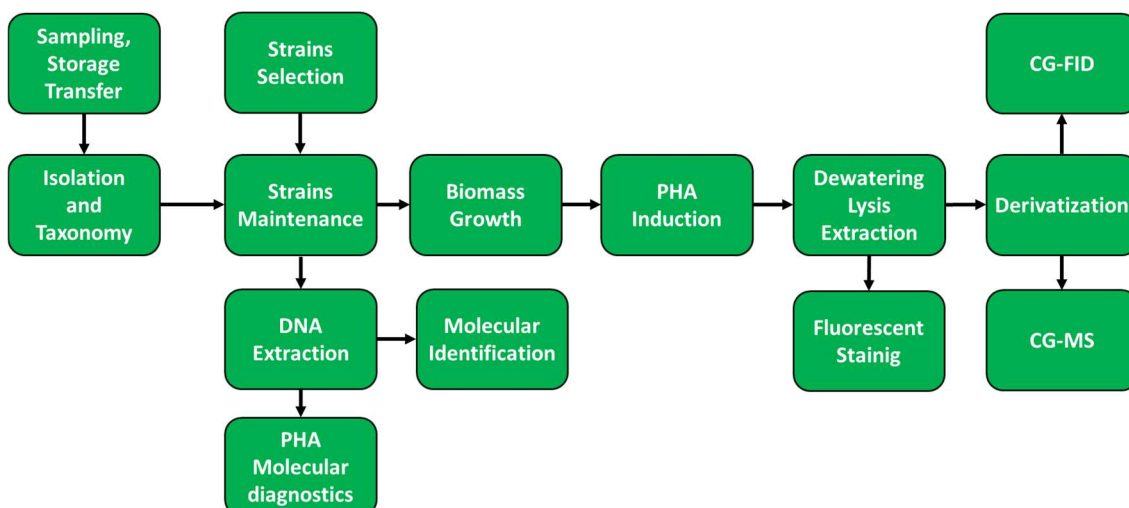
Although the polymer derivatization steps are still necessary, gas chromatography coupled to mass spectrometry allows the identification of the components without the need for standards (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). This technique brings a significant advantage when the monomeric composition of the polymer to be evaluated is not known *a priori*. The disadvantage of using this analytical technique is the lower sensitivity for detection of small amounts of PHA which is the reality of most of the cases in which this polymer is recovered from the selected producing strains (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015).

As different species and strains of microorganisms accumulate PHA under different conditions and present various productivities (Tan *et al.*, 2014), it is relevant to prospect PHA-producers for new application opportunities (Montenegro *et al.*, 2017). Several strategies have been employed for the bioprospection of PHA producers, involving from the use of tools to molecular detection and mass spectrometry (Koller and Rodriguez-Contreras, 2015). The purpose of the present study was to use different methods to bioprospect for PHA producers in marine cyanobacteria species from salt crystallization ponds and strains from biological collections.

5.2 MATERIAL AND METHODS

The research strategy used in this study involved employing a multidisciplinary approach to optimize the probability of identifying PHA-producers within the selected groups of marine cyanobacteria, according to the workflow represented in Figure 37.

Figure 37: Workflow for bioprospection of PHA-producing marine cyanobacteria.



5.2.1 Collection and isolation of cyanobacteria from microbial mats

Marine cyanobacteria species were obtained from microbial mats sampled from the bottom of the crystallizer tanks, in Sal Cisne® company solar salterns, located in the region of Cabo Frio, Rio de Janeiro (22°56'57 S e 42°04'19 W), Southeast Brazil. This location was chosen to obtain microorganisms adapted to survive under more severe environmental conditions of salinity, temperature and solar radiation. Figure 38 shows the salt salterns structure with an indication of the brine flow and salinity growth. The crystallizer tanks are the last ones before sodium chloride crystallization.

Figure 38: Sal Cisne® Solar saltern at Cabo Frio, Rio de Janeiro, Southeast Brazil. The microbial mat (brown color of the crystallizers) was sampled from the bottom of crystallizer tanks (red square). The blue arrow indicates the flow of water through salt crystallization ponds. The ponds highlighted in red are the ones subjected to sampling.



After collection, the sampled biological material was acclimated to cultivation conditions using Guillard F/2 culture medium without silicon, with seawater of salinity 35. The isolation of microorganisms found in the microbial mats was carried out using the technique of sequential dilution and manual separation of cells, and monitoring using an inverted microscope and Pasteur pipettes (Lourenço, 2008).

5.2.2 Cyanobacteria from biological collections

To expand the number of cyanobacteria to be evaluated as potential PHA-producers, additional species were obtained from Brazilian biological collections, comprising a total of 17 strains of the genera *Arthrospira*, *Leptolingbia*, *Synechococcus* and *Synechocistis*. Some assumptions were applied for a selection of the species, in order to maximize the possibility of identifying PHA producers and future viability for biotechnological uses (Wang *et al*, 2014), such as: being cultivable in seawater; being scientifically recognized as PHA producers and possessing larger cell size, filament or colony from the available microorganisms in order to enable easy harvesting. Based on those definitions, a total of 5 different taxa were selected from biological collections (Table 9).

STRAIN	TAXON	BIOLOGICAL COLLECTION
-	<i>Spirulina subsalsa</i>	Elisabete Aidar - Federal Fluminense University
-	<i>Synechocistis pevaleki</i>	
BMAK-158	<i>Spirulina major</i>	Aidar e Kushner - University of São Paulo
BMAK-159	<i>Arthospira platensis</i>	
BMAK-163	<i>Synechococcus</i> sp.	

Table 9: Cyanobacterial strains chosen for the bioprospecting study.

In addition, 6 other strains of marine cyanobacteria were obtained from the biological collection of microorganisms of the Federal University of Rio de Janeiro (Table 10) to be tested as PHA producers.

STRAIN	TAXON	SOURCE
CCMR-0169	<i>Euryhalinema</i> sp.	Biological Collection of Microorganisms of the Federal University of Rio de Janeiro
CCMR-0170	<i>Euryhalinema</i> sp.	
CCMR-0171	<i>Euryhalinema</i> sp.	
CCMR-0280	<i>Acrophormium turfae</i>	
CCMR-0285	<i>A. turfae</i>	
CCMR-0287	<i>A. turfae</i>	

Table 10: Cyanobacteria strains from the Brazilian biological collections to carry out the bioprospecting work.

All strains from biological collections were placed onto silicon-free Guillard F/2 culture medium (supplementary information) and kept under 12/12 h photoperiod, in a temperature-controlled room at 20°C.

5.2.3 DNA extraction and quantification

To obtain the biomass necessary for the extraction of genomic material, microscopy analyses, and inoculation of cultures for PHA induction, the cyanobacterial strains obtained initially were cultured in 500 mL Erlenmeyer filled with 250 mL of seawater of salinity 35, enriched with solutions of the Guillard F/2 culture medium and maintained under these conditions for 20 days.

The genomic material used in the molecular detection analyses was obtained using the modified CTAB 2% based method (Doyle & Doyle, 1987), with polyvinylpyrrolidone as co-adjuvant to promote the precipitation of the extracted genetic material. The product of the extraction process was submitted to

electrophoresis in a 2.0 % agarose gel with the use of GelRed® dye to verify the presence of degradation residues.

A NanoDrop® ultraviolet spectrophotometer (Thermo Scientific) was used to verify the quality of the extracted material by analyzing the 260/280 and 260/230 ratios in order to check for the presence of protein and carbohydrate contaminations in the obtained sample. Also, with the use of this equipment, the DNA was quantified for subsequent standardization in concentration.

5.2.4 Morphological and molecular identification of cyanobacteria isolated from the microbial mats

All the isolated cyanobacteria strains were morphologically evaluated using an optical microscope model Zeiss, with 40X magnification objective and a software to measure the cell dimensions.

The molecular identification of the microorganisms was performed using a pair of primers (Cya106F/Cya781Rab) for the amplification of the 16S rRNA gene, developed for cyanobacteria identification. (see Núbel *et al*). The PCR reaction was carried out using a Veriti thermocycler model 9901 (Life Technologies), with 96 well. The quality of the PCR products was evaluated using 2.5% agarose gel electrophoresis. The PCR products were purified using a 20% polyethylene glycol saline solution (2.5M NaCl) protocol for PCR products purification (Arbeli e Fuentes, 2007). All purified PCR products were quantified using a Nanodrop® UV spectrophotometer and diluted for Sanger sequencing.

The sequenced files were treated to remove low-quality reads using Unipro E-Gene software (Okonechnikov *et al.*, 2012) The resulting sequences were then aligned, and a consensus was assembled. All the consensus sequences were aligned with sequences from other microorganisms retrieved from the NCBI database. The set of aligned sequences was used to construct a phylogenetic tree using the Neighbour-Joining algorithm.

5.2.5 Molecular detection of the *phaC* gene

For the application of molecular detection of microorganisms possessing the *phaC* gene, primer pairs developed for the detection of this gene by PCR were selected from the literature (Montenegro *et al.*, 2017; Lane and Benton, 2015, Hai *et al.*, 2001). The Table 11 presents the primers used in this study and their annealing temperature (T_m).

OLIGONUCLEOTIDES FOR MOLECULAR IDENTIFICATION OF PHA PRODUCERS			
Identification	Nucleotide sequence (5'-3')	T_m (C)	Reference
<i>phaCF1</i>	TGATSSAGCTGATCCAGTAC	53.9°	Montenegro <i>et al.</i> , 2017
<i>phaCF3</i>	CCGCCSTGGATCAACAAGT	58.0°	
<i>phaCR1</i>	GTGCCGCCGAYGCAGTAGCC	65.1°	
<i>phaC(3.1)F</i>	GGGATGTCTATTTGATTGAYTGG	52.5	Lane e Benton ,2015
<i>phaC(3.1)R</i>	GGTCGGGACTATCAAAAATCCA	54.7	
<i>Haphapcr1</i>	GTTTTAATCGATTACGCNYTNGTNAAYMGNCNT AYATG		Hai <i>et al.</i> , 2001
<i>Haphapcr2</i>	CGGGACTATRAADATCCAYTTYCCATNCKTAGAA AGTT		

Table 11: Primers used for molecular detection of PHA producers. The primers *phaCF1/phaCF3* and *phaCR1* were selected based on their capacity to amplify most of the sequences used in the design (Montenegro *et al.*, 2017).

In a 2 mL Eppendorf tube, 11.1 μ L of ultrapure water, 12.5 μ L of GoTaq Green Master Mix PROMEGA, 1.0 μ L of template, 0.2 μ L of each of the primer were added. After mixing, the tubes were placed in a 96-well Veriti thermal cycler from Applied Biosystems. The PCR equipment was programmed to perform 1 denaturation cycle of 1 minute and followed by 32 cycles of 45 seconds at denaturation, annealing, and extension temperatures of 95 °C, 58 °C, and 72 °C respectively. At the end of the cycle of 7 minutes, an extension step at 72 °C completed the PCR process.

To verify the presence of amplicons in the reacted samples, a 2.5% agarose gel electrophoresis was performed in the TBE buffer. A 2.0 μ L aliquot of the PCR-reacted sample was mixed with 1.0 μ L of GelRed® fluorescent dye. To perform the electrophoretic run, a 20 cm tank was used in conjunction with a power supply set to apply 80 V for 30 min. After the run, the gel was developed using a transilluminator

equipped with a UV lamp. The images were registered using the specific software of the transilluminator.

The *phaC* amplicons were selected for the purification process for subsequent Sanger sequencing. With the use of a 20% polyethylene glycol salt solution, the reacted material was purified to separate the reaction residues. After purification, the product was evaluated using a spectrophotometer to verify the quality of the PCR. With the use of the same equipment, the DNA was quantified for subsequent standardization and sequencing. The samples were sequenced in a Sanger sequencer using extended sequencing.

The sequenced files were treated to remove low-quality reads using E-Gene software. The resulting sequences were then aligned, and a consensus was extracted. The nucleotide consensus sequence was translated to a protein sequence. Multiple sequences of the target protein (PhaC) from different organisms were retrieved from NCBI databank for comparison (Supplementary Material). The BMAK 0159 PhaC protein was alignment with the multiple sequences using MEGA 11 software and a phylogenetic tree was built using the Neighbour-Joining algorithm to verify the relation between the protein identified and the ones from other cyanobacteria.

To check for similar sequences, a search was performed using the BLASTp tool in the NCBI database. To compare the sequenced data and the ones retrieved from the NCBI database, they sequences were aligned, allowing the construction of a phylogenetic tree using a Neighbor-Joining algorithm. The sequences selected for comparison were retrieved based on its similarity with sequenced data.

5.2.6 Fluorescence microscopy

The presence of PHA granules inside cells was verified using fluorescence microscopy with Nile Red staining (Spiekerman *et al*, 1999). A volume of 1.5 mL of each of the cyanobacterial cultures, collected after the induction phase, was sampled to verify the presence of PHA granules inside their cells. A solution of Nile Red was prepared by dissolving this dye in the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO). A volume of 100 μ L of the dye solution was added to each culture tube, and the tubes were homogeneized during 15 seconds to enable the mixture. The tubes with the mixture of culture and dye solution were heated for 5 minutes in a dry bath at 45 °C.

After heating, each tube had a 10.0 μL aliquot sampled and this volume was used to assemble a microscope slide. The samples were evaluated using an inverted microscope Olympus model U-TBI-190 coupled with an ultraviolet (UV) lamp. For fluorescence, a FITC model filter was used with an excitation wavelength of 491 nm and emission of 516 nm. The slides were observed using 50% of the nominal power of the UV source and with 40X magnification objective. The presence of PHA granules was verified based on the existence of grains with yellow emission inside the cytoplasm (Ostle *et al.*, 1982).

5.2.7 Cultivation and induction of PHA production

To obtain an adequate biomass for the PHA production evaluation and polymer characterization, an experimental setup was elaborated for those cyanobacteria that presented positive results of polymer production based on the molecular screening and fluorescence microscopy.

The strain BMAK 0159 *Spirulina platensis* was cultivated for biomass increase and induction of PHA production. Four 2,000 mL Erlenmeyer flasks were filled with 1.500 mL of sterilized seawater of salinity 35 and enriched with the F/2 Guillard culture medium solutions without the addition of silicon. The pH was adjusted and maintained at 8 by using tris-hydroxymethylaminomethane (TRIS) organic buffer. The first flask was defined as control and received no organic carbon supplementation, while the treatment flasks received 0.04% (by mass) sodium acetate. The use of acetate for the induction allowed the accumulation of PHA by the PHB-producing strain. However, an optimization of factors for the induction is necessary to optimize the maximum accumulation capacity for this strain.

Each flask was inoculated with 20.0 mL of a culture of BMAK 0159 strain. The set was kept on a shelf illuminated by 6.500K LED lamps (Day light) in a temperature-controlled room at 20 °C. The measured luminous flux in the region of the experiment was measured in the range between 60 and 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, measured with the aid of a handheld PAR meter LI-COR, equipped with a quantum sensor LI-190. A timer was set for maintaining a 12h/12h light and dark photoperiod. The cultures were kept agitated using diaphragm air compressors, and the feed lines were filtered with a 0.22 μm filter.

The biomass accumulation was monitored through absorbance measurements, using a spectrophotometer and quartz cuvettes with a volume of 4.5 mL. The readings were taken at a wavelength of 620 nm. The cultures were sampled every 5 days for absorbance and transmittance measurements. The values were recorded and allowed the evolution of the cultures to be followed. The cultures were maintained for 35 days.

For biomass collection, a nylon net with a 60 μm opening was used, counted in a 4-inch PVC tube. After collection, the biomass in each Erlenmeyer flask was washed twice with the induction medium to remove traces of nitrate. After washing, the biomass was resuspended in 2.0 L Erlenmeyer flasks containing 1.5 L of induction medium. The Erlenmeyer flasks with the induction culture were arranged on the culture shelf and kept for the period of 15 days.

The biomass obtained after the cultivation and induction process was collected with the help of nylon mesh and dispersed in glass Petri dishes for drying for 24 h in an oven at 60 °C. Then, the contents of the plates were removed with the use of a spatula and manually triturated with the help of mortar and pestle, weighed, and placed in test tubes for further treatment.

5.2.8 Pre-treatment, extraction, and purification of PHA

The biomass of each cultivation, dried and ground, was subjected to depigmentation using a 20.0 mL of methanol at 4 °C for a period of 12 h (Yellore and Desai, 1998). After this period, the biomass was dried in an oven at 40 °C until complete evaporation of the solvent. The dry residue from the depigmentation process was digested in a 4% sodium hypochlorite solution for a period of 2 h (Dianursanti *et al.*, 2019). For heating, a water bath was used at a temperature of 45 °C. The material was periodically stirred to optimize the mixing and mass transfer of the solid biomass.

After the digestion, the tubes were centrifuged at 4.000 rpm for 10 min., and the supernatant phase was discarded at the end of the centrifugation process. The remaining material was washed with distilled water and agitated with the aid of a vortex agitator and centrifuged again. After repeated washing, the remaining material was removed from the test tubes and dried in an oven at 60 °C overnight.

The extraction process was performed using a Soxhlet-type apparatus (Manangan and Shawaphun, 2010) with 125 ml of extraction chamber capacity. The

apparatus was adapted to balloon with 150ml for solvent recovery. An amount of 125ml of trichloromethane was used as a solvent due to their great PHA solubilization capacity (Vermeer *et al.*, 2022). Based on a previous study, six siphoning operations of the Soxhlet apparatus were defined to maximize the recovery of PHA from the treated biomass in an exhaustive extraction (Manangan and Shawaphun, 2010). After the sixth syphoning operation, the solvent was partially evaporated to the Soxhlet apparatus chamber, in order to reduce the amount of solvent in the recovery balloon.

The content of the recovery balloon was transferred to a glass vial of 40ml sealed with a filter paper to allow evaporation. The vial was left inside a hood overnight till 1 ml of solvent was left after evaporation. An amount of 9 ml of ice-cold methanol was mixed with the extracted solvent and mixed vigorously with a shaker for 5 minutes to allow polymer precipitation. The mixture containing the precipitated polymer was centrifuged at 4.000 rpm and the supernatant was removed. The material was washed with acetone and ether in sequence, and then kept in a ventilated place for solvent evaporation. After solvent evaporation, the final residue was weighed and reserved in a test tube for further treatment.

5.2.9 Transesterification to produce volatile compounds

For the identification of the monomeric composition of the polymer obtained, using gas chromatography analysis, the polymer needs to be derivatized in volatile compounds. The derivatization procedures follow the protocol proposed by Riis and Mai (1988), that involves the hydrolysis and transesterification of polymer products. A quantity of the material obtained was added to a 20.0 mL in a vial and solubilized using 2.0 mL of dichloroethane. A 2.0 mL of a 4:1 solution of *n*-propanol and hydrochloric acid. 200 ul of of benzoic acid solution at 0.32M added to the vial as internal standard. The vial was kept sealed for 3 h at 85 °C in a water bath (Riis and Mai, 1988).

During the transesterification procedure, the vials were periodically shaken to mix the reaction components. After this period, the vials were allowed to cool at room temperature and 1.0 mL of water was added to previous separate the formed esters in the organic phase. An aliquot of the organic phase was removed and dried using sodium sulfate before injection into the chromatography apparatus. The same transesterification process was carried out with a PHB polymer standard from Sigma-Aldrich® for comparison purposes.

5.2.10 Gas chromatography coupled flame ionization detector (CG-FID) analysis

The transesterification products were separated using a Shimadzu chromatograph model GC-2014 equipped with an auto-sampler and a flame ionization detector, using a 30 m capillary column, Agilent model DB-1, with a stationary phase of polydimethylsiloxane of thickness of 0.25 μm and internal diameter of 0.250 mm.

Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The temperature in the injector was maintained at 280 °C with a return ratio of 1:10, except for the transesterified products of BMAK 0159, where a split of 1:2 was used. The detector temperature was maintained at 280 °C. The oven program was set with a temperature ramp from starting 80 °C to 280 °C with an increase of 10 °C/min. The injection volume of the sample was 1 μL .

5.2.11 Gas chromatography coupled mass spectrometry (CG-MS) analysis

The transesterification products were separated using a HP—Agilent 6890N coupled to a model 5973 (MS) mass spectrometer. The (5%-phenyl)-methylpolysiloxane capillary column (HP-5MS, 30 m \times 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness) (Agilent J & W; GC columns, USA) was used for all analyses.

Nitrogen was used as carrier gas at a flow rate of 2 mL/min. The temperature in the injector was maintained at 280 °C in a splitless mode. The detector temperature was maintained at 280 °C. The oven program was set with an initial ramp starting at 60 °C until 100 °C at an increment of 10 °C /min, followed by a plateau at 100 °C for 2 minutes. After the end of the plateau, a ramp from 100 °C to 280 °C at 10C/min finished the program. The ionization was done by electron impact at 70 eV; ionization source and transfer line temperature of 200°C and 250 °C, respectively. Mass spectra were obtained by automatic scanning every 0.3 s, with mass fragments in the range of 40 to 600 m/z. The injection volume of the sample was 1 μL .

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

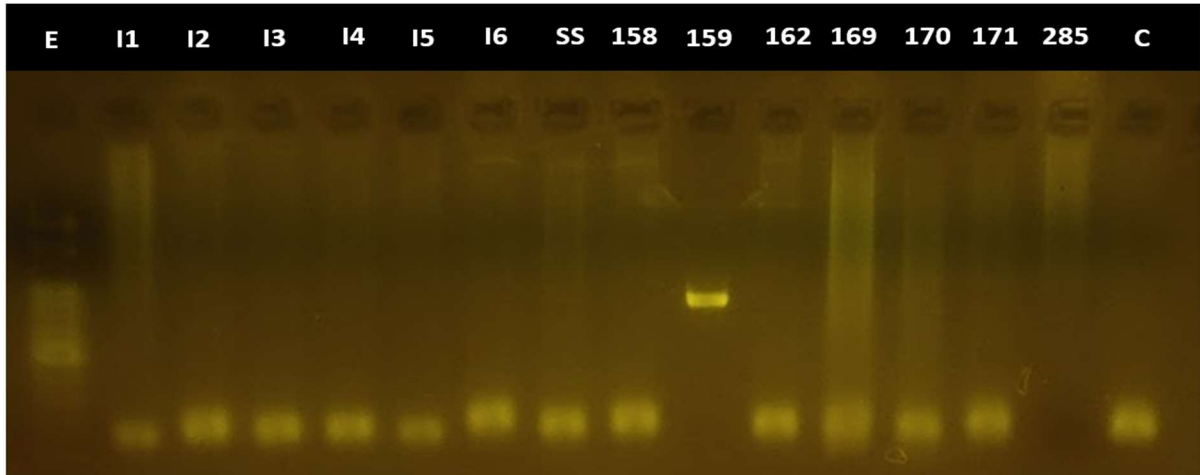
5.3.1 DNA extraction, purification and quantification

It is recognized that the presence of phenolic compounds in cyanobacteria from hypersaline environments accelerates the degradation of the extracted genomic material (Bhardawaj *et al.*, 2019). The use of polyvinylpyrrolidone (PVP) in our study allowed obtaining good quality genetic material. The PVP acts by forming complexes with hydrogen bridges with the molecules of the phenolic compounds, protecting the genomic material from degradation (Heikrujam *et al.*, 2020). It was observed that high values of PVP, in the range of 1.5 to 2.0 % provide the formation of a gel that hinders extraction, probably by a stabilization effect with the abundant exopolysaccharides in the mucilaginous matrix of the cyanobacterial colonies in the saline. Overall, the proportion of PVP was limited to 1.0 % for the extraction of genomic material from all cyanobacteria.

5.3.2 Molecular detection of PHA producers

The 4 primer pairs were used separately to identify the presence of the *phaC* gene in the set of cyanobacteria evaluated. Of the 16 cyanobacteria evaluated, only the strain BMAK-159 *Arthrospira platensis* was positive with the formation of an amplified product. Figure 39 shows an electrophoresis result of a PCR using the primers previously developed (Lane and Benton, 2015). Only the primer pair developed by Lane and Benton was able to amplify strain BMAK 159, while the other primer pairs did not show positive amplification results (Hai *et al.*, 2001 and Montenegro *et al.*, 2017).

Figure 39: Electrophoresis in 2.5 % agarose gel for separation of the PCR products using the primers phaC(3.1)F/phaC(3.1)R (Lane and Benton, 2015). The amplicon related to the BMAK 0159 strain (159), with approximately 450 bp was purified and sequenced for identification of the enzyme synthase gene. (in the picture: E = ladder 100bp; Isolates I1 to I6; SS-*Spirulina subsalsa*, 158, 159 and 162 are BMAK strains; 168, 170, 171 and 285 are CCMR strains; C are the PCR control reaction).



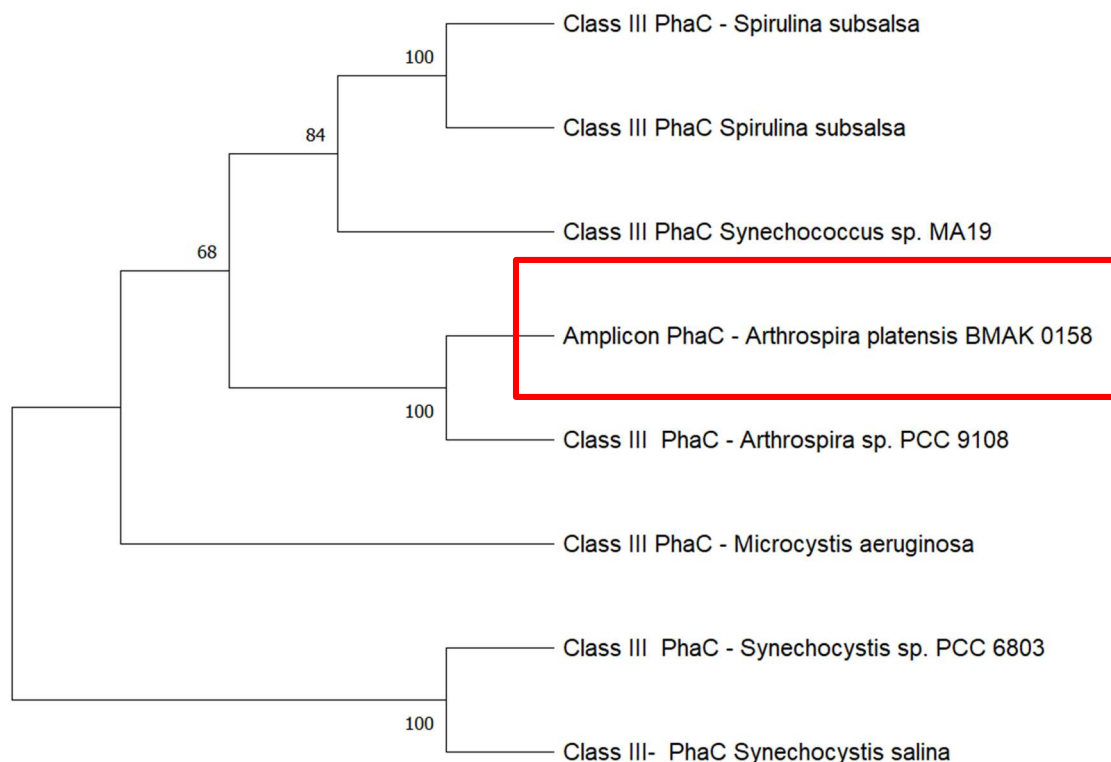
The amplified fragment had a size of 450 bp. After treatment to eliminate ends and readings with low amplification quality, a consensus sequence was assembled and translated to protein sequence to be used in comparison with other enzymes. Figure 40 shows the results of the alignment of the proteins retrieved from the NCBI databank and resulting from the translation of the *phaC* gene from BMAK 0159.

Figura 40: PhaC protein sequences used for the maximum likelihood algorithm.



To compare the amplified sequence with sequences of reference proteins, annotated in the NCBI database, the phylogenetic tree shown in Figure 41.

Figura 41: Phylogenetic tree of *phaC* genes from multiple species. The sequences used in this comparison were retrieved from NCBI. The gene *phaC* from BMAK 0159 appears indicated inside the red box.



Based on the phylogenetic comparison, we can state that the segment amplified from the genetic material of the BMAK0159 *Arthrospira platensis* strain corresponds to the *phaC* gene encoding the enzyme PhaC synthase class III. Since all other microorganisms used for comparison are PHA producers we can state that the BMAK 0159 is a strain with potential capacity to produce PHA.

The negative PCR amplification observed with the use of other primer sets shows that variability in sequences across different microorganisms may result in false negatives. Although the primary structure of PHA synthase enzymes from different organisms present similarities, there is not an extensive degree of homology between them (Steinbuchel and Hein, 2001).

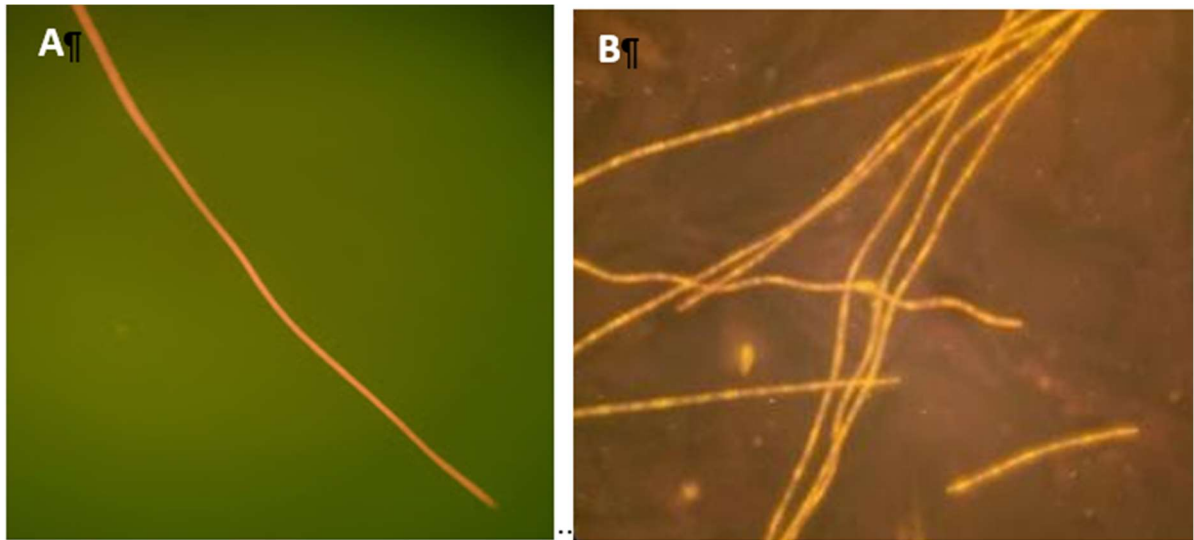
5.3.3 Fluorescent staining

The initial estimated time of 5 minutes for the heating process for the incorporation of the fluorescent dye into the cells promoted cell lysis and loss of cytoplasmic content. Then, a heating time of up to 5 minutes or less was adopted to

maintain the integrity of the cells while allowing the incorporation of the dye and the labeling of the PHA granules. All cyanobacterial cultures were submitted to the heart process to verify the possible generation of PHA.

The observed emission of the Nile Red stained granules did not overlap with the chlorophyll fluorescence related emission. Based on previous studies (Rees *et al.*, 1992), this emission is in the 582 nm range (bright yellow), while chlorophyll autofluorescence presents emission at 650 nm (red), that appears dispersed over the whole cell (Figure 42A). PHA granules were observed inside the cells after the induction process (Figure 42B).

Figure 42: Cyanobacteria stained with Nile Red and observed under a fluorescence microscope: A. Non-induced cell exhibiting weak fluorescence distributed throughout the filament. B. After induction and with PHA granules.



Observation of the cells sampled from each of the replicates showed the presence of stained granules. The control culture showed cells with stained granules but with less intensity, indicating less PHA formation. As the cultures were kept in suspension using compressed air, the CO₂ present in the air provided enough inorganic carbon to sustain PHA production, which is compatible with observations already made for other strains of this species (Campbel *et al.*, 1982). In Figure 43, the control culture stained with Nile Red/DMSO shows that some cells accumulate less stained material.

Figure 43: Nile Red/DMSO stained cell of BMAK 0159 of control culture. Most of the cells shows a lower degree of fluorescence.

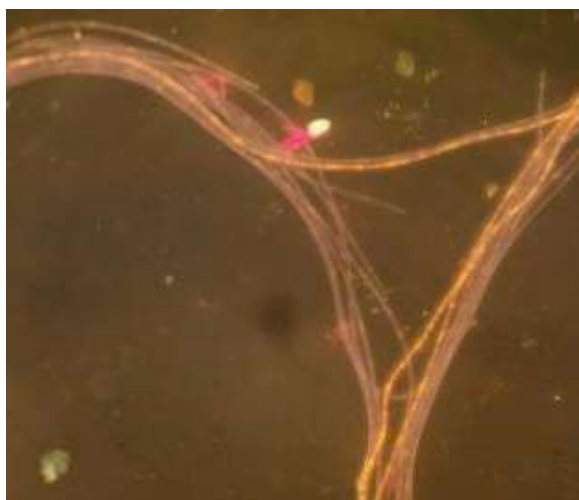


Table 10 summarizes the bioprospecting results obtained by using both molecular detection techniques and fluorescent dyes. The strains of *Spirulina maxima* and *S. subsalsa*, identified in the literature as PHA-producers (see Troschl *et al.*, 2017 for review), did not show positive identification of PHA accumulation observable by fluorescence and had no positive molecular detection. This result shows that not all strains whose species have reference to PHA production are always producers. Other examples include species of *Synechococcus*, *Aphanothece*, and *Synechocystis* with recognized PHA-producing species (Troschl *et al.*, 2017). For the other taxa evaluated, such as *Euryhalinema* and *Acrophormium*, we are unaware of previous studies that have shown PHA production by these cyanobacteria, perhaps reaffirming our negative results.

Our results, as well as other existing ones (see Troschl *et al.*, 2017), reinforce the non-absolute character of PHA production by species that produce them. The presence and abundance may be quite variable, presumably expressing environmental conditions, since in the marine environment they would be submitted to several selective agents or natural enemies, such as broad variations in environment conditions, such as pressure, salinity, temperature, availability of nutrients and light (Rotter *et al.*, 2021). In addition, this variability may occur due to the action of a bet-hedging mechanism (Koch and Forchhamer, 2021), incorrect identification of microorganisms, or due to problems that the classification of these organisms is incomplete (only phenotypic attributes and 16S rRNA information are insufficient to

determine a species in the case of cyanobacteria) and it is necessarily necessary to include a polyphasic approach to determine the species for this type of microorganism. However, it is also necessary a better understanding of the ecological role of PHA in the environment and the conditions under which it is formed since this may help direct site selection for prospecting microorganisms where PHA producers are more likely to be detected.

		Molecular detection (Primers)			Staining
Strain	Taxon	a	b	c	NR
CCAK-158	<i>Spirulina major</i>	-	-	+	+
CCAK-159	<i>Arthrospira platensis</i>	-	-	-	-
CCAK-163	<i>Synechococcus</i> sp.	-	-	-	-
ISOLATED 1	<i>Aphanothece halophytica</i>	-	-	-	-
ISOLATED 2	<i>A. halophytica</i>	-	-	-	-
ISOLATED 3	<i>Aphanothece stagnina</i>	-	-	-	-
ISOLATED 4	<i>A. stagnina</i>	-	-	-	-
ISOLATED 5	<i>A. halophytica</i>	-	-	-	-
ISOLATED 6	<i>A. halophytica</i>	-	-	-	-
-	<i>Spirulina subsalsa</i>	-	-	-	-
-	<i>Synechocistis pevaleki</i>	-	-	-	-
CCMR-0169	<i>Euryhalinema</i> sp.	-	-	-	-
CCMR-0170	<i>Euryhalinema</i> sp.	-	-	-	-
CCMR-0171	<i>Euryhalinema</i> sp.	-	-	-	-
CCMR-0280	<i>Acrophormium turfae</i>	-	-	-	-
CCMR-0285	<i>A. turfae</i>	-	-	-	-
CCMR-0287	<i>A. turfae</i>	-	-	-	-

^a Hall...; ^b Lane...; ^c Montenegro...; NR= Nile Red.

Table 12: Results of the bioprospecting for PHA-producers.

Both molecular detection previously discussed in the present study, and direct induction have limitations. Therefore, it is imperative that these techniques be developed to the point where they become standard, rapid, and reliable procedures, increasing the screening performed by producers of polyhydroxyalkanoates and consequently the spectrum of carbon sources that can be used for conversion into PHA.

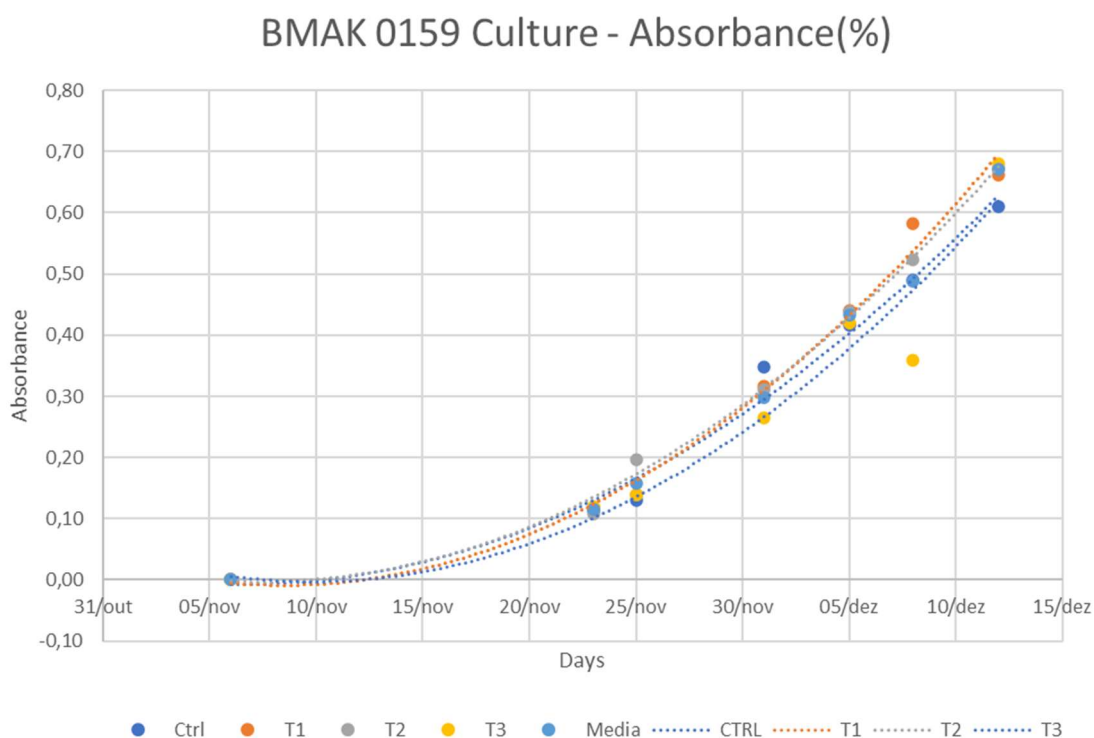
The process we employed for isolating cyanobacteria from saline showed that a more refined analysis for isolating PHA producers is needed. At the same time, the

use of tools such as flow cytometry coupled with the use of fluorescent dyes such as Nile red may enable the identification of candidates for PHA production with a greater scope when dealing with planktonic organisms.

5.3.4 Culturing and PHA induction

The cultures were maintained for a period of 35 days. The first 7 days presented a lag phase, indicating presumable acclimation of the microorganisms to the culture environment (Figure 44). The exponential phase starts after the lag phase and continues until the end of the experiment. After 30 days the absorbance reached a value of 0.5, reaching a maximum of 0.67 on the day the culture was stopped. The onset of the stationary phase was not observed until the end of the experiment. No significant difference was observed between the control culture and the average of the treated cultures. The graph in Figure 44 below presents the data set obtained from the cultivation.

Figure 44: Absorbance measured from cultures of the cyanobacterium BMAK 0159 *Spirulina platensis* in Guillard F/2 medium.



A volume of 100 mL from each culture flask was sampled for dry biomass density determination. Table 13 shows the sampling results and the final dry biomass value obtained.

	Cultivation	Sampled volume	Dry biomass	Final concentration of dry biomass
		(ml)	(g)	(g/L)
Control		100	0.043	0.43
Treatments	1	100	0.052	0.52
	2	100	0.041	0.41
	3	100	0.050	0.50

Table 13: Biomass after cultivation period.

Previous study using the strain BMAK 0159 in 30% Zarrouk medium evidenced the onset of stationary phase 16 days after the start of cultivation (Salla *et al.*, 2016). The difference in growth rate observed accompanies the lower dry mass observed at the end of the cultivation step. Cultures performed with 30% Zarrouk medium reached biomass density values on a dry basis of up to 3.5 g/L at steady state, a value 6 times higher than that observed in the present work. This difference indicates the need to adapt the Guillard F/2 medium to the cultivation of the present strain, particularly by manipulating the values of nitrogen inorganic carbon available for microorganism nutrition or evaluate the use of other culture medias.

The remaining culture volume was recovered using the nylon mesh and washed with an induction medium to remove traces of nitrate rich medium. The recovered material was resuspended in 2.000 mL Erlenmeyers using induction medium (Figure 45). Figure 45 below shows the experimental setup used in the induction step.

Figure 45: General aspect of the induced cyanobacteria cultures after 35 days. Brownish colouration indicates the progression of the chlorosis process.



After 15 days of induction, the culture volume was filtered using a 60 μm nylon mesh. The filtered material was removed from the nylon mesh with the use of a metal spatula, and then placed in a 50.0 mL Falcon tube for further drainage. The following picture shows the material obtained after the recovery of the biomass. The 50 mL Falcon tubes containing the recovered biomass from the induction volumes were centrifuged for 10 minutes at 4.000 rpm to remove the interstitial water. The resulting product from the drying step was deposited in Petri dishes for drying.

To reduce the thickness of the material for drying optimization, it was spread on the Petri dish. After spreading, the material was kept in an oven for 12 h until it was completely dry. After drying, the material was removed from the Petri dish with the help of a metal scraper and kept in a desiccator to remove residual moisture for 24 h. After this time, the material was weighed.

The results of the weighing are presented in Table 14. The PHA rich biomass observed at the end of the induction period indicates the occurrence of a gain in mass after the start of induction. We can assume that one explanation for this observation would be the existence of intracellular nitrate at levels sufficient to maintain the growth.

	Cultivation	Final volume	Dry biomass after induction	Final dry biomass density
		(ml)	(g)	(g/L)
Control		1.820	0.983	0.54
Treatments	1	1.100	0.977	0.88
	2	1.100	0.833	0.75
	3	1.280	1.081	0.84

Table 14: Results of PHA-rich biomass density obtained after induction period.

5.3.5 Preparation, extraction, and purification of the polyhydroxyalkanoates

The cold methanol allowed the removal of most of the pigments. Two washes of the material were necessary until a whitish precipitate was obtained, indicating the reduction of the photosynthesizing pigments. After the drying process at 60 °C the precipitate was completely dried. Table 15 shows the biomass weighted after pigment removal and drying.

	Cultivation	Dry biomass	Dry biomass after extraction with methanol	Final concentration of dry biomass
		(g)	(g)	(g/L)
Control		0.983	0.753	0.45
Treatments	1	0.977	0.672	0.44
	2	0.833	0.599	0.38
	3	1.081	0.804	0.49

Table 15: Biomass after pigment removal.

After drying the precipitate, it was subjected to a pre-extraction process, necessary to improve the recovery of PHA by the solvent. A 4.5% sodium hypochlorite solution was kept in contact with the PHA-rich biomass for 2 h at 40 °C to dissolve the NPCM. After this period, the material was centrifuged and dried, and then weighed. Table 16 below shows the results of the pre-extraction process.

	Cultivation	Biomass before treatment - NaOCl	Biomass after treatment - NaOCl
		(g)	(g)
Control		0.500	0.163
Treatments	1	0.500	0.212
	2	0.500	0.208
	3	0.500	0.247

Table 16: Biomass density after digestion of the NPCM.

The material from the pre-extraction step was dried and packed in a cellulose cartridge for extraction in Soxhlet-type apparatus. The following table shows the results of the drying and extraction process.

After the Soxhlet extraction process using chloroform as solvent, 90% of the solvent was evaporated, followed by precipitation using ice-cold methanol, the PHA antisolvent (Figure 46). The material was transferred to a centrifuge tube, centrifuged, the pellet was washed with ice-cold acetone and then the material was dried.

Figure 46: A. Addition of the anti-solvent (methanol) reduces the solubility of PHA in the medium, producing the formation of the dispersed precipitate; B. After centrifugation, it was possible to separate the precipitate from the supernatant and recover the extracted polymeric material.

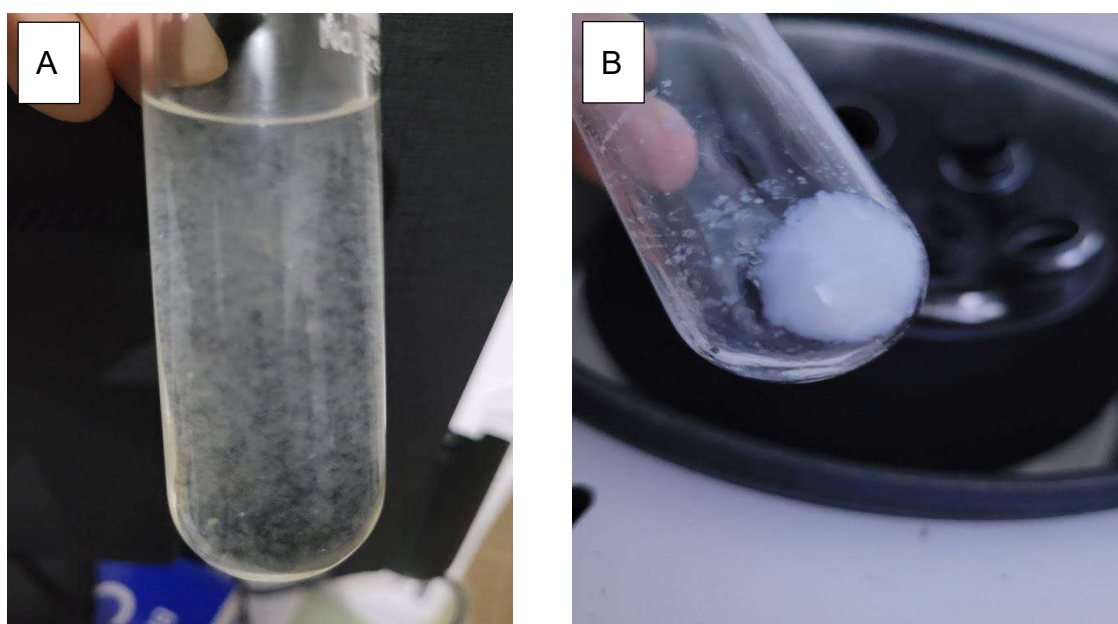


Table 17 shows the mass of precipitate obtained, after centrifugation and drying. The productivity of strain BMAK 0159 under the experimental conditions adopted and

the extraction and purification process showed that only about 1% of biomass was converted to PHA. This value is in accordance with productivities observed for other strains of this same species (Carpine *et al*, 2021).

Cultivation	Final biomass	Purified PHA	PHA concentration /biomass	Purified PHA concentration (m/m)
	(g/L)	(g)	(g/L)	(%)
Control	0.54	0.002	1.10E-03	0.2
Treatment 1	0.88	0.01	5.49E-03	1.0
Treatment 2	0.75	0.008	4.40E-03	1.0
Treatment 3	0.84	0.009	4.95E-03	0.8

Table 17: PHA production experiment after cultivation and induction of the BMAK 159 strain using nitrate restriction in 0.4% acetate in Guillard F/2 medium. The medium PHA productivity of the overall process is 0.9%.

The overall PHA productivity must be evaluated in terms of each production process step. An optimization work must be done to optimize each of these steps before a value for PHA productivity can be determined.

Part of the purified material was combined to obtain a polyhydroxyalkanoate film for further analysis. The material was solubilized in chloroform in a Petri dish. The plate was covered with a filter paper to avoid dust deposition. After 24 h, it was possible to obtain a polyhydroxyalkanoate film formed on the bottom of the plate (Figure 47).

Figure 47: Polymeric film formed on a glass plate after natural evaporation of the solvent.



5.3.6 Transesterification to produce volatile compounds.

The transesterification process presented difficulties in the treatment of natural samples. Due to the formation of possible products of thermal decomposition, such as gases or products of high volatility during the transesterification of the crude biomass (Sorgatto *et al.*, 2019), it was observed the overpressurization of the vials used, with consequent loss of samples. Due to this characteristic of the transesterification of the crude biomass, the total purification of the PHA was done before transesterification.

For comparison purposes in the chromatography with FID detector, the PHB standard treatment was performed together with the transesterification of the combined PHA sample. The transesterification products were dried using sodium sulfate, filtered using a PTFE filter and sent to chromatographic analysis.

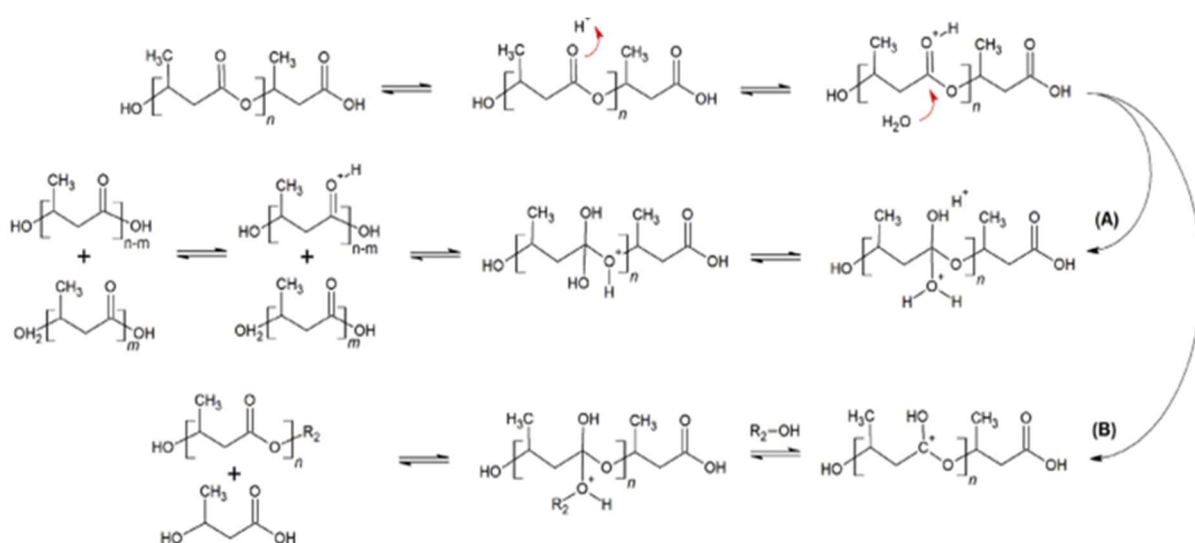
5.3.7 Gas chromatography - Flame Ionization Detector (CG-FID)

The products of the transesterification reaction are mostly volatile compounds, and they can be analyzed by gas chromatography. Initially proposed by Brauneeg (Brauneeg *et al.*, 1978), the application of this technique to research for PHA initially made use of chromatography coupled to flame ionization detectors (FID), which

requires the use of standards for comparison purposes. One advantage of using these detectors is the higher sensitivity in the detection of analytes, which allows the identification of small amounts of material in natural samples.

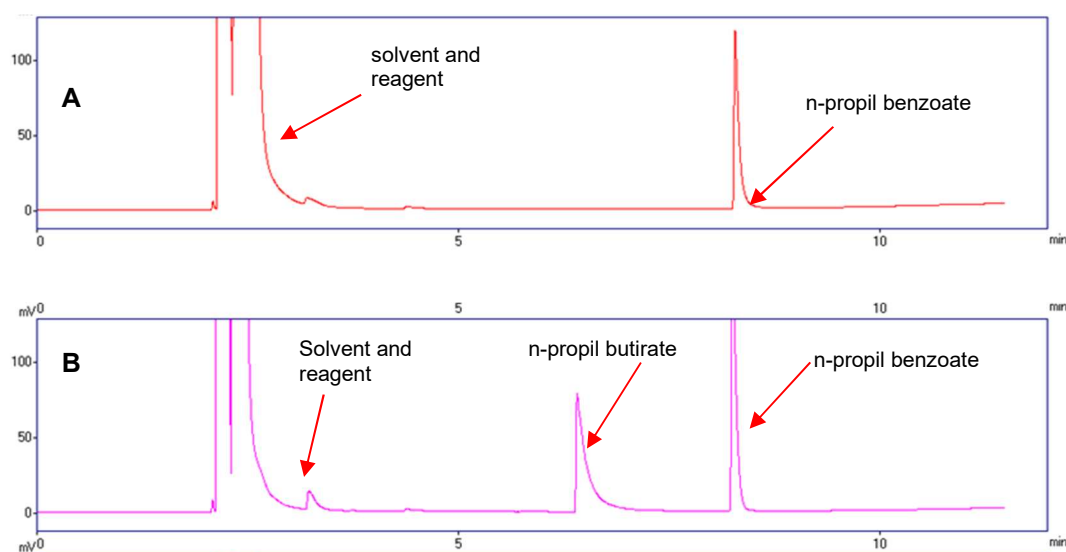
The acid-catalyzed transesterification process of PHB involves two reaction steps. In the first step, the polymer is hydrolyzed to form 3-hydroxybutyric acid (Kučera *et al.*, 2019). In a second step, the acid formed reacts with alcohol to produce the ester. Figure 48 shows typical reaction steps for the transesterification reactions of PHB.

Figure 48: General steps of acid-catalyzed hydrolysis and esterification (Source: Kučera *et al.*, 2019)



The products formed by the transesterification reaction will be separated by the chromatographic process allowing the identification of the various components of the sample. For adjusting the chromatography method and transesterification conditions, the transesterification products of the PHB standard were evaluated. Figure 49 below shows the recorded chromatograms and is in accordance with data obtained from the literature (Riis and Mai, 1988).

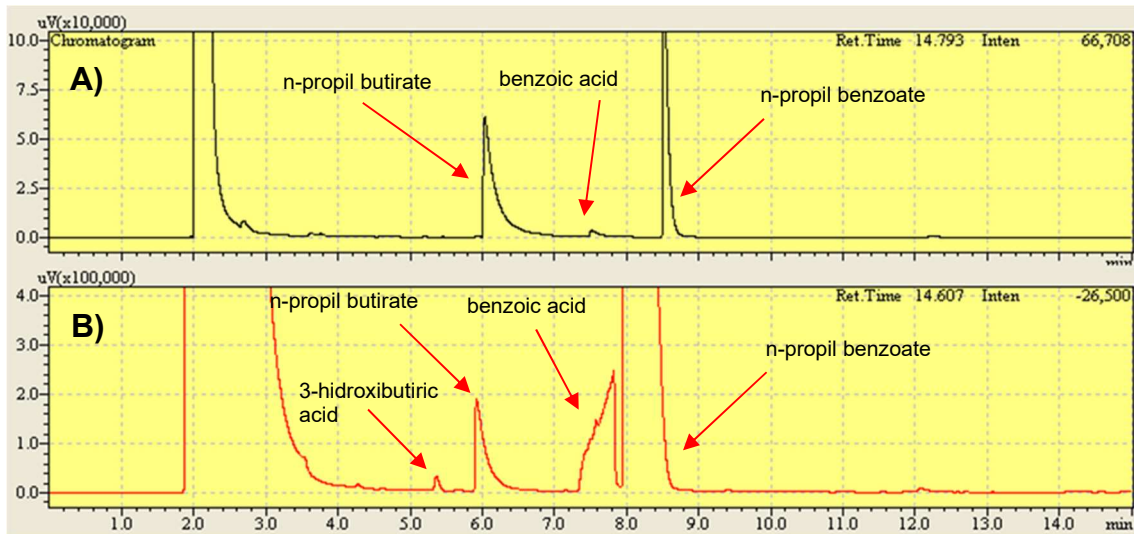
Figure 49: Chromatograms of the transesterification reaction products. A. Control reaction B. transesterification reaction of the PHB standard.



In Figure 49 a), which shows the chromatogram of the control reaction, containing the solvent, the reagents and the internal standard used, the formation of the ester derived from the internal standard (*n*-propyl benzoate) was observed, with a retention time of approximately 8 min. Figure 49 b) shows the chromatogram of the products of transesterification of the PHB standard showing the peak related to *n*-propyl butyrate, derived from the transesterification of PHB.

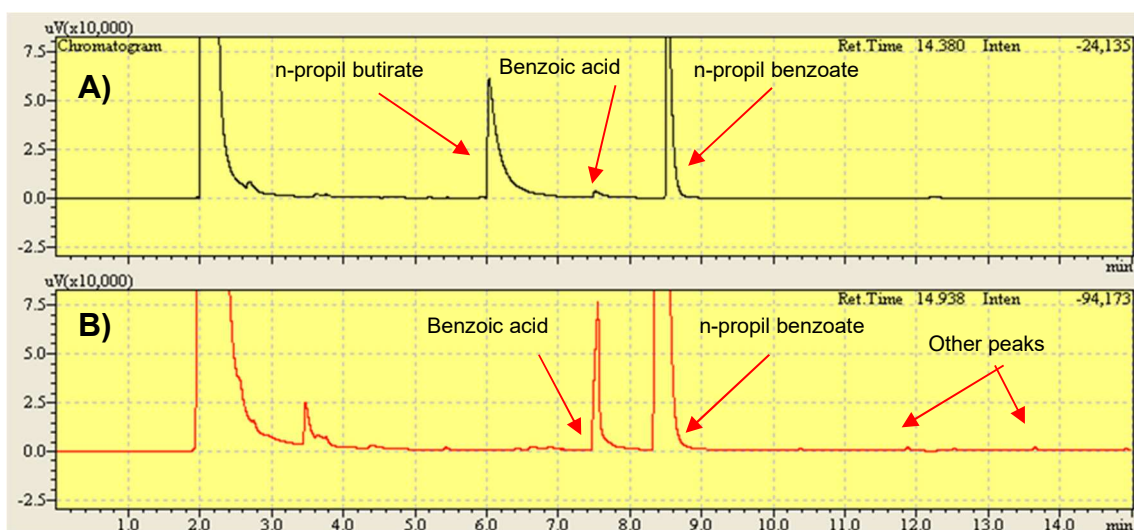
The transesterification of the polymer sample from the film produced from strain BMAK 0159 allowed comparison with the products derived from transesterification of the standard. The Figure 50 shows the comparison between the respective chromatograms. Figure 50 a), which shows the chromatogram of the transesterification products of the PHB standard. A chromatographic peak, preceding that of the internal standard, is associated with the unreacted benzoic acid and is further preceded by the peak of the *n*-propyl butyrate ester. In Figure 50 b), which shows the products of transesterification of the polymer formed by BMAK 0159, related peak *n*-propyl butyrate ester confirms the polymeric composition of the material as poly-3-hydroxybutyrate. The smaller peak preceding the butyric ester is associated with 3-hydroxy butyric acid.

Figure 50: Chromatograms of the transesterification products. A) PHB standard. B) Polymer



The transesterification products of the extract from the crude saline sample were also evaluated for the presence of PHB, but no PHB or similar polymer was detected in the sample (Figure 51). This can be since the raw biomass extracted was not induced at high carbon concentration for PHB accumulation. The other peaks found may be related to mcl-PHA's, produced by other bacteria. Further studies may evaluate this point.

Figure 51: Chromatograms of the transesterification products of the saline sample. A) PHB standard. B) Sample

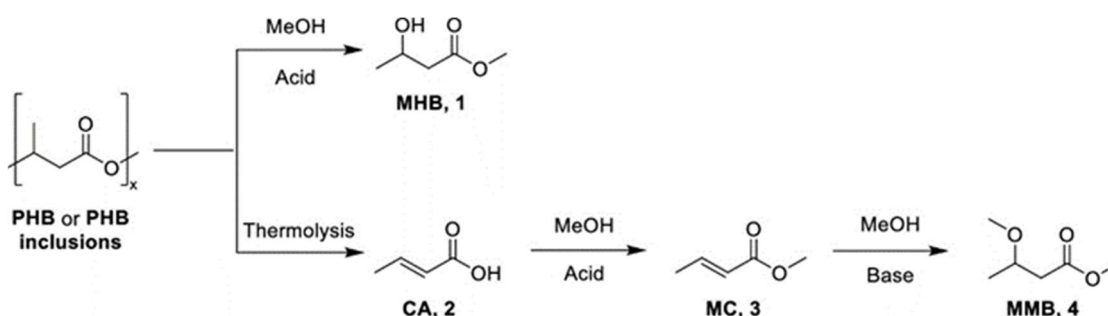


5.3.8 Gas chromatography coupled mass spectrometry (CG-MS)

The chromatography coupled to the mass spectrometry detector allows to discard the use of standards since the fragmentation spectra allow suggesting structural formulas for the different components separated in the chromatogram. The use of this technique allows the exploration of polymers of the PHA class with formulas not yet known or the identification of other compounds present in the transesterification product.

The transesterification reaction at high temperatures allows the formation of secondary products, from thermal degradation of the polymer (thermolysis) (Grassie and Murray, 1984). Figure 52 shows generic reaction steps for the transesterification reaction of PHB, also indicating some by-products related to the thermal degradation pathway (Parodi *et al.*, 2021).

Figure 52: Representation of PHB transesterification and thermal degradation pathway of PHB forming by-products that can be identified by mass spectrometry detector. (Source: Parodi *et al.*, 2021).



In this study, the transesterification products obtained were evaluated in a complementary manner to the investigation with the mass ionization detector, seeking the detection and identification of the monomer type. The samples obtained from the transesterification were injected in the gas chromatograph and analyzed by a mass detector.

Figure 53 represents the chromatogram of the PHB standard with the identification of the peaks and the corresponding fragmentation information. Peaks 2 and 3, correspond to benzoic acid and *n*-propyl benzoate ester, respectively, confirming the observations made in the chromatograms developed with the FID detector. Peak 1 was not identified, but the correlation with the detention time observed for the chromatogram developed with the FID detector indicates the possibility that it is *n*-propyl butanoate ester. Peak 4 is compatible with the thermal degradation product

of polyhydroxybutyrate and has been used in the literature as a marker for the detection of the polymer by mass spectrometry (Ansari and Fatma, 2016).

Figure 53: Standard PHB transesterification products. Chromatogram with peak identification. Peak at 10.136 min. was related to a possible contaminant. Chromatogram and fragmentation patterns in supplementary information. The product inside a box was identified as a PHB transesterification by product by previous studies (Ansari and Fatma, 2016).

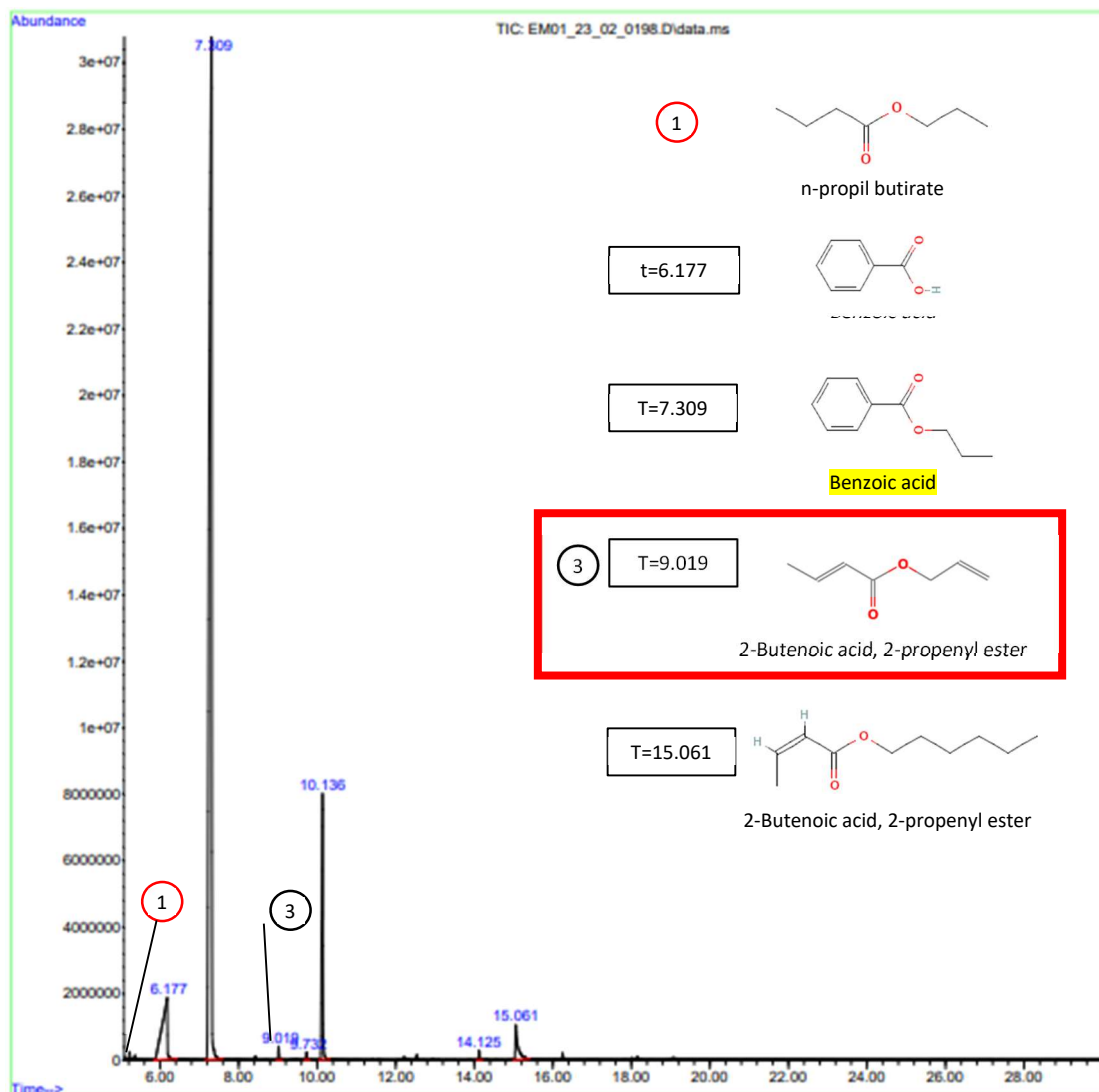
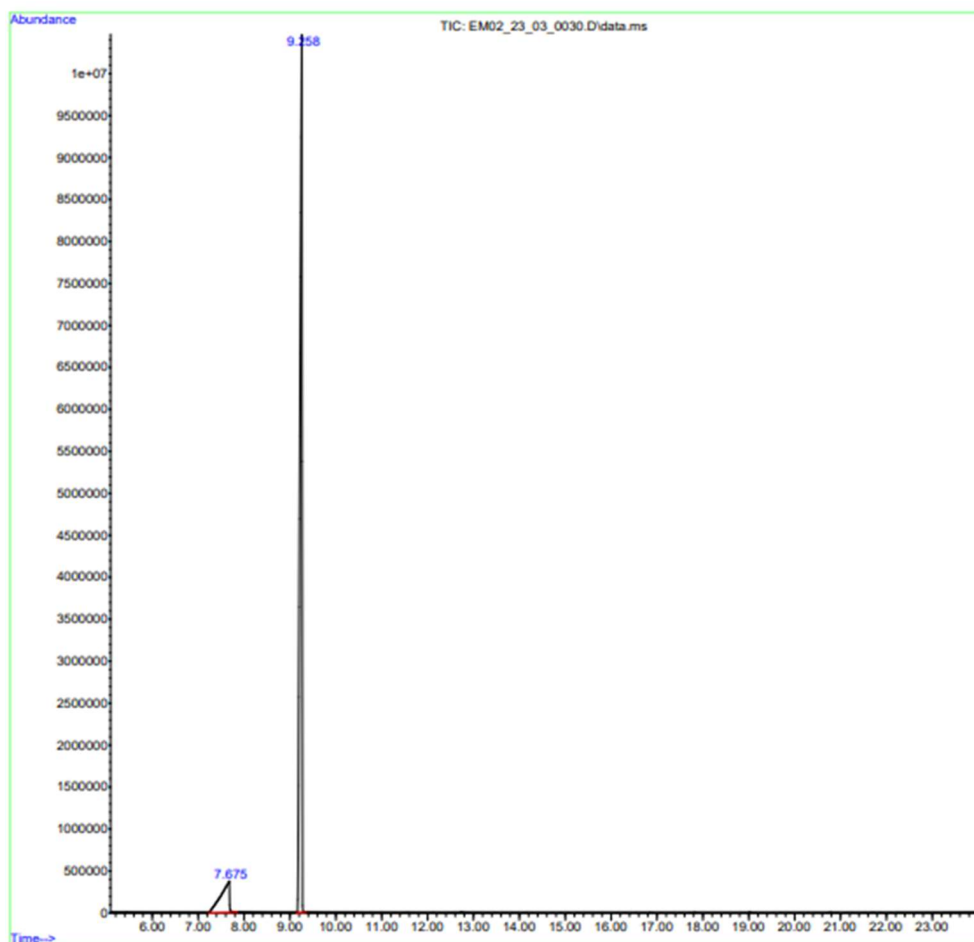
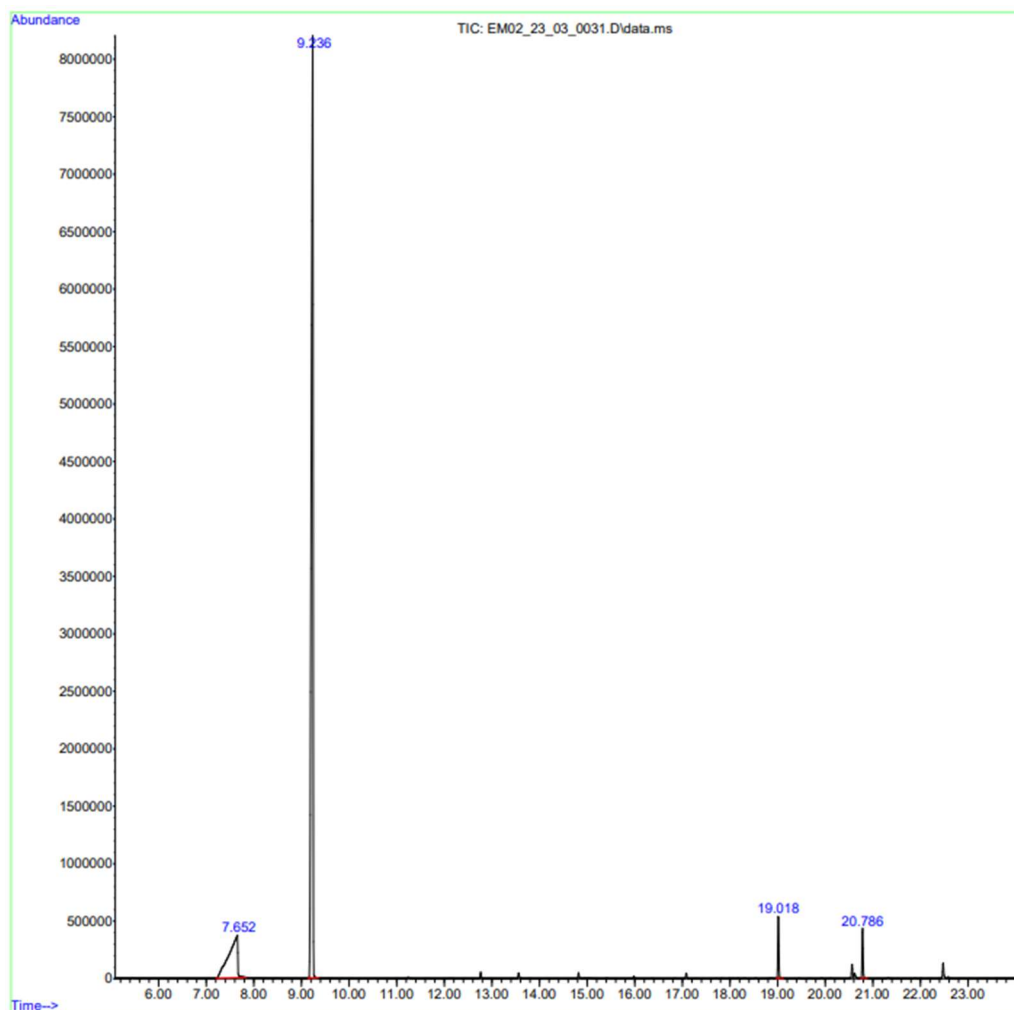


Figure 54 corresponds to the chromatogram of the transesterification products of the polymer sample produced by strain BMAK 0159. It was not possible to identify in the chromatogram the same peaks observed by chromatography using the FID detector. Because it has lower sensitivity, the mass spectrometry detector requires a higher concentration of the analyte in the sample to enable detection. However, future studies can confirm this aspect.

Figure 54: Natural sample of PHB.



In Figure 55, we can see the chromatogram associated with the crude extract of the saline material. No characteristic polyhydroxybutyrate peaks were identified. However, peaks observed in the FID detection were identified as propyl esters derived from fatty acids of medium molecular weight. The findings do not allow confirming the presence of scl or mcl-type PHAs in the sampled mixed microbial biomass.

Figure 54: Chromatogram of the sample obtained from the raw saline biomass.

The analysis of gas chromatography coupled with mass spectrometry allows confirmation of the composition of the polymer formed without the need for comparison with standards, which is useful for the search for PHA producers from various raw materials. However, the limitations related with method sensibility, favor the adoption of gas chromatography with flame ionization detector for bioprospecting and routine quantification of both short and medium side chain PHAs (scl and mcl PHAs). Our study revealed that combined analysis, such as fluorescence microscopy and gas chromatography can be a more accurate procedure to identify PHA producers within cyanobacteria.

Despite evidence in the literature that cyanobacteria of the genus *Aphanothece* are PHA producers, it was not possible in the present study to identify strains that produce this material, either by molecular detection or through induction with nitrogen restriction.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção fotoautotrófica de polihidroxicarboxilatos utilizando organismos marinhos traz a oportunidade de solução de diversos problemas atuais. A poluição plástica, a necessidade de redução do uso de materiais não-renováveis, a urgência de capturar carbono e a necessidade de reduzir o uso de água doce, são todos problemas urgentes, para os quais este modo de produção pode contribuir com soluções.

Na medida em que as possibilidades de aproveitamento de fontes de carbono são diversas, faz-se necessário buscar microrganismos produtores de polihidroxicarboxilatos ambientados a locais e características de meio de cultura diferentes.

Buscar microrganismos produtores de PHA demanda a disponibilidade de ferramentas capazes e confiáveis para a tarefa. Tanto a detecção molecular quanto a indução direta apresentam limitações diversas e reduzem a possibilidade de achados. Por isso faz-se mister que essas técnicas sejam desenvolvidas a ponto de se tornarem procedimento padrão, rápido e confiável, ampliando a capacidade de varredura por produtores de polihidroxicarboxilatos e conseqüentemente o espectro de aproveitamento de fontes de carbono passíveis de utilização.

O processo de isolamento de cianobactérias da salina mostrou que um processo mais apurado para o isolamento de produtores de PHA é necessário. O emprego de meios de cultura sólidos para a indução, conjugados com o emprego de corantes fluorescentes pode prover um caminho para a expansão da prospecção de maneira mais rápida. A utilização de citometria de fluxo conjugada ao emprego de corantes fluorescentes pode aumentar a capacidade de busca por produtores.

O desenho de sondas moleculares confiáveis e o projeto de reações de PCR multiplex e PCR de colônia, que permitam uma varredura mais assertiva por produtores de PHA é necessária.

Além disso, uma compreensão mais completa do papel do PHA no ambiente e uma correlação com as situações em que o mesmo é formado pode ajudar a direcionar

a prospecção para locais onde seja maior a probabilidade de detecção de produtores e inclusive a identificação de cepas capazes de elevados níveis de acumulação.

Ficou claro que, apesar da espectrometria de massas aparecer como ferramenta central para a confirmação de composição, a existência de padrões e controles positivos permite fazer uso da técnica de CG-FID. O menor custo envolvido com esta técnica permite que mais laboratórios e empresas trabalhem com a prospecção de produtores de PHA, ampliando as possibilidades de identificação de cepas superprodutoras.

O uso de acetato para a indução permitiu a acumulação de PHA pela cepa identificada como produtora aos níveis de 1%, valor compatível com o rendimento observado na literatura para esta cepa. Uma otimização de fatores para cultivo e indução se faz necessário a fim de que seja possível categoricamente quantificar a capacidade máxima de acumulação de uma determinada cepa.

Apesar de evidências na literatura e trabalhos ainda não publicados apontarem que microrganismos identificados dentro do gênero *Aphanothece* serem produtores de PHA, não foi possível no presente trabalho a identificação de cepa produtora nem por meio da detecção molecular, nem por meio da indução química.

Os tapetes microbianos de ambientes halofílicos apresentam uma grande variedade de microrganismos. Como outros ambientes, a perda de espaços para construções, particularmente em áreas de densa população colocam estes ambientes em risco. É urgente que programas conjuntos de prospecção biotecnológica de amplo espectro e manutenção de germoplasma, sejam realizados para garantir que as gerações futuras tenham acesso ainda que a uma parcela dos microrganismos existentes em tais ambientes. A perda de biodiversidade vai, inevitavelmente, limitar as opções de pesquisa futuras.

O isolamento e identificação molecular de cianobactérias a partir das esteiras microbianas encontradas em cristalizadores das salinas da região de Cabo Frio, permitiu a obtenção de 6 cepas unialgais de cianobactérias. O sequenciamento do gene do 16S rRNA permitiram enquadrar os isolados de 5 cepas como espécies do gênero *Euhalothece*, *Euhalothece* sp. ainda que a avaliação morfológica indique a espécie *Aphanothece halophytica* Frey 1933. Uma cepa foi identificada como

pertencente a uma espécie não identificada de *Synechococcus* sp. Apesar da ferramenta molecular fornecer um indício seguro sobre um determinado microrganismo, o posicionamento dele utilizando a identificação molecular é insuficiente. A abordagem polifásica para identificação de cianobactérias, combinando a análise fenotípica com a informação molecular, constitui-se num recurso seguro para identificação de cianobactérias.

REFERÊNCIAS

- ACHEAMPONG, E. O.; MACGREGOR, C. J.; SLOAN, S.; SAYER, J. **Deforestation is driven by agricultural expansion in Ghana's forest reserves**. *Scientific African*, v. 5, doi:10.1016/j.sciaf.2019.e00146, 2019.
- AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA. **The Future of Petrochemicals**. Paris: Agência Internacional de Energia, 2018.
- AHMAD, H., TARIQ, A., SHEHZAD, A., FAHEEM, M. S., SHAFIQ, M., RASHID, I. A., KHALIQ, Z. **Stealth technology: Methods and composite materials-A review**. *Polymer Composites*. doi:10.1002/pc.25311, 2019.
- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. **Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice**. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, n. 6, p. 732-743, 2010.
- ALEXANDRI, M.; VENUS, J. **Feedstock flexibility in sustainable chemistry: Bridging sectors still not sufficiently familiar with each other – Showcases of ongoing and emerging initiatives**. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 8, p. 24-29, doi:10.1016/j.cogsc.2017.09.003, 2017.
- ALI, I.; JAMIL, N. **Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field**. *Frontiers in Biology*, v. 11, n. 1, p. 19-27, doi:10.1007/s11515-016-1389-z, 2016.
- ALVES, L. P. S., ALMEIDA, A. T., CRUZ, L. M., PEDROSA, F. O., DE SOUZA, E. M. **A simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(1). doi:10.1590/1414-431x20165492, 2017.
- AMELIA, TAN SUET MAY. **Applications of Polyhydroxyalkanoate in Agriculture**. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*, 2019.
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. **Modern approach to the classification system of cyanophytes 3. Oscillatoriales**. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algological Studies*, 50-53: 327-472, 1988.
- ANANYEV, GENNADY M., NICHOLAS J. SKIZIM, AND G. CHARLES DISMUKES.

Enhancing biological hydrogen production from cyanobacteria by removal of excreted products. *Journal of biotechnology* 162.1: 97-104, 2012.

ANDERSON, D. M. **Turning back the harmful red tide.** *Nature* 388:513–4, 1997.

ANDERSON, A J., DAWES. **Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** *Microbiological reviews* 54.4, 450-472, 1990.

ANDRADY, A. L., NEAL, M. A. **Applications, and societal benefits of plastics.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364 (1526), 1977–1984. doi:10.1098/rstb.2008.0304, 2009.

ANIK, A. H., HOSSAIN, S., ALAM, M., SULTAN, M. B., HASNINE, M. T., & RAHMAN, M. M. **Microplastics pollution: A comprehensive review on the sources, fates, effects, and potential remediation.** *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100530, 2021.

ANSARI S, FATMA T **Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization.** *PLoS ONE* 11(6): e0158168. doi:10.1371/journal.pone.0158168, 2016.

ARBELI Z., FUENTES C. L. **Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples.** *FEMS Microbiol. Lett.* 272 269–275. 10.1111/j.1574-6968.2007.00764.x, 2007.

ARIAS DM, FRADINHO JC, UGGETTI E, GARCÍA J, REIS MAM. **Polymer accumulation in mixed cyanobacterial cultures selected under the feast and famine strategy.** *Algal Research.*;33:99-108, 2018.

Asada Y, Miyake M, Miyake J, Kurane R, Tokiwa Y. **Photosynthetic accumulation of poly-(hydroxybutyrate) by cyanobacteria—The metabolism and potential for CO₂ recycling.** *International Journal of Biological Macromolecules.*;25(1-3):37-42, 1999.

AZAVEDO-SANTOS, Valter M., MARQUES, Larissa M., TEIXEIRA, Clarissa R., GIARRIZZO, Tommaso, BARRETO, Rodrigo, RODRIGUES-FILHO, Jorge L. **Digital**

media reveal negative impacts of ghost nets on Brazilian marine biodiversity. Marine Pollution Bulletin, Volume 172, 112821. ISSN 0025-326X. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112821>, 2021.

BAETA NEVES, M.H.C.; CASARIN, A.J.. **As cianofíceas das salinas de Cabo Frio - Brasil.** Acta Biologica Leopoldensia, 12(1):99-123, 1990.

BAHA AL - DEEN B AND AH BAHA AL - DEEN. **Posible efecto de microalgas en la forma de cristalización de cloruro de sodio en la Salina de Araya.** Bol Inst Oceanogr, Univ Oriente 11: 35 – 38, 1972.

BAKER, M. **Reproducibility crisis.** Nature 533.26 353-66, 2016.

BALAJI S, GOPI K, MUTHUVELAN B. **A review on production of poly- β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics.** Algal Research. 2(3):278, 2013.

BEAUJOT, A. **"The Real Thing": The Celluloid Vanity Set and the Search for Authenticity,** Victorian Fashion Accessories, Bloomsbury Publishing Plc, pp. 139–178, doi:10.2752/9781472504517/Beaujot0006, ISBN 9781472504517, 2012.

BECK, CHRISTIAN, HENNING KNOOP, ILKA M. AXMANN, RALF STEUER. **The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms.** BMC genomics 13 1-17, 2012.

BHARDWAJ B, AGRAWAL A, LEDWANI L, VAIPHEI ST, JAIN S. **An efficient method for DNA extraction from cyanobacteria isolated from hypersaline and marine environments.** J Phycol. 2019 Jun;55(3):733-737. doi: 10.1111/jpy.12847. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30802962.

BILKOVIC, D. M., K. J. HAVENS, D. M. STANHOPE, K. T. ANGSTADT. **Use of fully biodegradable panels to reduce derelict pot threats to marine fauna.** Conservation Biology 26, no. 6 (2012): 957-966.

BISERKA, BAHA, ALI HUSSAIN BAHA AL DEEN. **Posible efecto de microalgas en la forma de cristalización del cloruro de sódio em la salina de Araya,** 1972.

BONARTSEV AP, BONARTSEVA GA, RESHETOV IV, KIRPICHNIKOV MP,

SHAITAN KV. **Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate)**. Acta Naturae. 2019 Apr-Jun;11(2):4-16. doi: 10.32607/20758251-2019-11-2-4-16. PMID: 31413875; PMCID: PMC6643351.

BORRELLE, S. B., *et al.* **Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution**. Science 369.6510 p. 1515-1518, 2020.

Boucher, Julien, Damien Friot. **Primary microplastics in the oceans: a global evaluation of sources**. Vol. 10. Gland, Switzerland: IUCN, 2017.

Brandl, Helmut, *et al.* **Pseudomonas oleovorans as a source of poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters**. Applied and environmental microbiology 54.8 (1988): 1977-1982.

BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B. Y., & LAFFERTY, R. M. (1978). **A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass**. European journal of applied microbiology and biotechnology, 6, 29-37.

BRESAN, S., SZNAJDER, A., HAUF, W., FORCHHAMMER, K., PFEIFFER, D., JENDROSSEK, D. (2016). **Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids**. Scientific Reports, 6(1). doi:10.1038/srep26612 "

BRITO GF, AGRAWAL P, ARAÚJO EM, MÉLO TJ. **Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes**. Revista eletrônica de materiais e Processos. 2011 Sep 31;6(2):127-39.

BRYDSON, J. A., MARIANNE GILBERT. Brydson's **Plastics Materials**. Butterworth-Heinemann, 2016.

BUCKNALL DG. 2020 **Plastics as a materials system in a circular economy**. Phil.Trans.R.Soc.A378: 20190268.<http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2019.0268>

CAMPANALE, C., MASSARELLI, C., SAVINO, I., LOCAPUTO, V., URICCHIO, V.F. **A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health**. Int J Environ Res Public Health. 2020 Feb 13;17(4):1212.

PMID: 32069998; PMCID: PMC7068600. doi: 10.3390/ijerph17041212.

CAMPBELL 3RD, J., STEVENS JR, S. E., & BALKWILL, D. L. (1982). **Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Spirulina platensis***. *Journal of Bacteriology*, 149(1), 361-363.

CAPON R.J. DUNLOP R.W. GHISALBERTI E.L. JEFFERIES P.R. (1983) **Poly-3-hydroxyalkanoates from marine and freshwater cyanobacteria** *Phytochemistry*, 22, 1181–1184.

CARPINE R, OLIVIERI G, HELLINGWERF KJ, POLLIO A, PINTO G, MARZOCHELLA A. **Photoautotrophic production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria: nitrate effects and screening of strains**. *Environ Eng Manag J*. 2019 Jun;18(6):1337-46.

CARPINE R, RAGANATI F, OLIVIERI G, HELLINGWERF KJ, MARZOCHELLA A. **Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Synechocystis* PCC6803 from CO₂: Model development**. *Algal Research*. 2018;29:49-60

CARPINE, R. SIEBER, S., **Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: Their application and their impact on human health**. *Current Research in Biotechnology*, 3, pp.65-81, 2021.

CARPINE, Roberta *et al.* **Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: can cyanobacteria meet this challenge?**. *Processes*, v. 8, n. 3, p. 323, 2020.

CARPINE, ROBERTA, SIEBER, S. **Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: their application and their impact on human health**. *Current Research in Biotechnology* 3 (2021): 65-81.

CARPINE, ROBERTA, GIUSEPPE OLIVIERI, KLAAS J. HELLINGWERF, ANTONINO POLLIO, AND ANTONIO MARZOCHELLA. **Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: can cyanobacteria meet this challenge?**. *Processes* 8, no. 3 (2020): 323.

CARPINE, ROBERTA, GIUSEPPE OLIVIERI, KLAAS J. HELLINGWERF, ANTONINO POLLIO, GABRIELE PINTO, ANTONIO MARZOCHELLA. **Photoautotrophic**

production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from cyanobacteria: nitrate effects and screening of strains. *Environ Eng Manag J* 18, no. 6 (2019): 1337-1346.

CARR, N. G. **The occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in the blue-green alga, *Chlorogloea fritschii*.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biophysics including Photosynthesis* 120.2 (1966): 308-310.

CASSIER-CHAUVAT, CORINNE, VICTOIRE BLANC-GARIN, FRANCK CHAUVAT. **Genetic, genomics, and responses to stresses in cyanobacteria: biotechnological implications.** *Genes* 12.4 (2021): 500.

CHAMAS, A., MOON, H., ZHENG, J., QIU, Y., TABASSUM, T., JANG, J. H., . SUH, S. (2020). **Degradation rates of plastics in the environment.** *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494-3511.

CHANDANI, N.; MAZUMDER, P.B.; BHATTACHARJEE, A. **Production of polyhydroxybutyrate (biopolymer) by *Bacillus tequilensis* NCS-3 Isolated from municipal waste areas of silchar, assam.** *Int. J. Sci. Res.* 2014, 3, 198–203.

CHEN, G., & WANG, Y. (2013). **Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates.** *Chinese Journal of Polymer Science*, 31(5), 719–736. doi:10.1007/s10118-013-1280-1

CHEN, G; **Industrial production of PHA. Plastics from bacteria: natural functions and applications** (2010): 121-132.

CHEN, L., MEN, X., MA, M., LI, P., JIAO, Q., LU, S., WU, S. (2010). **Polysaccharide release by *Aphanothece Halophytica* Inhibits Cyanobacteria/Clay flocculation;** *Journal of Phycology*, 46(3), 417–423. doi:10.1111/j.1529-8817.2010.00826.x

CHISTI, Y.. **Biodiesel from microalgae beats bioethanol.** *Trends in biotechnology* 26, no. 3 (2008): 126-131.

COLOMBO, B., FAVINI, F., SCAGLIA, B., *et al.* **Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture.** *Biotechnol Biofuels* 10, 201 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0888-8>.

CONRADI, F. D., ZHOU, R.-Q., OESER, S., SCHUERGERS, N., WILDE, A., MULLINEAUX, C. W. (2019). **Factors controlling floc formation and structure in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**. Journal of Bacteriology. doi:10.1128/jb.00344-19.

COSTA, S. S., MIRANDA, A. L., ASSIS, D. DE J., SOUZA, C. O., DE MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V., & DRUZIAN, J. I. (2018). **Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition**. Algal Research, 33, 231–238. doi:10.1016/j.algal.2018.05.016

CUI, Y., BARFORD, J.P. and RENNEBERG, R., 2007. **Gas chromatographic determination of poly (3-hydroxybutyrate) with alkaline hydrolysis and acid esterification**. Analytical letters, 40(15), pp.2915-2924.

DA SILVA, LOREINE HERMIDA, ROSIANE CARNEIRO DOS SANTOS HAYAKAWA, ANDERSON ANDRADE CAVALCANTI IESPA, CYNTHIA MOREIRA DAMAZIO IESPA, DEISE DE OLIVEIRA DELFINO, FREDERICO ALVES DOS SANTOS LOPES. **Cianobactérias planctônicas da lagoa Pitanguinha, RJ, Brasil**. Revista Biociências 13, 2007.

DALE, C., BEETON, M., HARBISON, C., JONES, T., PONTES, M. **Isolation, Pure Culture, and Characterization of *Candidatus Arsenophonus arthropodicus*, an Intracellular Secondary Endosymbiont from the Hippoboscid Louse Fly *Pseudolynchia canariensis***. Applied and Environmental Microbiology, 72(4), 2997–3004. doi:10.1128/aem.72.4.2997-3004.2006 10.1128/AEM.72.4.2997-3004.2006, 2006.

DAMROW R, MALDENER I, ZILLIGES Y. **The multiple functions of common microbial carbon polymers, glycogen and PHB, during stress responses in the non-diazotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803**. Frontiers in Microbiology. 7:966. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00966, 2016.

DE SMET, M. J., *ET AL.* **Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane**. Journal of bacteriology 154.2 870-878, 1983.

DE SOUSA, F. D. B. **The role of plastic concerning the sustainable development**

goals: The literature point of view. Cleaner and Responsible Consumption, 100020, 2021.

DEGANO I, SORIANO S, VILLA P, POLLAROLO L, LUCEJKO JJ, JACOBS Z, DOUKA K, VITAGLIANO S, TOZZI C. **Hafting of Middle Paleolithic tools in Latium (central Italy): new data from Fossellone and Sant'Agostino caves.** PLoS One. Jun 20;14(6):e0213473, 2019.

DIANURSANTI, ALIFIA, K. C. H., & SARI, P. R. (2019). **Solvent extraction of polyhydroxybutyrate with NaClO from Spirulina platensis for capsule ingredients.** THE 4TH BIOMEDICAL ENGINEERING'S RECENT PROGRESS IN BIOMATERIALS, DRUGS DEVELOPMENT, HEALTH, AND MEDICAL DEVICES: Proceedings of the International Symposium of Biomedical Engineering (ISBE) doi:10.1063/1.5139342, 2019.

DIEGO B. GENUÁRIO, MARCELO G.M.V. VAZ, SUIKINAI N. SANTOS, VANESSA N. KAVAMURA, ITAMAR S. MELO, **Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments: Toward Functional Exploitation**, Editor(s): Surajit Das, Hirak Ranjan Dash, Microbial Diversity in the Genomic Era, Academic Press, Pages 265-284, ISBN 9780128148495, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00016-2>, 2019.

DILKES-HOFFMAN, L. S., *et al.* **The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study.** Marine Pollution Bulletin 142 15-24, 2019.

CHATCHAWAN, T., PEERAPORNPISAL, Y., KOMÁREK, J. **Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand—a pilot study.** Fottea, 11(1), 203-214, 2011.

DO NASCIMENTO, RODRIGO PIRES, BERNARDO DIAS RIBEIRO, KAREN SIGNORI PEREIRA, MARIA ALICE ZARUR COELHO. **Microbiologia industrial: bioprocessos.** Elsevier Brasil, 2017.

DOELLO, SOFIA, *ET AL.* **A specific glycogen mobilization strategy enables rapid awakening of dormant cyanobacteria from chlorosis.** Plant physiology 177.2 (2018): 594-603.

DOR, I., HORNOFF, M. **Studies on *Aphanothece halophytica* Fremy from a Solar**

Pond: Comparison of Two Isolates on the Basis of Cell Polymorphism and Growth Response to Salinity, Temperature and Light Conditions. *Botanica Marina*, 28(9). doi:10.1515/botm.1985.28.9.389, 1985.

DOYLE, JEFFREY. **DNA protocols for plants. Molecular techniques in taxonomy.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991. 283-293.

DRAKARE, S. (2002). **Competition between Picoplanktonic Cyanobacteria and Heterotrophic Bacteria along Crossed Gradients of Glucose and Phosphate.** *Microbial Ecology*, 44(4), 327–335. doi:10.1007/s00248-002-1013-4 10.1007/s00248-002-1013-4

ENAS ELMOWAFY, ABDALLA ABDAL-HAY, ATHANASIOS SKOURAS, MATTIA TIBONI, LUCA CASETTARI VINCENZO GUARINO (2019) **Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering**, *Expert Review of Medical Devices*, 16:6, 467-482, DOI: 10.1080/17434440.2019.1615439

ERIKSEN, M., COWGER, W., ERDLE, L.M., COFFIN, S., VILLARRUBIA-GOMEZ, P., MOORE, C.J., *et al.* (2023) **A growing plastic smog, now estimated to be over 170 trillion plastic particles afloat in the world's oceans—Urgent solutions required.** *PLoS ONE* 18(3): e0281596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281596>

FÁBREGAS, JAIME, *ET AL.* **Tris not only controls the pH in microalgal cultures, but also feeds bacteria.** *Journal of applied phycology* 5 (1993): 543-545.

FERRIS, MICHAEL J., HIRSCH. **Method for isolation and purification of cyanobacteria**, *Applied and environmental microbiology* 57, no. 5 (1991): 1448-1452.

FLORES, E. , HERRERO, A , **The cell biology of cyanobacteria**; 2014, Sevilha; Caister Academic Press; 2014, ISBN: 978-1-908230-92-8

GADGIL, BHAGYASHRI S. THORAT, NARESH KILLI, GUNDLOORI VN RATHNA. **Polyhydroxyalkanoates as biomaterials.** *MedChemComm* 8.9 (2017): 1774-1787.

GARCÍA PRIETO CV, RAMOS FD, ESTRADA V, VILLAR MA, SOLEDAD DIAZ M. **Optimization of an integrated algae-based biorefinery for the production of biodiesel, astaxanthin and PHB.** *Energy*. 2017;139(15):1159-1172

GARCIA-PICHEL, F., NÜBEL, U., & MUYZER, G. (1998). **The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria.** Archives of Microbiology, 169(6), 469–482. doi:10.1007/s00203005059910.1007/s002030050599

GHIDINI, T. (2018). **Materials for space exploration and settlement.** Nature Materials, 17(10), 846–850. doi:10.1038/s41563-018-0184-4

GOMES GRADÍSSIMO, D., PEREIRA XAVIER, L., VALADARES SANTOS, A. (2020). **Cyanobacterial Polyhydroxyalkanoates: A Sustainable Alternative in Circular Economy.** Molecules, 25(18), 4331. doi:10.3390/molecules25184331

GOMEZ, José G. C. **Produção de biopolímeros – Biopoliésteres;** In: NASCIMENTO, R. P.; COELHO, M. A. Z.; RIBEIRO, B. D.; PEREIRA, K. S. (Eds). Microbiologia Industrial – Bioprocessos, Elsevier. p. 605-632.

GRASSIE, N.; MURRAY, E. J.; HOLMES, P. A. **The thermal degradation of poly-(d)- β -hydroxybutyric acid): Part 1—Identification and quantitative analysis of products.** Polymer Degradation and Stability, v. 6, n. 1, p. 47-61, 1984. DOI: 10.1016/0141-3910(84)90016-8.

GRASSIE, N.; MURRAY, E. J.; HOLMES, P. A. **The thermal degradation of poly-(d)- β -hydroxybutyric acid): Part 2—Changes in molecular weight.** Polymer Degradation and Stability, v. 6, n. 2, p. 95-103, 1984. DOI: 10.1016/0141-3910(84)90075-2.

GRASSIE, N.; MURRAY, E. J.; HOLMES, P. A. **The thermal degradation of poly-(d)- β -hydroxybutyric acid): Part 3—The reaction mechanism.** Polymer Degradation and Stability, v. 6, n. 3, p. 127-134, 1984. DOI: 10.1016/0141-3910(84)90032-6.

GREGORY, DAVID A., CAROLINE S. TAYLOR, ANNABELLE TR FRICKER, EMMANUEL ASARE, SANTOSH SV TETALI, JOHN W. HAYCOCK, IPSITA ROY. **Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications.** Trends in Molecular Medicine (2022).

HAHLADAKIS, JOHN N., ELENI LACOVIDOU. **Closing the loop on plastic packaging materials: What is quality and how does it affect their circularity?.**

Science of the Total Environment 6301394-1400, 2018.

HAI, T.; HEIN, S.; STEINBÜCHEL, A. **Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19.** Microbiology, v. 147, n. 11, p. 3047-3060, 2001.

HALAMI, PRAKASH M. **Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06.** World Journal of Microbiology and Biotechnology 24 (2008): 805-812.

HANKERMEYER CR, TJEERDEMA RS (1999) **Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms.** Rev Environ Contam Toxicol 159:1–24.

HARRISON, ROY M.; HESTER, RONALD E; Series: Issues in environmental science and technology 47; Publisher: Royal Society of Chemistry, Year: 2019; ISBN: 978-1-78801-331-4,178801331X,978-1-78801-660-5,1788016602,978-1-78801-241-6.

HAUF, WALDEMAR, BJÖRN WATZER, NORA ROOS, ALEXANDER KLOTZ, KARL FORCHHAMMER. **Photoautotrophic polyhydroxybutyrate granule formation is regulated by cyanobacterial phasin PhaP in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.** Applied and Environmental Microbiology 81, no. 13 (2015): 4411-4422.

HAZER, B.; STEINBUCHEL, A. **Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 74, p. 1-12, 2007.

Hazer, Baki, Alexander Steinbüchel. **Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications.** Applied Microbiology and Biotechnology 74 (2007): 1-12.

HEATHER A. LESLIE, MARTIN J.M. VAN VELZEN, SICCO H. BRANDSMA, A. DICK VETHAAK, JUAN J. GARCIA-VALLEJO, MARJA H. LAMOREE.; **Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood.** Environment International, Volume 163, 2022, 107199, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>.

HECK, KARINA, GABRIELA SILVA MACHINESKI, DANILLO OLIVEIRA ALVARENGA, MARCELO GOMES MARÇAL VIEIRA VAZ, ALESSANDRO DE MELLO VARANI, AND MARLI FATIMA FIORE. **Evaluating methods for purifying cyanobacterial cultures by qPCR and high-throughput Illumina sequencing.** *Journal of Microbiological Methods* 129 (2016): 55-60.

HEIKRUJAM, J.; KISHOR, R.; BEHARI MAZUMDER, P. **The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols.** *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies.* IntechOpen, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.92206.

HEIN, SILKE, HAI TRAN, ALEXANDER STEINBÜCHEL. **Synechocystis sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria.** *Archives of microbiology* 170 (1998): 162-170.

HERVÉ MILLET, PATRICIA VANGHELUWE, CHRISTIAN BLOCK, ARJEN SEVENSTER, LEONOR GARCIA ROMANOS ANTONOPOULOS, **The Nature of Plastics and Their Societal Usage,** in *Plastics and the Environment*, 2018, pp. 1-20 DOI: 10.1039/9781788013314-00001

HEUER, HOLGER, MARTIN KRSEK, PAUL BAKER, KORNELIA SMALLA, EM WELLINGTON. **Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients.** *Applied and environmental microbiology* 63, no. 8 (1997): 3233-3241.

HONG K, BELD J, DAVIS TD, BURKART MD, PALENIK B. **Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene PhaC in cyanobacteria.** *J Phycol.* 2021 Jun;57(3):754-765. doi: 10.1111/jpy.13123. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33350471.

HONG, K., BELD, J., DAVIS, T. D., BURKART, M. D., PALENIK, B. (2021). **Screening and characterization of polyhydroxyalkanoate granules, and phylogenetic analysis of polyhydroxyalkanoate synthase gene PhaC in cyanobacteria.** *Journal of Phycology*, 57(3), 754–765. doi:10.1111/jpy.13123

HUANG IS, ZIMBA PV. **Cyanobacterial bioactive metabolites-A review of their chemistry and biology.** *Harmful Algae.* 2019 Mar;83:42-94. doi:

10.1016/j.hal.2018.11.008. Epub 2019 Feb 22. Erratum in: Harmful Algae. 2019 Jun;86:139-209. PMID: 31097255.

HUISMAN, GJALT W., ERIC WONINK, ROB MEIMA, BERT KAZEMIER, PETER TERPSTRA, BERNARD WITHOLT. **Metabolism of poly (3-hydroxyalkanoates)(PHAs) by Pseudomonas oleovorans. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA.** Journal of Biological Chemistry 266, no. 4 (1991): 2191-2198.

HUPFER, MICHAEL, STEFANIE GLÖSS, PETER SCHMIEDER, HANS-PETER GROSSART. **Methods for detection and quantification of polyphosphate and polyphosphate accumulating microorganisms in aquatic sediments.** International Review of Hydrobiology 93, no. 1 (2008): 1-30.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION OFFICE **ISO 10993-1:2018 : BIOCOMPATIBILITY.**

J. M. RODRIGUEZ-ANTON, L. RUBIO-ANDRADA, M. S. CELEMÍN-PEDROCHE, M. D. M. ALONSO-ALMEIDA (2019) **Analysis of the relations between circular economy and sustainable development goals**, International Journal of Sustainable Development & World Ecology, 26:8, 708-720, DOI: 10.1080/13504509.2019.1666754

JAISWAL, AMAN, DEEPAK KUMAR KOLI, AJAY KUMAR, SHEKHAR KUMAR, SWATI SAGAR. **Pigments analysis of cyanobacterial strains.** Int. J. Chem. Stud 6, no. 2 (2018): 1248-1251.

JANSSEN, MARCEL, JOHANNES TRAMPER, LUUC R. MUR, RENE H. WIJFFELS. **Enclosed outdoor photobioreactors: Light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects.** Biotechnology and bioengineering 81, no. 2 (2003): 193-210.

JAVOR, B. J. **Industrial microbiology of solar salt production.** Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 28 (2002): 42-47.

JENDROSSEK, D. **Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes).** Journal of bacteriology 191, no. 10 (2009): 3195-3202.

JIANG, GUOZHAN, DAVID J. HILL, MAREK KOWALCZUK, BRIAN JOHNSTON, GRAZYNA ADAMUS, VICTOR IRORERE, IZA RADECKA. **Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery.** International journal of molecular sciences 17, no. 7 (2016): 1157.

JIANG, Y.; MARANG, L.; KLEEREBEZEM, R.; MUYZER, G.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. **Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture.** Biotechnol. Bioeng. 2011, 108, 2022–2035.

JUTERŠEK, M., KLEMENČIČ, M., DOLINAR, M. (2017). **Discrimination between Synechocystis members (cyanobacteria) based on heterogeneity of their 16S rRNA and ITS regions.** Acta Chimica Slovenica, 64(4), 804-817.

KALIA, V. C.; LAL, S.; CHEEMA, S. **Insight into the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer.** Gene, v. 389, n. 1, p. 19-26, 2007. doi:10.1016/j.gene.2006.09.010.

KALIA, VIPIN CHANDRA, SUBHASREE RAY, SANJAY KS PATEL, MAMTESH SINGH, AND GAJENDRA PRATAP SINGH. **The dawn of novel biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates.** Springer Singapore, 2019.

KALOGERAKIS N, KARKANORACHAKI K, KALOGERAKIS GC, TRIANTAFYLLIDI EI, GOTSIS AD, PARTSINEVELOS P AND FAVA F (2017) **Microplastics Generation: Onset of Fragmentation of Polyethylene Films in Marine Environment Mesocosms.** Front. Mar. Sci. 4:84. doi: 10.3389/fmars.2017.00084

KAMRAVAMANESH D, PFLÜGL S, NISCHKAUER W, LIMBECK A, LACKNER M, HERWIG C. **Photosynthetic poly- β -hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6714.** AMB Express. 2017;7(1):143. DOI: 10.1186/s13568-017-0443-9. Epub 2017 Jul 6

KAPLAN, DAVID L. **Introduction to biopolymers from renewable resources.** In **Biopolymers from renewable resources**, pp. 1-29. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998.

KJERFVE, BJÖRN, C. A. F. SCHETTINI, BASTIAAN KNOPPERS, GUILHERME LESSA, H. O. FERREIRA. **Hydrology and salt balance in a large, hypersaline**

coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. *Estuarine, coastal and shelf science* 42, no. 6 (1996): 701-725.

KLOTZ A, FORCHHAMMER K. **Glycogen, a major player for bacterial survival and awakening from dormancy.** *Future Microbiol.* 2017;12:101. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0218>.

KLOTZ, ALEXANDER, JENS GEORG, LENKA BUČINSKÁ, SATORU WATANABE, VIKTORIA REIMANN, WITOLD JANUSZEWSKI, ROMAN SOBOTKA, DIETER JENDROSSEK, WOLFGANG R. HESS, AND KARL FORCHHAMMER. **Awakening of a dormant cyanobacterium from nitrogen chlorosis reveals a genetically determined program.** *Current Biology* 26, no. 21 (2016): 2862-2872.

KOCH, M.; DOELLO, S.; GUTEKUNST, K.; FORCHHAMMER, K. **PHB is Produced from Glycogen Turn-over during Nitrogen Starvation in Synechocystis sp. PCC 6803.** *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1942. <https://doi.org/10.3390/ijms20081942>.

KOCH, M.; FORCHHAMMER, K. **Polyhydroxybutyrate: a useful product of chlorotic cyanobacteria.** *Microbial Physiology*, v. 31, n. 2, p. 67-77, 2021.

KOLLER, M, RODRÍGUEZ-CONTRERAS, A. **Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra-and extracellular PHA.** *Engineering in Life Sciences* 15, no. 6 (2015): 558-581.

KOLLER, M., BRAUNEGG G.; **Advanced approaches to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable and economic fashion.** *EuroBiotech J* 2, no. 2 (2018): 89-103.

KOLLER, M., BRAUNEGG G.; **Potential and prospects of continuous polyhydroxyalkanoate (PHA) production.** *Bioengineering* 2, no. 2 (2015): 94-121.

KOLLER, MARTIN, ed. **The Handbook of Polyhydroxyalkanoates: Microbial Biosynthesis and Feedstocks.** CRC Press, 2020.

KOLLER, M., NIEBELSCHÜTZ, H, BRAUNEGG, G. **Strategies for recovery and purification of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates](PHA) biopolyesters from surrounding biomass.** *Engineering in Life Sciences* 13, no. 6 (2013): 549-562.

KOLLER, MARTIN. **Cyanobacterial polyhydroxyalkanoate production: status quo and quo vadis?**. *Current Biotechnology* 4.4 (2015): 464-480.

KOMÁREK, J. (2016). **A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications**. *European Journal of Phycology*, 51(3), 346–353. doi:10.1080/09670262.2016.116373810.1080/09670262.2016.1163738

KOMÁREK, J, ANAGNOSTIDIS, K. Süßwasserflora von Mitteleuropa, bd. 19/2: **Cyanoprokaryota: Oscillatoriales**. Spektrum Akademischer Verlag. 19 (2005): 1-759.

KOPINKE, F.-D.; MACKENZIE, K. **Mechanistic aspects of the thermal degradation of poly(lactic acid) and poly(β -hydroxybutyric acid)**. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 40-41, p. 43-53, 1997. DOI: 10.1016/S0165-2370(97)00022-3.

KOZOWYK, P. R. B., SORESSI, M., POMSTRA, D., LANGEJANS, G. H. J. (2017). **Experimental methods for the Paleolithic dry distillation of birch bark: implications for the origin and development of Neandertal adhesive technology**. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-08106-7

KUČERA, F.; PETRUŠ, J.; JANČÁŘ, J. **The structure-hydrolysis relationship of poly(3-hydroxybutyrate)**. *Polymer Testing*, v. 80, p. 106095, 2019. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.106095.

KUMAR, R.; VERMA, A.; SHOME, A.; SINHA, R.; SINHA, S.; JHA, P.K.; KUMAR, R.; KUMAR, P.; SHUBHAM; DAS, S.; SHARMA, P.; VARA PRASAD, P.V. **Impacts of Plastic Pollution on Ecosystem Services, Sustainable Development Goals, and Need to Focus on Circular Economy and Policy Interventions**. *Sustainability* 2021, 13, 9963. <https://doi.org/10.3390/su13179963>

KUMARAN, SURJITH KUMAR, MANIKA CHOPRA, EUNA OH, HYO-JICK CHOI. **Biopolymers and natural polymers**. In *Polymer Science and Nanotechnology*, pp. 245-256. Elsevier, 2020.

LACKNER M. **Bioplastics—Biobased plastics as renewable and/or biodegradable alternatives to petroplastics**. In: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. New York, USA: Wiley; 2015

LADAKIS, MANOS, MANOS DASSENAKIS, ADRIANI PANTAZIDOU. **Nitrogen and phosphorus in coastal sediments covered by cyanobacteria mats** (9 pp). Journal of Soils and Sediments 6 (2006): 46-54.

LADE BD, PATIL AS, PAIKRAO HM. **Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol**. SpringerPlus. 2014 Dec;3(1):1-7.

LADE, BIPIN DEOCHAND, ANITA SURENDRA PATIL, HARIPRASSAD MADHUKARRAO PAIKRAO. **Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol**. SpringerPlus 3.1 (2014): 1-7.

LAGEVEEN, ROLAND G., GJALT W. HUISMAN, HANS PREUSTING, PETER KETELAAR, GERRIT EGGINK, AND BERNARD WITHOLT. **Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates**. Applied and environmental microbiology 54, no. 12 (1988): 2924-2932.

LALOKNAM, SURASAK, SUPAPORN SIRISOPANA, SOMKIAT PHORNPHISUTTHIMAS, TERUHIRO TAKABE, ARAN INCHAROENSAKDI. **Removal of mercury, arsenic and cadmium in synthetic wastewater by cyanobacterium *Aphanothece halophytica***. NU Sci J 6 (2009): 96-104.

LANE, C. E.; BENTON, M. G. **Detection of the enzymatically-active polyhydroxyalkanoate synthase subunit gene, *phaC* , in cyanobacteria via colony PCR**. Molecular and Cellular Probes, v. 29, n. 6, p. 454-460, 2015. doi:10.1016/j.mcp.2015.07.001;

LANE, D. J. (1991). **16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. New York, NY, John Wiley and Sons: 115-175

LAU, N.-S., MATSUI, M., ABDULLAH, A. A.-A. **Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products**. BioMed Research International, 2015, 1–9. doi:10.1155/2015/754934, 2015.

LAUZIER, CHRISTIAN A., CLEVYS J. MONASTERIOS, ILIE SARACOVAN, R. H. MARCHESSAULT, AND BRUCE A. RAMSAY. **Film formation and paper coating with poly ([beta]-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex.** Tappi Journal;(United States) 76, no. 5, 1993.

LEE, H., KUNZ, A., SHIM, W.J. *ET AL.* **Microplastic contamination of table salts from Taiwan, including a global review.** Sci Rep 9, 10145 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46417-z>, (2019).

LEMOIGNE, MAURICE. **Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid.** Bull Soc Chem Biol 8 p. 770-782, 1926.

LENZ, R. W., MARCHESSAULT, R. H. (2005). Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules*, 6(1), 1–8. doi:10.1021/bm049700c

LESLIE, H. A., VAN VELZEN, M. J., BRANDSMA, S. H., VETHAAK, A. D., GARCIA-VALLEJO, J. J., & LAMOREE, M. H. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment international*, v. 163, p. 107199, 2022.

LILLO JG, RODRIGUEZ-VALERA F. Effects of culture conditions on poly (β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990 Aug;56(8):2517-21.

LIMA, A. O., GARCES, S. P. "Intragenetic primer design: Bringing bioinformatics tools to the class." *Biochemistry and Molecular Biology Education* 34, no. 5 (2006): 332-337.

LÓPEZ-CUELLAR, M.R., ALBA-FLORES, J., GRACIDA RODRÍGUEZ, J.N., PÉREZ-GUEVARA, F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 48, Issue 1, 2011, Pages 74-80. ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.016>.

LOREINE HERMIDA SILVA E SILVA; CYNTHIA MOREIRA DAMAZIO & ANDERSON ANDRADE CAVALCANTI IESPA; Identificação de Cianobactérias em Sedimentos da Lagoa Pitanguinha, Estado do Rio de Janeiro, Brasil Identification of Cianobacterica in Sediments of the Pitanguinha Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil;

LOURENÇO, S. O.; Cultivo de Microalgas: Princípios e aplicações; São Carlos; Editora Rima - 2006; ; ISBN: 85-7656-113-1

LUCIA SILVESTRINI, BERNHARD DROSG INES FRITZ; Identification of Four Polyhydroxyalkanoate Structural Genes in *Synechocystis* cf. *salina* PCC6909: In silico Evidences;

MADISON, L. L., GJALT W. H.. "Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic." *Microbiology and molecular biology reviews* 63, no. 1 (1999): 21-53.

MANANGAN, T.; SHAWAPHUN, S. Quantitative extraction and determination of polyhydroxyalkanoate accumulated in *Alcaligenes latus* dry cells. *Science Asia*, v. 36, n. 3, p. 199-203, 2010.

MANO, ELOISA BIASOTTO. *Polímeros como materiais de engenharia*. Editora Blucher, 1991.

MARKL E, GRÜNBICHLER H, LACKNER M. PHB—Biobased and biodegradable replacement for PP: A review. *Novel Techniques in Nutrition and Food Science (NTNF)*. 2018;2(4):1-4

MATSON MM, ATSUMI S. Photomixotrophic chemical production in cyanobacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018;50:65-71

MEHRPOUYA, M., VAHABI, H., BARLETTA, M., LAHEURTE, P., LANGLOIS, V. Additive manufacturing of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers: Materials, printing techniques, and applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 127, p. 112216, 2021. ISSN 0928-4931. doi:10.1016/j.msec.2021.112216.

MEIXNER K, KOVALCIK A, SYKACEK E, GRUBER-BRUNHUMER M, DROSG B. Cyanobacteria biorefinery—Production of poly(3-hydroxybutyrate) with *Synechocystis salina* and utilisation of residual biomass. *Journal of Biotechnology*. 2018;265:46-53

MEIXNER, K.; DAFFERT, C.; BAUER, L.; DROSG, B.; FRITZ, I. PHB Producing Cyanobacteria Found in the Neighborhood—Their Isolation, Purification and Performance Testing. *Bioengineering* 2022, 9, 178.

<https://doi.org/10.3390/bioengineering9040178>

MELO, RODRIGO DE SIQUEIRA, MARIA HELENA CAMPO BAETA NEVES, ODARA RAMÔA BAPTISTA. "Cultivo axênico das cianobactérias marinhas *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 e *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, 1849." *Acta Botanica Brasilica* 25 (2011): 234-240.

MEZZINA, MARIELA P., M. JULIA PETTINARI. "Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins." *Applied and environmental microbiology* 82, no. 17 (2016): 5060-5067.

MILLER, M.E., HAMANN, M., KROON, F.J. Bioaccumulation and biomagnification of microplastics in marine organisms: A review and meta-analysis of current data. *PLoS ONE* 15(10): e0240792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240792>. 2020.

MILLET, H.; VANGHELUWE, P.; CHRISTIAN BLOCK, ARJEN SEVENSTER, LEONOR GARCIA AND ROMANOS ANTONOPOULOS; The Nature of Plastics and Their Societal Usage , in *Plastics and the Environment*, 2018, pp. 1-20 DOI: 10.1039/9781788013314-00001

MIRIAM, LR MONISHA, R. EDWIN RAJ, AJITH J. KINGS, M. ADHI VISVANATHAN. "Identification and characterization of a novel biodiesel producing halophilic *Aphanothece halophytica* and its growth and lipid optimization in various media." *Energy Conversion and Management* 141 (2017): 93-100.

MONTENEGRO, E., DELABARY, G., SILVA, M., ANDREOTE, F., LIMA, A. (2017). Molecular Diagnostic for Prospecting Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacteria. *Bioengineering*, 4(4), 52. doi:10.3390/bioengineering4020052; PMID: 28952531; PMCID: PMC5590472.

MOŽEJKO-CIESIELSKA J, KIEWISZ R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*. 2016;192:271-282

MRAVEC, FILIP, STANISLAV OBRUCA, VLADISLAV KRZYZANEK, PETR SEDLACEK, KAMILA HRUBANOVA, OTA SAMEK, DAN KUCERA, PAVLA BENESOVA, JANA NEBESAROVA. "Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy." *FEMS microbiology letters*

363, no. 10 (2016): fnw094.

MUHAMMADI, SHABINA, MUHAMMAD AFZAL, SHAFQAT HAMEED. "Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications." *Green Chemistry Letters and Reviews* 8, no. 3-4 (2015): 56-77.

NILSEN-NYGAARD, JULIE, ESTEFANÍA NORIEGA FERNÁNDEZ, TANJA RADUSIN, BJØRN TORE ROTABAKK, JAWAD SARFRAZ, NUSRAT SHARMIN, MORTEN SIVERTSVIK, IZUMI SONE, MARIT KVALVÅG PETTERSEN. "Current status of biobased and biodegradable food packaging materials: Impact on food quality and effect of innovative processing technologies." *Comprehensive reviews in food science and food safety* 20, no. 2 (2021): 1333-1380.

NORTH, EMILY J.; HALDEN, ROLF U. *Plastics and environmental health: the road ahead* *Reviews on Environmental Health*, vol. 28, no. 1, 2013, pp. 1-8. <https://doi.org/10.1515/reveh-2012-0030>.

NOVELLI, LAURA DE DONNO, SARAH MORENO SAYAVEDRA, ELDON R. RENE. "Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives." *Bioresource Technology* 331 (2021): 124985.

NÜBEL, ULRICH, Ferran Garcia-Pichel, and Gerard Muyzer. **PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria**. *Applied and environmental microbiology* 63, no. 8 (1997): 3327-3332.

OBRUCA, STANISLAV, PETR SEDLACEK, EVA SLANINOVA, INES FRITZ, CHRISTINA DAFFERT, KATHARINA MEIXNER, ZUZANA SEDRLOVA, AND MARTIN KOLLER. **Novel unexpected functions of PHA granules**. *Applied microbiology and biotechnology* 104 (2020): 4795-4810.

OBULISAMY, PARTHIBA KARTHIKEYAN, SANJEET MEHARIYA. **Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: a review**. *Bioresource Technology* 325 (2021): 124653.

OECD. **Global Plastics Outlook: Policy Scenarios to 2060**. OECD Publishing, Paris,

2022. <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>.

OEDING, VOLKER, HANS G. SCHLEGEL. **β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism.** *Biochemical Journal* 134, no. 1 (1973): 239-248.

OKUZUMI, M., HIRAISHI, A., KOBAYASHI, T., FUJII, T. ***Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44, no. 4 (1994): 631-636.

OSTLE, A. G., HOLT, J. G., **Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate.** *Appl. Environ. Microb.* 1982, 44, 238–241.

OU, YU, SHUYA XU, DANDAN ZHU, XUEGAN YANG. **Molecular mechanisms of exopolysaccharide from *Aphanothece halaphytica* (EPSAH) induced apoptosis in HeLa cells.** *PLoS One* 9, no. 1 (2014): e87223.

OKONECHNIKOV K, GOLOSOVA O, FURSOV M, THE UGENE TEAM. **Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit** . *Bioinformatics* 2012 28: 1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091

PAGLIANO, GIORGIA; GALLETTI, PAOLA; SAMORI, CHIARA; ZAGHINI, AGNESE; TORRI, CRISTIAN;. **Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A review.** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9 (2021): 624021.

PANDA B, MALLICK N. **Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803.** *Letters in applied microbiology.* 2007 Feb 1;44(2):194-8.

PARODI A, D'AMBROSIO M, MAZZOCCHETTI L, MARTINEZ GA, SAMORI C, TORRI C, GALLETTI P. **Chemical recycling of polyhydroxybutyrate (PHB) into bio-based solvents and their use in a circular PHB extraction.** *ACS Sustainable Chemistry & Engineering.* 2021 Sep 6;9(37):12575-83.

PICK, U., & RACHUTIN-ZALOGIN, T. (2012). **Kinetic anomalies in the interactions of Nile red with microalgae.** *Journal of Microbiological Methods*, 88(2), 189–196.

doi:10.1016/j.mimet.2011.10.008;

PONIEDZIAŁEK, BARBARA, HALINA I. FALFUSHYNSKA, PIOTR RZYMSKI. **Flow cytometry as a valuable tool to study cyanobacteria: A mini-review.** Limnological Review 17, no. 2 (2017): 89-95.

PRICE S, KUZHIUMPARAMBIL U, PERNICE M, RALPH P. **Techno-economic analysis of cyanobacterial PHB bioplastic production.** Journal of Environmental Chemical Engineering. 2022 Jun 1;10(3):107502

PRICE, SHAWN, MATHIEU PERNICE, DONNA SUTHERLAND, UNNIKRISHNAN KUZHIUMPARAMBIL, PETER RALPH. **Assessing the suitability of domestic wastewater as a medium for cyanobacterial Phb bioplastic production.** Available at SSRN 3960547 (2021).

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O MEIO AMBIENTE. (2018). **Tackling Plastic Pollution: Legislative Guide for the Regulation of Single-Use Plastic Products** (unep.org). Nairobi: Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. Disponível em: Tackling Plastic Pollution: Legislative Guide for the Regulation of Single-Use Plastic Products (unep.org), 2020, ISBN No:978-92-807-3853-7

PROVENCHER, J. F., BOND, A. L., AVERY-GOMM, S., BORRELLE, S. B., BRAVO REBOLLEDO, E. L., HAMMER, S., VAN FRANEKER, J. A. (2017). **Quantifying ingested debris in marine megafauna: A review and recommendations for standardization.** Analytical Methods, 9(9), 1454–1469. <https://doi.org/10.1039/c6ay02419j>

PULINGAM, THIRUCHELVI, JIMMY NELSON APPATURI, THAIGARAJAN PARUMASIVAM, AZURA AHMAD, KUMAR SUDESH. **Biomedical applications of polyhydroxyalkanoate in tissue engineering.** Polymers 14, no. 11 (2022): 2141.

RAGUSA, A., SVELATO, A., SANTACROCE, C., CATALANO, P., NOTARSTEFANO, V., CARNEVALI, O., PAPA, F., RONGIOLETTI, M.C.A., BAIOTTO, F., DRAGHI, S., D'AMORE, E., RINALDO, D., MATTA, M., GIORGINI, E. **Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta.** Environ Int, Volume 146, 2021, 106274. ISSN 0160-4120. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>.

RAHMAN, ARIFUR, SARKAR, ATANU, YADAV, OM PRAKASH, ACHARI, GOPAL, SLOBODNIK, JAROSLAV. **Potential human health risks due to environmental exposure to nano-and microplastics and knowledge gaps: A scoping review.** *Science of the Total Environment*. Volume 757, 2021, 143872.

RAHMAN, M.S.; HASAN, M.S.; NITAI, A.S.; NAM, S.; KARMAKAR, A.K.; AHSAN, M.S.; SHIDDIKY, M.J.A.; AHMED, M.B. **Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose.** *Polymers* 2021, 13, 1345. <https://doi.org/10.3390/polym13081345>

RAMOS, VITOR MC, RAQUEL CASTELO-BRANCO, PEDRO N. LEAO, JOANA MARTINS, SINDA CARVALHAL-GOMES, FREDERICO SOBRINHO DA SILVA, JOAO G. MENDONCA FILHO, VITOR M. VASCONCELOS. **Cyanobacterial diversity in microbial mats from the hypersaline lagoon system of Araruama, Brazil: An in-depth polyphasic study.** *Frontiers in Microbiology* 8 (2017): 1233.

RAY, SUBHASREE, KALIA, VIPIN CHANDRA. **Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates.** *Indian journal of microbiology* 57, no. 3 (2017): 261-269.

READ, Q. D., BROWN, S., CUÉLLAR, A. D., FINN, S. M., GEPHART, J. A., MARSTON, L. T., MUTH, M. K. (2019). **Assessing the environmental impacts of halving food loss and waste along the food supply chain.** *Science of The Total Environment*, 136255. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.136255
10.1016/j.scitotenv.2019.136255.

REDDY VUN, RAMANAIAH SV, REDDY MV, CHANG YC. **Review of the Developments of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs).** *Bioengineering (Basel)*. 2022 May 21;9(5):225. doi: 10.3390/bioengineering9050225. PMID: 35621503; PMCID: PMC9137849.

REES, GAVIN N., GEORGE VASILADIS, JOHN W. MAY, RONALD C. BAYLY. **Differentiation of polyphosphate and poly- β -hydroxybutyrate granules in an *Acinetobacter* sp. isolated from activated sludge.** *FEMS microbiology letters* 94, no. 1-2 (1992): 171-173.

REHM, B. H. A. (2003). **Polyester synthases: natural catalysts for plastics.** *Biochemical Journal*, 376(1), 15–33. doi:10.1042/bj20031254

REN, Q.; RUTH, K.; THONY-MEYER, L.; ZINN, M. **Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives**. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 87, p. 41-52, 2010.

REN, QUN, ANDREAS GRUBELNIK, MIRJAM HOERLER, KATINKA RUTH, RENÉ HARTMANN, HELENE FELBER, MANFRED ZINN. **Bacterial poly (hydroxyalkanoates) as a source of chiral hydroxyalkanoic acids**. Biomacromolecules 6, no. 4 (2005): 2290-2298.

REZADOOST, M.H., KORDROSTAMI, M. & KUMLEH, H.H. **An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants**. Biotech 6, 61 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0375-0>

RICHARDSON, J. W., JOHNSON, M. D., & OUTLAW, J. L. (2012). **Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest**. Algal Research, 1(1), 93–100. doi:10.1016/j.algal.2012.04.00110.1016/j.algal.2012.04.001

RIIS, V., W. MAI. **Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis**. Journal of Chromatography A 445, 285-289, 1988.

RIPPKA, R. (1988). [1] Isolation and purification of cyanobacteria. Cyanobacteria, 3–27. doi:10.1016/0076-6879(88)67004-2

ROBERT J. CAPON, ROBERT W. DUNLOP, EMILLO L. GHISALBERTI, PHILLIP R. JEFFERIES. **Poly-3-hydroxyalkanoates from marine and freshwater cyanobacteria**, Phytochemistry, Volume 22, Issue 5, 1983, Pages 1181-1184, ISSN 0031-9422, [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(83\)80217-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(83)80217-9).

MELO, R. S.; BAETA NEVES, M.H.C.; BAPTISTA, O. R. **Cultivo axênico das cianobactérias marinhas *Aphanothece halophytica* Frémy, 1933 e *Chroococcus minutus* (Kützing) Nägeli, 1849;**

RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F.; RAMOS-CORMENZANA, A. (1980). SHORT COMMUNICATION **Isolation of Extremely Halophilic Bacteria Able to Grow in Defined Inorganic Media with Single Carbon Sources**. Microbiology,

119(2), 535–538. doi:10.1099/00221287-119-2-535

ROH, HYEJIN, JEONG SEOP LEE, HONG IL CHOI, YOUNG JOON SUNG, SUN YOUNG CHOI, HAN MIN WOO, SANG JUN SIM. **Improved CO₂-derived polyhydroxybutyrate (PHB) production by engineering fast-growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973 for potential utilization of flue gas.** *Bioresource technology* 327 (2021): 124789.

ROMEO J. **Do No Harm: Plastics are playing a major role in giving healthcare professionals the tools and capabilities they need to battle the COVID pandemic.** *Plastics Engineering*. 2020 May;76(5):41–4. doi: 10.1002/peng.20312. Epub 2020 May 6. PMID: PMC7267270.

ROSENBOOM, J.G., LANGER, R., TRAVERSO, G. **Bioplastics for a circular economy.** *Nat Rev Mater* 7, 117–137 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>

ROTTER A, BARBIER M, BERTONI F, BONES AM, CANCELA ML, CARLSSON J, CARVALHO MF, CEGŁOWSKA M, CHIRIVELLA-MARTORELL J, CONK DALAY M, CUETO M, DAILIANIS T, DENIZ I, DÍAZ-MARRERO AR, DRAKULOVIC D, DUBNIKA A, EDWARDS C, EINARSSON H, ERDOGAN A, EROLDOGAN OT, EZRA D, FAZI S, FITZGERALD RJ, GARGAN LM, GAUDÊNCIO SP, GLIGORA UDOVIC M, IVOŠEVIC DENARDIS N, JÓNSDÓTTIR R, KATARŽYTE M, KLUN K, KOTTA J, KTARI L, LJUBEŠIĆ Z, LUKIĆ BILELA L, MANDALAKIS M, MASSA-GALLUCCI A, MATIJOŠYTE I, MAZUR-MARZEC H, MEHIRI M, NIELSEN SL, NOVOVESKÁ L, OVERLINGE D, PERALE G, RAMASAMY P, REBOURS C, REINSCH T, REYES F, RINKEVICH B, ROBBENS J, RÖTTINGER E, RUDOVICA V, SABOTIC J, SAFARIK I, TALVE S, TASDEMIR D, THEODOTOU SCHNEIDER X, THOMAS OP, TORUNSKA-SITARZ A, VARESE GC, VASQUEZ MI. **The Essentials of Marine Biotechnology.** *Frontiers In marine science* 8 ,158, 2021.

ROTTER, ANA, MICHÉLE BARBIER, FRANCESCO BERTONI, ATLE M. BONES, M. LEONOR CANCELA, JENS CARLSSON, MARIA F. CARVALHO *ET AL.* **The essentials of marine biotechnology.**

SACCARDO, ALBERTO, FABRIZIO BEZZO, ELEONORA SFORZA. **Microalgae**

growth in ultra-thin steady-state continuous photobioreactors: assessing self-shading effects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 10, 977429, 2022.

SAHARAN, B. S.; GREWAL, B.; KUMAR, A. **Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates: a review on trends and latest developments.** *Chinese Journal of Biology*, p. 1-18, 2014.

SALLA, A. C. V., MARGARITES, A. C., SEIBEL, F. I., HOLZ, L. C., BRIÃO, V. B., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. (2016). **Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate.** *Bioresource Technology*, 209, 133-141.

SASIDHARAN, RAGHUL SUBIN, SARITA GANAPATHY BHAT, MUTHUSAMY CHANDRASEKARAN. **Amplification and sequence analysis of *phaC* gene of polyhydroxybutyrate producing *Vibrio azureus* BTKB33 isolated from marine sediments.** *Annals of microbiology* 66, no. 1 (2016): 299-306.

SATHYA, A.B., SIVASUBRAMANIAN, V., SANTHIAGU, A. *et al.* **Production of Polyhydroxyalkanoates from Renewable Sources Using Bacteria.** *J Polym Environ* 26, 3995–4012 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1259-7>.

SAKURAI H, MASUKAWA H, KITASHIMA M, INOUE K. **How Close We Are to Achieving Commercially Viable Large-Scale Photobiological Hydrogen Production by Cyanobacteria: A Review of the Biological Aspects.** *Life*. 2015; 5(1):997-1018. <https://doi.org/10.3390/life5010997>

SCHLEBUSCH, M., FORCHHAMMER, K.; **Requirement of the nitrogen starvation-induced protein SII0783 for polyhydroxybutyrate accumulation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.** *Applied and Environmental Microbiology* 76, no. 18 (2010): 6101-6107.

SCHWIER, C., KRISHNASWAMY, R.; **Polyhydroxyalkanoates (PHA) bioplastic packaging materials.** Report, Metabolix Inc, Cambridge (2010).

SEGAL RD, WAITE AM, HAMILTON DP. **Transition from planktonic to benthic algal dominance along a salinity gradient.** *Hydrobiologia*. 2006 Feb;556:119-35.

SENGCO, M. R., LI, A., TUGEND, K., KULIS, D., ANDERSON; D. M. 2001. **Removal of red- and brown-tide cells using clay flocculation. I. Laboratory culture experiments with *Gymnodinium breve* and *Aureococcus anophagefferens*.** Mar. Ecol. Prog. Ser. 210:41–53.

SEHGAL R, GUPTA R. **Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development.** 3 Biotech. 2020 Dec;10(12):549. doi: 10.1007/s13205-020-02550-5. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33269183; PMCID: PMC7686412.

SEKUROVA, OLGA N., OLHA SCHNEIDER, SERGEY B. ZOTCHEV. **Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering.** Microbial biotechnology 12, no. 5 (2019): 828-844.

SENIOR, PETER J., AND EDWIN A. DAWES. **The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*.** Biochemical Journal 134, no. 1 (1973): 225-238.

SERAFIM, LUÍSA S., PAULO C. LEMOS, CATERINA LEVANTESI, VALTER TANDOI, HELENA SANTOS, MARIA AM REIS. **Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms.** Journal of Microbiological Methods 51, no. 1 (2002): 1-18.

SHAMALA, T. R., ARUN CHANDRASHEKAR, S. V. N. VIJAYENDRA, L. KSHAMA. **Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR).** Journal of Applied Microbiology 94, no. 3 (2003): 369-374.

SHARMA, LAXUMAN, NIRUPAMA MALLICK. **Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light–dark cycles, N and P status and carbon sources.** Bioresource technology 96, no. 11 (2005): 1304-1310.

SHRIVASTAV, A., MISHRA, S. K., MISHRA, S. (2010). **Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India.** International Journal of Biological Macromolecules, 46(2), 255–260. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001
10.1016/j.ijbiomac.2010.01.001

SILVA, AMANDA LS, ELANE CL DOS SANTOS, ÍTALO AP DOS SANTOS, ANA MQ LÓPEZ. **Seleção polifásica de microrganismos produtores de polihidroxicanoatos.** Química nova 39 (2016): 782-788.

SINGH R, PARIHAR P, SINGH M, BAJGUZ A, KUMAR J, SINGH S, SINGH VP, PRASAD SM (2017) **Uncovering Potential Applications of Cyanobacteria and Algal Metabolites in Biology, Agriculture and Medicine. Current Status and Future Prospects.** Front. Microbiol. 8:515. doi: 10.3389/fmicb.2017.00515

SINGH SAHARAN, BALJEET, ANITA GREWAL, PARDEEP KUMAR. **Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates: a review on trends and latest developments.** Chinese Journal of Biology 2014 (2014).

SMITH, CYRIL STANLEY. **Materials and the Development of Civilization and Science: Empiricism and esthetic selection led to discovery of many properties on which material science is based.** Science 148, no. 3672 (1965): 908-917.

SOLAIMAN, DANIEL KY, RICHARD D. ASHBY. **Rapid genetic characterization of poly (hydroxyalkanoate) synthase and its applications.** Biomacromolecules 6, no. 2 (2005): 532-537.

SØRENSEN KB, CANFIELD DE, TESKE AP, OREN A. **Community composition of a hypersaline endoevaporitic microbial mat.** Appl Environ Microbiol. 2005 Nov;71(11):7352-65. doi: 10.1128/AEM.71.11.7352-7365.2005. PMID: 16269778; PMCID: PMC1287706.

SORGATTO, VANESSA GHIGGI, JULIO CESAR DE CARVALHO, EDUARDO BITTENCOURT SYDNEY, ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS, LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, CARLOS RICARDO SOCCOL. **Microscale direct transesterification of microbial biomass with ethanol for screening of microorganisms by its fatty acid content.** Brazilian Archives of Biology and Technology 62 (2019).

SOTO, LUIS ROMERO, EOIN BYRNE, ED WJ VAN NIEL, MAHMOUD SAYED, CRISTHIAN CARRASCO VILLANUEVA, RAJNI HATTI-KAUL. **Hydrogen and polyhydroxybutyrate production from wheat straw hydrolysate using Caldicellulosiruptor species and *Ralstonia eutropha* in a coupled process.**

Bioresource technology 272 (2019): 259-266.

SPIEKERMANN, PATRICIA, BERND HA REHM, RAINER KALSCHEUER, DIRK BAUMEISTER, AND ALEXANDER STEINBÜCHEL. **A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds.** Archives of microbiology 171 (1999): 73-80.

STAVRIANOS, L. S.; **A Global History: From Prehistory to the 21st Century** (7th ed.). Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall. 1998 [1970]. ISBN 978-0-13-923897-0

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. (2001). **Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms.** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 71, 81-123.

STEINBUCHER, A.; VALENTIN, H. E. **Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids.** FEMS Microbiology Letters, v. 128, n. 3, p. 219-228, 1995. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x.

STRYCEK, T., ACREMAN, J., KERRY, A., LEPPARD, G. G., NERMUT, M. V., KUSHNER, D. J. (1992). **Extracellular fibril production by freshwater algae and cyanobacteria.** Microbial Ecology, 23(1), 53–74. doi:10.1007/bf00165907

SURENDRAN, ARTHY, MANOJ LAKSHMANAN, JIUN YEE CHEE, AZLINAH MOHD SULAIMAN, DOAN VAN THUOC, KUMAR SUDESH. **Can polyhydroxyalkanoates be produced efficiently from waste plant and animal oils?.** Frontiers in bioengineering and biotechnology 8 (2020): 169.

SUZUKI, M.; TACHIBANA, Y.; KASUYA, KI. **Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments.** Polymer Journal, v. 53, 47–66 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41428-020-00396-5>.

TAIKHAO, SAMART, ARAN INCHAROENSAKDI, SARANYA PHUNPRUCH. **Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater.** Journal of applied

phycology 27 (2015): 187-196.

TAN, G. Y. A., CHEN, C. L., LI, L., GE, L., WANG, L., RAZAAD, I. M. N., WANG, J. Y. (2014). **Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review.** *Polymers*, 6(3), 706-754.

TAN, GIIN-YU AMY, CHIA-LUNG CHEN, LING LI, LIYA GE, LIN WANG, INDAH MUTIARA NINGTYAS RAZAAD, YANHONG LI, LEI ZHAO, YU MO, JING-YUAN WANG. **Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): a review.** *Polymers* 6, no. 3 (2014): 706-754.

TARAZONA, NATALIA A., RAINHARD MACHATSCHEK, JENNIFER BALCUCHO, JINNETH LORENA CASTRO-MAYORGA, JUAN F. SALDARRIAGA, ANDREAS LENDLEIN. **Opportunities and challenges for integrating the development of sustainable polymer materials within an international circular (bio) economy concept.** *MRS Energy & Sustainability* 9, no. 1 (2022): 28-34.

The future of plastic. (2018). *Nature Communications*, 9(1). doi:10.1038/s41467-018-04565-2

The Sustainable Development Goals Report 2022;
<https://unstats.un.org/sdgs/report/2022/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2022.pdf>

THIEL, T., BRAMBLE, J., ROGERS, S. **Optimum conditions for growth of cyanobacteria on solid media.** *FEMS Microbiology Letters*, 61(1-2), 27–32. doi:10.1111/j.1574-6968.1989.tb03546.x, 1989.

THIEL, VOLKER, MARTINA MERZ-PREIß, JOACHIM REITNER, WALTER MICHAELIS. **Biomarker studies on microbial carbonates: extractable lipids of a calcifying cyanobacterial mat (Everglades, USA).** *Facies* 36 (1997): 163-172.

THOMPSON, R. C., MOORE, C. J., VOM SAAL, F. S., SWAN, S. H. (2009). **Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153–2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053

THOMPSON, R. C., MOORE, C. J., VOM SAAL, F. S., SWAN, S. H.. **Plastics, the environment, and human health: current consensus and future trends.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2153–2166. doi:10.1098/rstb.2009.0053, 2009.

THOMPSON, R. C., SWAN, S. H., MOORE, C. J., & VOM SAAL, F. S. (2009). **Our plastic age.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1973–1976. doi:10.1098/rstb.2009.0054

THORAT GADGIL BS, KILLI N, RATHNA GVN. **Polyhydroxyalkanoates as biomaterials.** *Medchemcomm.* 2017 Jun 27;8(9):1774-1787. doi: 10.1039/c7md00252a. PMID: 30108887; PMCID: PMC6084198.

TIAN, J., SINSKEY, A. J., & STUBBE, J. (2005). **Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy.** *Journal of Bacteriology*, 187(11), 3814–3824. doi:10.1128/jb.187.11.3814-3824.2005

SANDLE, TIM - **Microbial identification**, Editor(s): Tim Sandle, Pharmaceutical Microbiology, Woodhead Publishing, 2016, Pages 103-113, ISBN 9780081000229, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100022-9.00009-8>.

TINDALL, DONALD R., JOHN H. YOPP, DONALD M. MILLER, WALTER E. SCHMID. "Physico-chemical parameters governing the growth of *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) in hypersaline media." *Phycologia* 17, no. 2 (1978): 179-185.

TRIPATHI, ABHISHEK DUTT, PRADEEP KUMAR MISHRA, KIANOUSH KHOSRAVI DARANI, APARNA AGARWAL, VEENA PAUL. **Hydrothermal treatment of lignocellulose waste for the production of polyhydroxyalkanoates copolymer with potential application in food packaging.** *Trends in Food Science & Technology* 123 p.:233-250, 2022.

TROSCHL, C., MEIXNER, K. DORSG, B., **Cyanobacterial PHA Production—Review of Recent Advances and a Summary of Three Years' Working Experience Running a Pilot Plant.** *Bioengineering*, 4(4), 26. doi:10.3390/bioengineering4020026, 2017.

TYO, KE., ZHOU, H., STEPHANOPOULOS, GN. **High-throughput screen for poly-3-hydroxybutyrate in Escherichia coli and Synechocystis sp. strain PCC6803.**

Appl Environ Microbiol. 2006 May;72(5):3412-7. PMID: 16672485; PMCID: PMC1472374. doi: 10.1128/AEM.72.5.3412-3417.2006.

UTSUNOMIA, CAMILA, REN, QUN, ZINN, MANFRED. **Poly(4-Hydroxybutyrate): Current State and Perspectives.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 8, p. 257, 2020. doi:10.3389/fbioe.2020.00257.

VAHABI, HENRI, ELAHEH ROHANI RAD, THIBAUT PARPAITE, VALÉRIE LANGLOIS, MOHAMMAD REZA SAEB. **Biodegradable polyester thin films and coatings in the line of fire: the time of polyhydroxyalkanoate (PHA)?**. Progress in Organic Coatings 133 (2019): 85-89.

VAN GEMERDEN H. **Microbial mats: a joint venture.** Marine Geology. 1993 Jul 1;113(1-2):3-25.

VERMEER, CHRIS M., MAAIKE NIELSEN, VINCENT ECKHARDT, MATTHIJS HORTENSIUS, JELMER TAMIS, STEPHEN J. PICKEN, GABRIE MH MEESTERS, ROBERT KLEEREBEZEM. **Systematic solvent screening and selection for polyhydroxyalkanoates (PHBV) recovery from biomass.** Journal of Environmental Chemical Engineering 10, no. 6 (2022): 108573.

VERLINDEN RA, HILL DJ, KENWARD M, WILLIAMS CD, RADECKA I (2007) **Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates.** J Appl Microbiol 102(6):1437–1449

VOLOVA, TATIANA G., ANATOLY N. BOYANDIN, AND SVETLANA V. PRUDNIKOVA. **Biodegradation of polyhydroxyalkanoates in natural soils.** Journal of Syberian University, Biology 2, p:152-157, 2015.

WATZER, BJÖRN, KARL FORCHHAMMER. **Cyanophycin: a nitrogen-rich reserve polymer.** UK: IntechOpen, 2018.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. J.; **16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.** Journal of bacteriology, 173(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>, 1991.

WILLIAMS, DAVID F. **On the mechanisms of biocompatibility.** *Biomaterials* 29, no. 20 (2008): 2941-2953.

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

YANG, JUNG EUN, SO YOUNG CHOI, JAE HO SHIN, SI JAE PARK, SANG YUP LEE. **Microbial production of lactate-containing polyesters.** *Microbial biotechnology* 6, no. 6 p: 621-636, 2013.

YARSLEY, VICTOR EMMANUEL, EDWARD GORDON COUZENS. **Plastics.** *Protesis clinica; periodico tecnico informativo para la profesion dental* 7, no. 8, 1946.

YELLORE, V., DESAI, A. **Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24.** *Letters in Applied Microbiology* 26, no. 6 p: 391-394, 1998.

ZHENG, WEIFA, CAIFA CHEN, QIPING CHENG, YIQIN WANG, CHENGCAI CHU. **Oral administration of exopolysaccharide from *Aphanothece halophytica* (Chroococcales) significantly inhibits influenza virus (H1N1)-induced pneumonia in mice.** *International immunopharmacology* 6, no. 7; 2006: 1093-1099.

APÊNDICE A – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

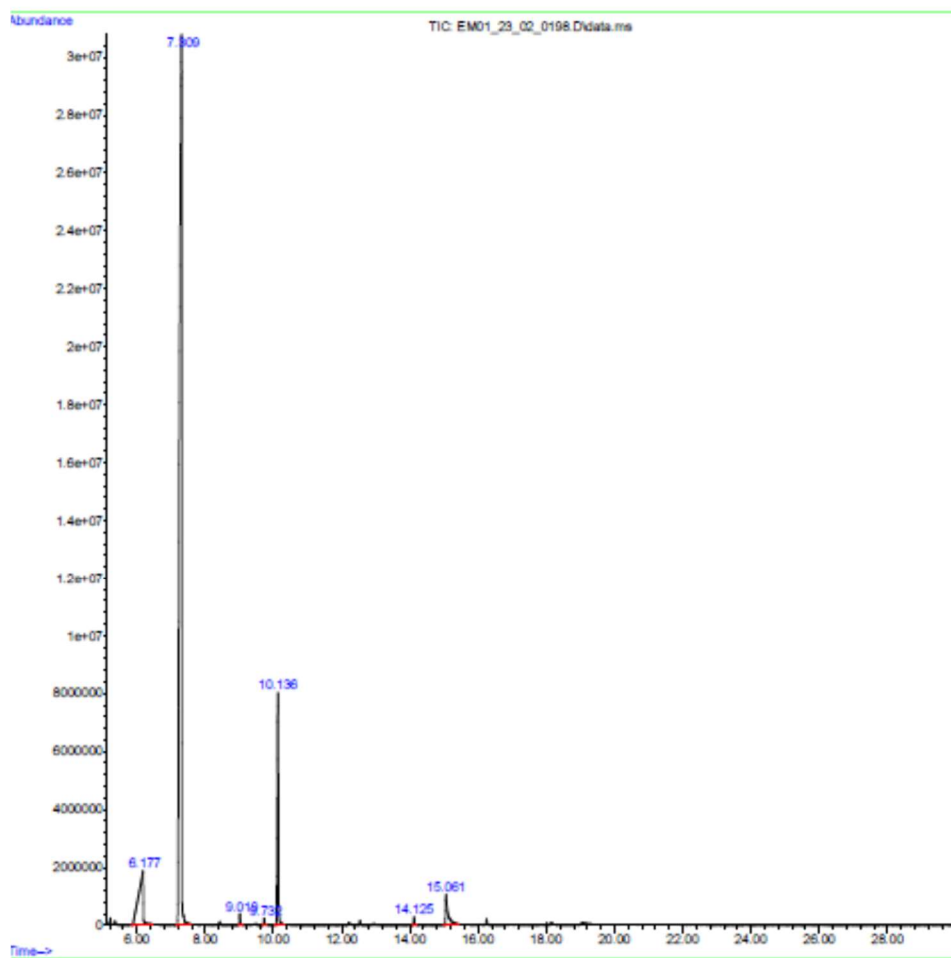
LISTA DE REAGENTES PARA PREPARO DE MEIO DE CULTURA - Meio f/2 - Guillard (100ml)				
FÓRMULA	NOME	QTD (g)		
		F/2 COMPLETO	F/2 -Si	F/2 INDUÇÃO
Estoque nitrato				
NaNO ₃	Nitrato de Sódio	7,50	7,50	
Estoque fosfato				
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Hidrogenofosfato de sódio	0,50	0,50	0,50
NaSiO ₃ ·9H ₂ O	Silicato de sódio nonahidratado			
Estoques primários de metais traço				
S1. Estoque de cobre				
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0,98	0,98	0,98
S2. Estoque de manganês				
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	Cloreto de manganês tetra hidratado	18,00	18,00	18,00
S3. Estoque de zinco				
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	sulfato de zinco heptahidratado	2,20	2,20	2,20
S4. Estoque de molibdênio				
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	molibdato de sódio dihidratado	0,63	0,63	0,63
S5. Estoque de cobalto				
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Cloreto de cobalto	1,00	1,00	1,00
Solução de Ferro quelado				
Na ₂ -EDTA	EDTA dissódico	4,36	4,36	4,36
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	Cloreto férrico	3,15	3,15	3,15
Estoque Vitaminas				
Tiamina		100mg	100mg	100mg
Cianocobalamina		0,5mg	0,5mg	0,5mg
Biotina		0,5mg	0,5mg	0,5mg
Esterilizar o estoque de vitaminas usando filtração em membrana porosidade 0,22um				
Tampão Tris (Tris hidroximetil aminometano)				
Tampão HEPES				

ANEXO A – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS

Data Path : C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\
Data File : EM01_23_02_0198.D
Acq On : 23 Feb 2023 16:34
Operator : Maria Elizabeth
Sample : DP1 - 1
Misc :
ALS Vial : 2 Sample Multiplier: 1

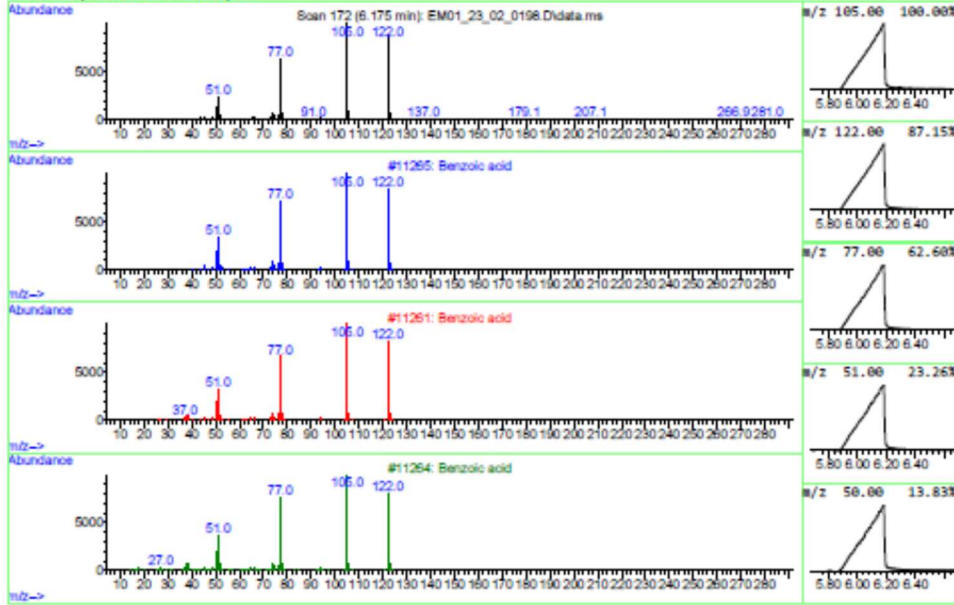
Search Libraries: D:\MassHunter\Library\NIST20.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e



Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



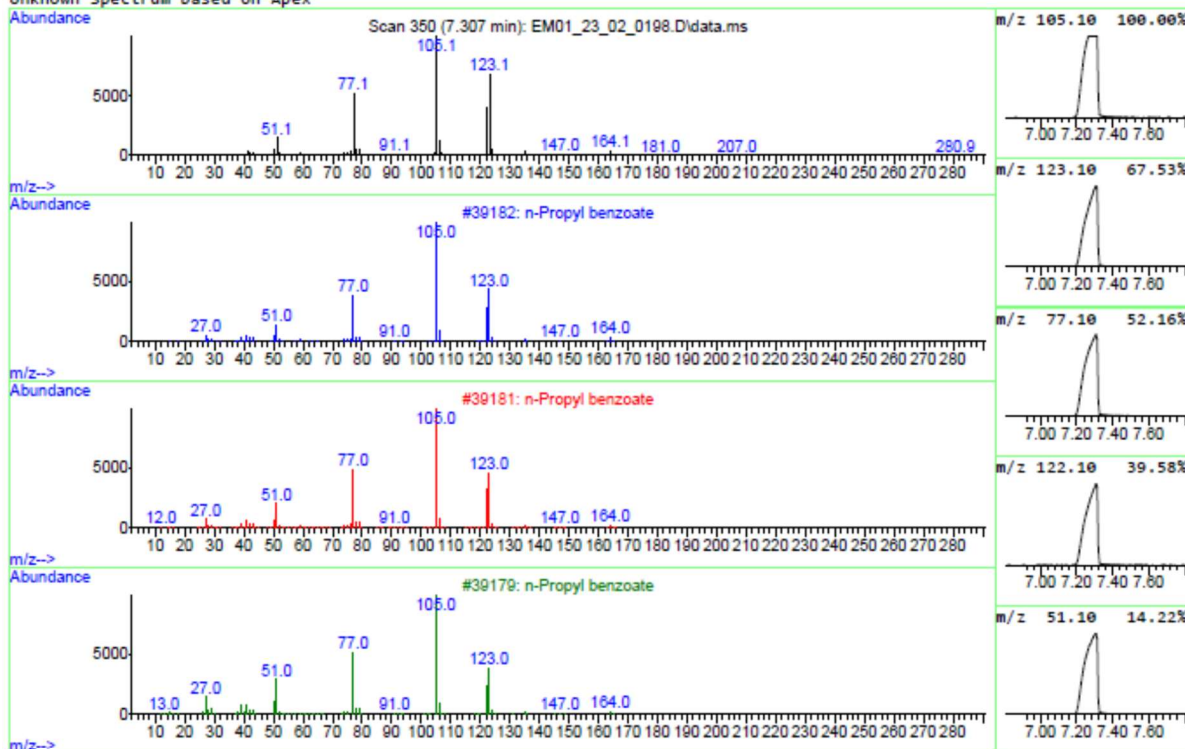
Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D
 Sample : 3P1 - 1

Peak Number: 1 at 6.177 min Area: 174985397 Area % 9.57

The 3 best hits from each library.			
	Ref\#	CAS\#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST08.L			
1 Benzoic acid	11265	000065-85-0	95
2 Benzoic acid	11261	000065-85-0	95
3 Benzoic acid	11264	000065-85-0	94

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D
 Sample : JP1 - 1

Peak Number: 2 at 7.309 min Area: 1417706154 Area % 77.55

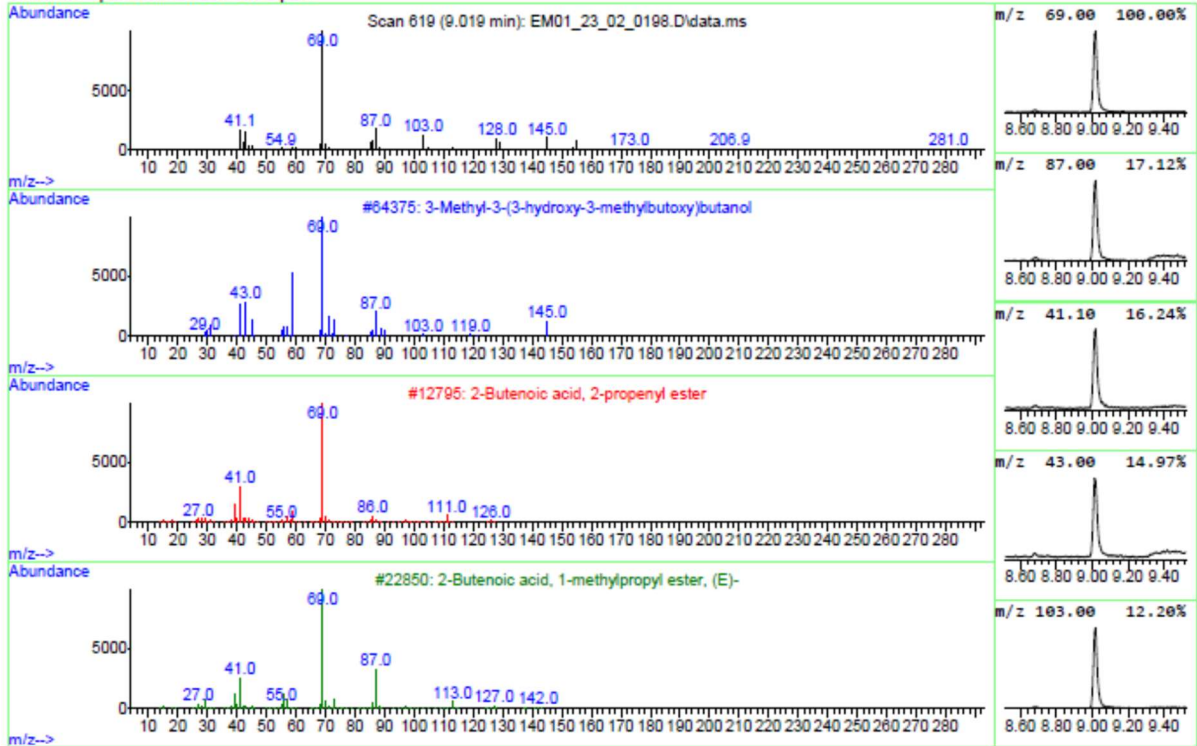
The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1	n-Propyl benzoate	39182 002315-68-6	91
2	n-Propyl benzoate	39181 002315-68-6	90
3	n-Propyl benzoate	39179 002315-68-6	87

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D

Sample : JP1 - 1

Peak Number: 3 at 9.019 min Area: 6334478 Area % 0.35

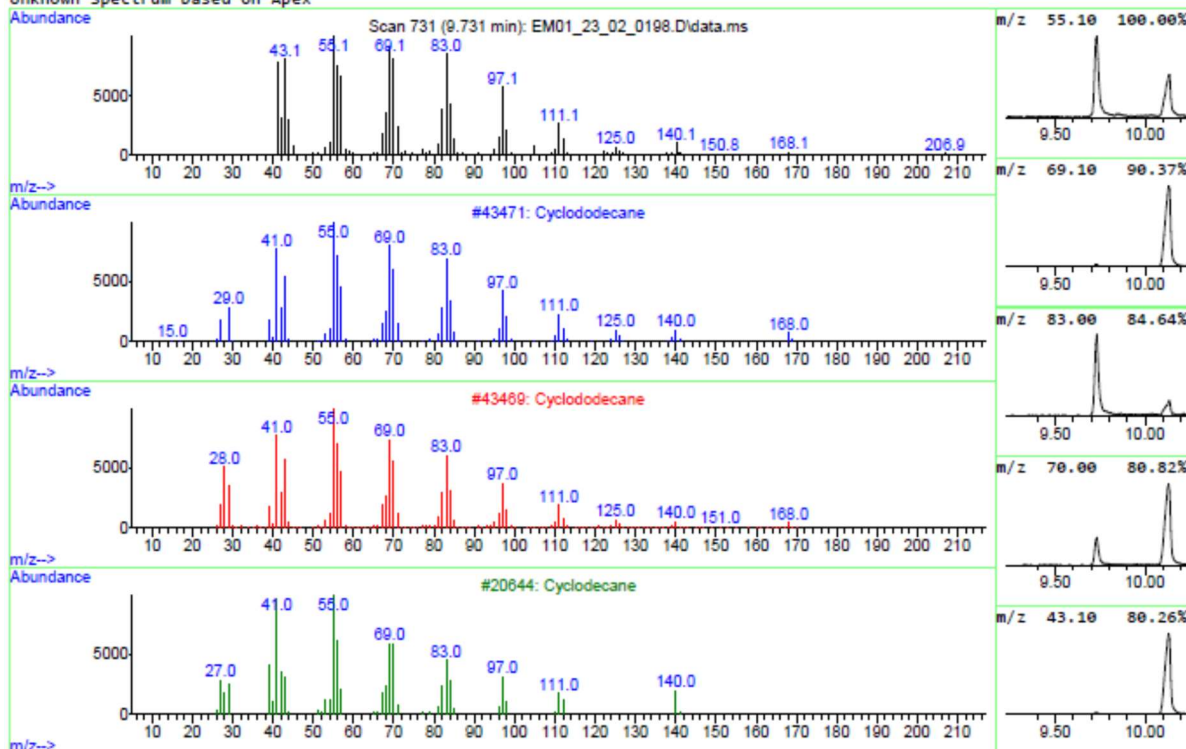
The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1	3-Methyl-3-(3-hydroxy-3-methylbu...	64375 1000432-16-8	38
2	2-Butenoic acid, 2-propenyl ester	12795 020474-93-5	28
3	2-Butenoic acid, 1-methylpropyl ...	22850 010371-45-6	28

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D
 Sample : JP1 - 1

Peak Number: 4 at 9.732 min Area: 3756232 Area % 0.21

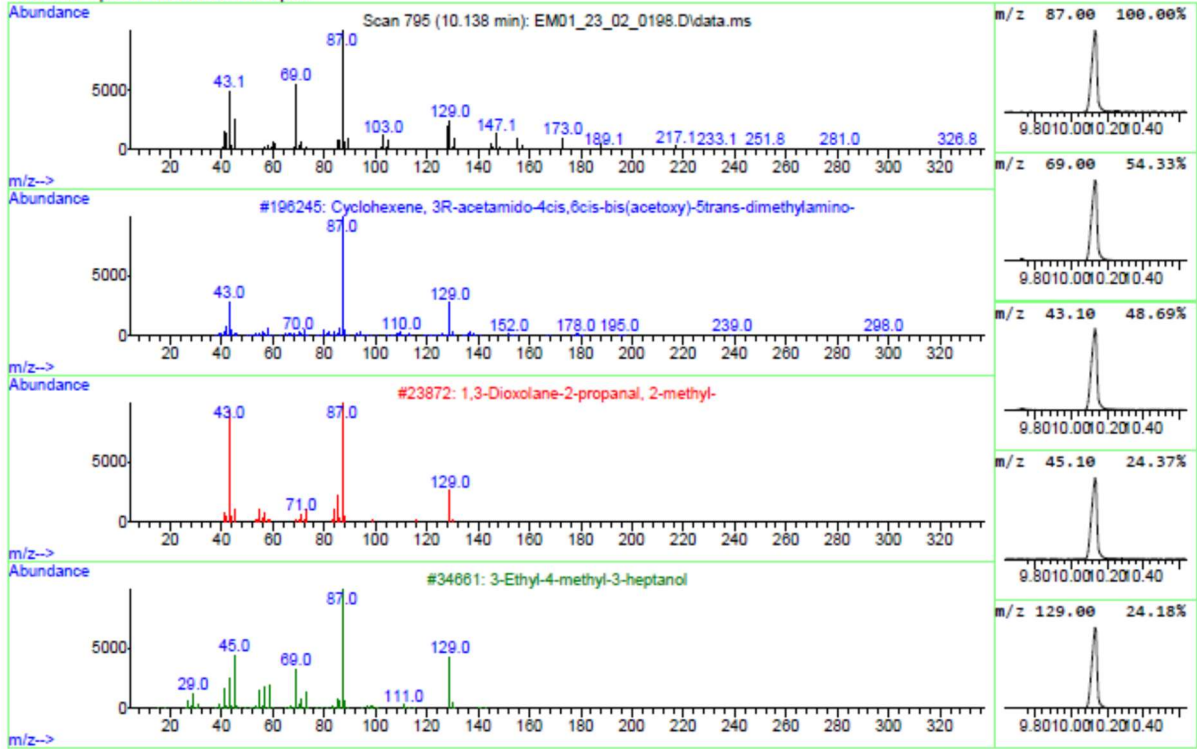
The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1		Cyclododecane	43471 000294-62-2 96
2		Cyclododecane	43469 000294-62-2 95
3		Cyclododecane	20644 000293-96-9 94

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEIREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D

Sample : JP1 - 1

Peak Number: 5 at 10.136 min Area: 172152175 Area % 9.42

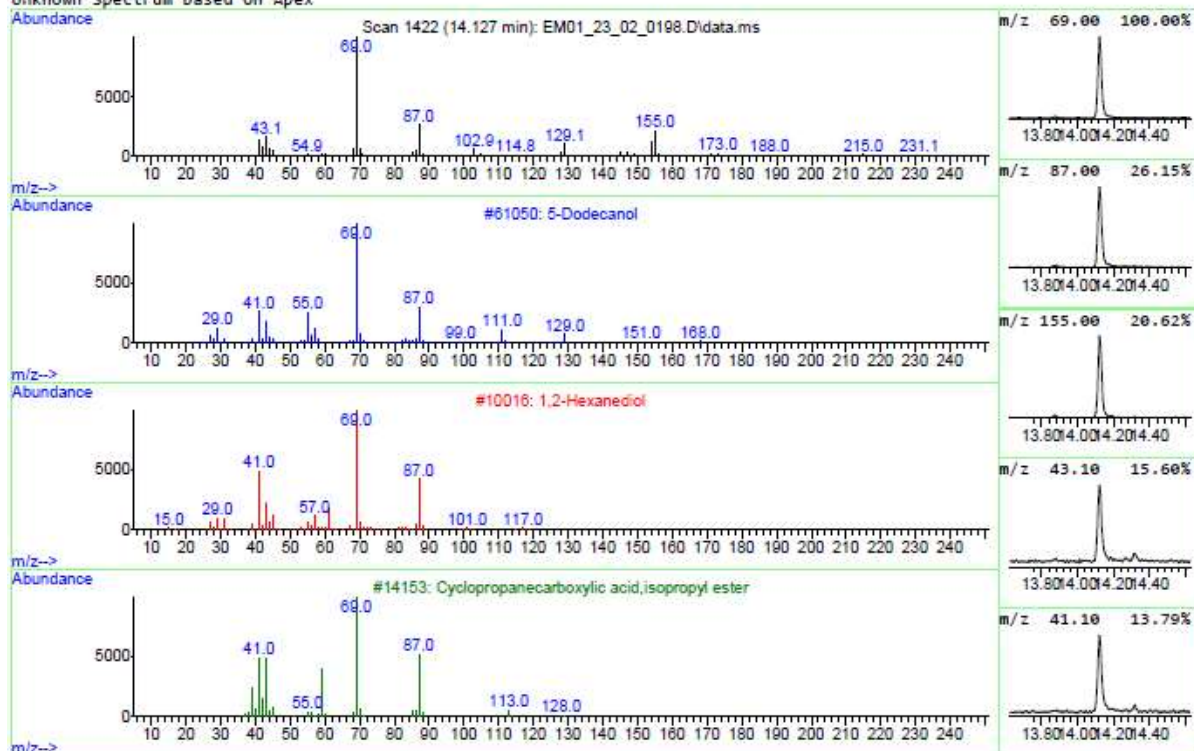
The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1	196245	1000153-71-4	43
2	23872	024108-29-0	43
3	34661	066719-39-9	40

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D
 Sample : JP1 - 1

Peak Number: 6 at 14.125 min Area: 4228430 Area % 0.23

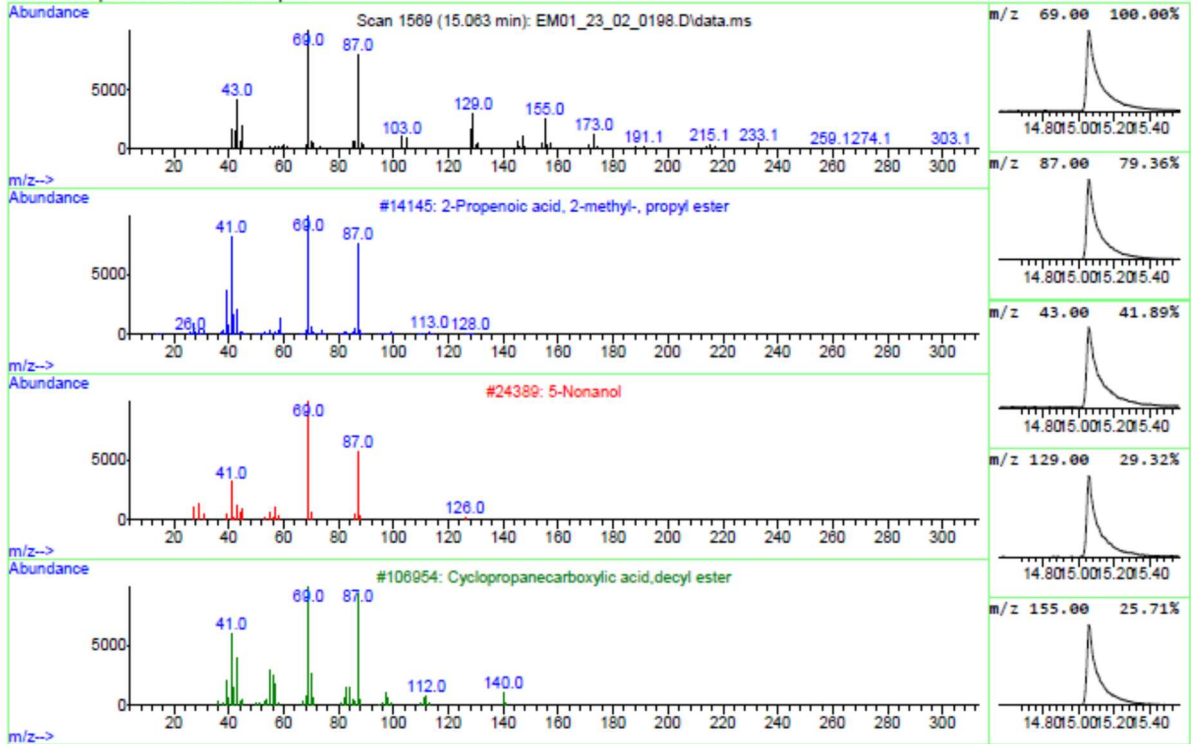
The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1	5-Dodecanol	61050 010203-33-5	53
2	1,2-Hexanediol	10016 006920-22-5	50
3	Cyclopropanecarboxylic acid, isopropyl ester	14153 006887-83-8	50

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-01\2023\02_FEVEREIRO_2023\EM01_23_02_0198.D
 Sample : JP1 - 1

Peak Number: 7 at 15.061 min Area: 48842172 Area % 2.67

The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

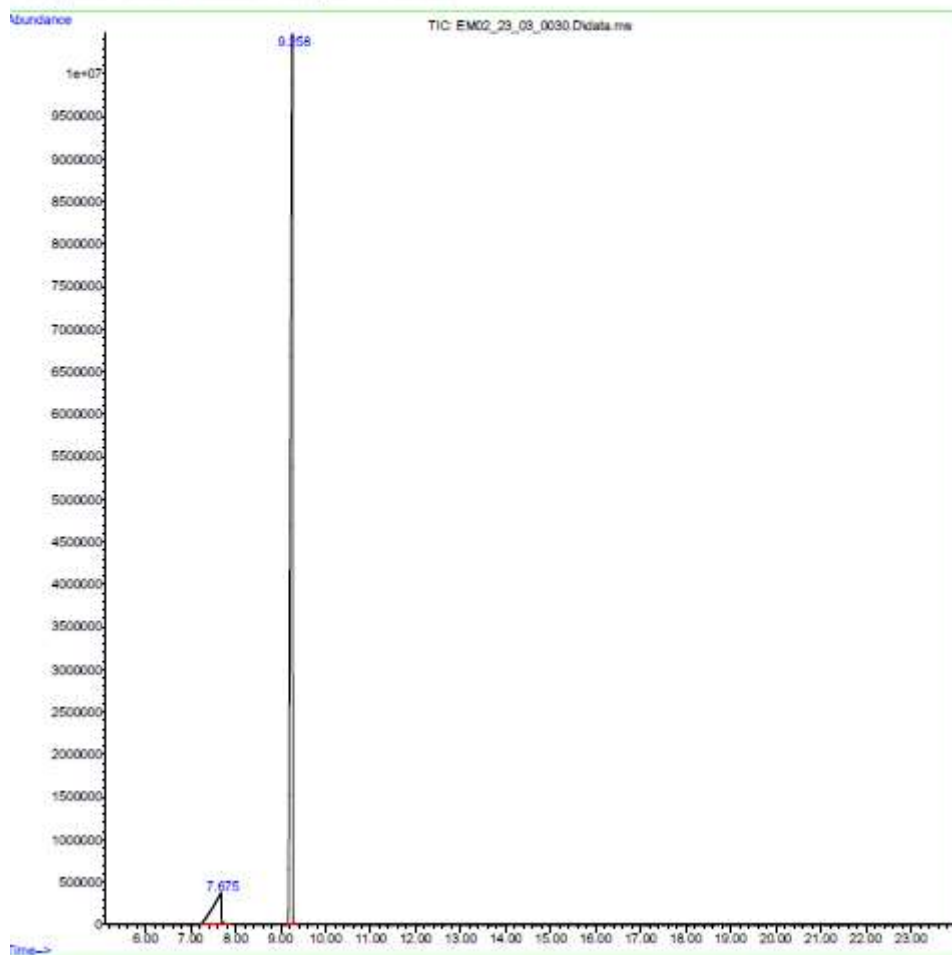
D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1 2-Propenoic acid, 2-methyl-, pro...	14145	002210-28-8	50
2 5-Nonanol	24389	000623-93-8	40
3 Cyclopropanecarboxylic acid, decy...	106954	054460-47-8	40

Data Path : C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-02\2023\03_MARCO_23\
Data File : EM02_23_03_0030.D
Acq On : 28 Mar 2023 16:40
Operator : Maria Elizabeth
Sample : 3P-3-2
Misc : 231549
ALS Vial : 8 Sample Multiplier: 1

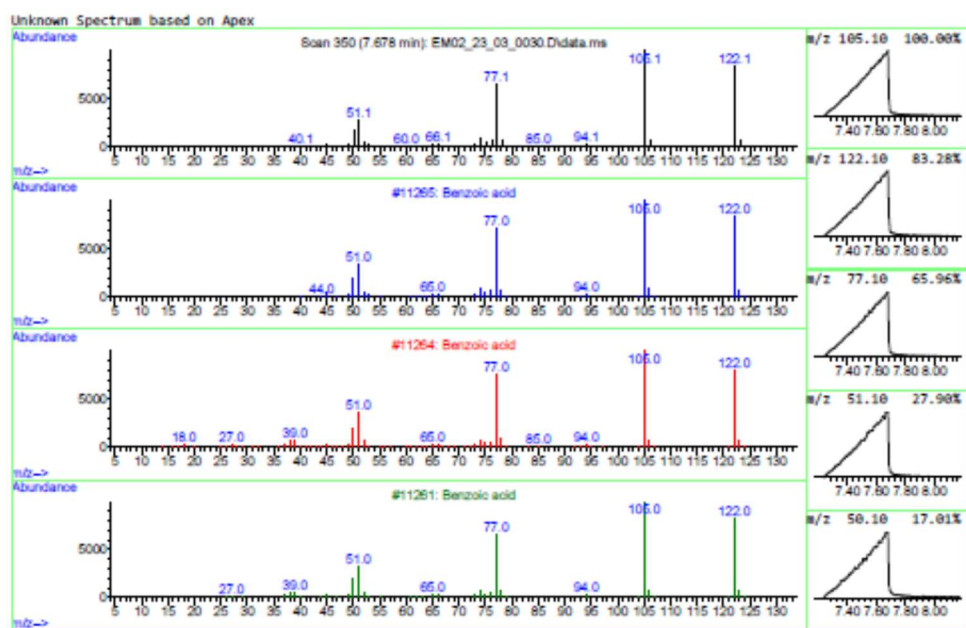
Search Libraries: D:\MassHunter\Library\NIST08.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex

Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e



Library Search Report - ChemStation Integrator



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-02\2023\03_MARCO_23\EM02_23_03_0030.D
 Sample : 3P-3-2

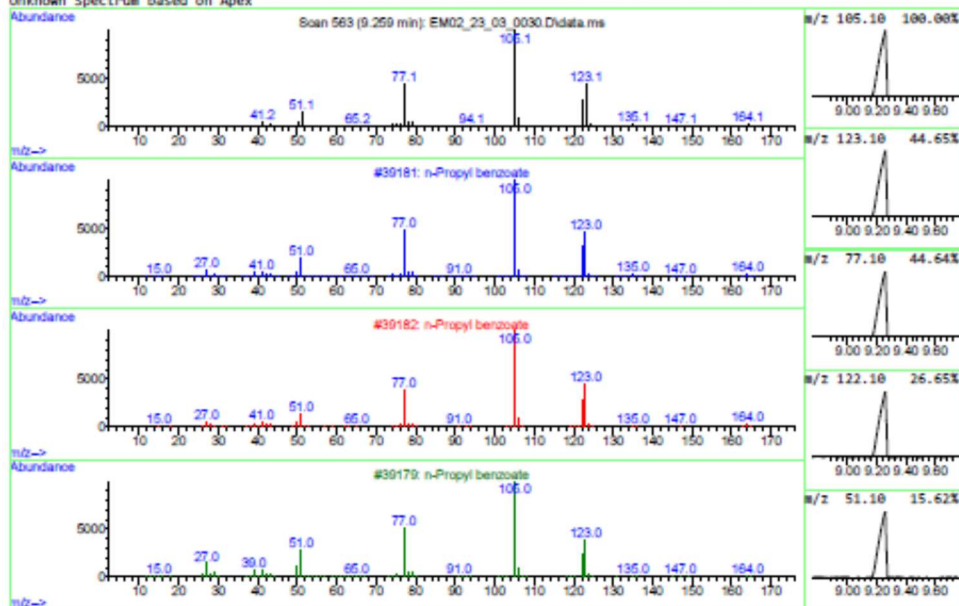
Peak Number: 1 at 7.675 min Area: 48685406 Area % 12.49

The 3 best hits from each library.

	Ref#	CAS#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1 Benzoic acid	11265	000065-85-0	96
2 Benzoic acid	11264	000065-85-0	95
3 Benzoic acid	11261	000065-85-0	91

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-02\2023\03_MARCO_23\EM02_23_03_0030.D
 Sample : JP-3-2

Peak Number: 2 at 9.258 min Area: 341138025 Area % 87.51

The 3 best hits from each library.

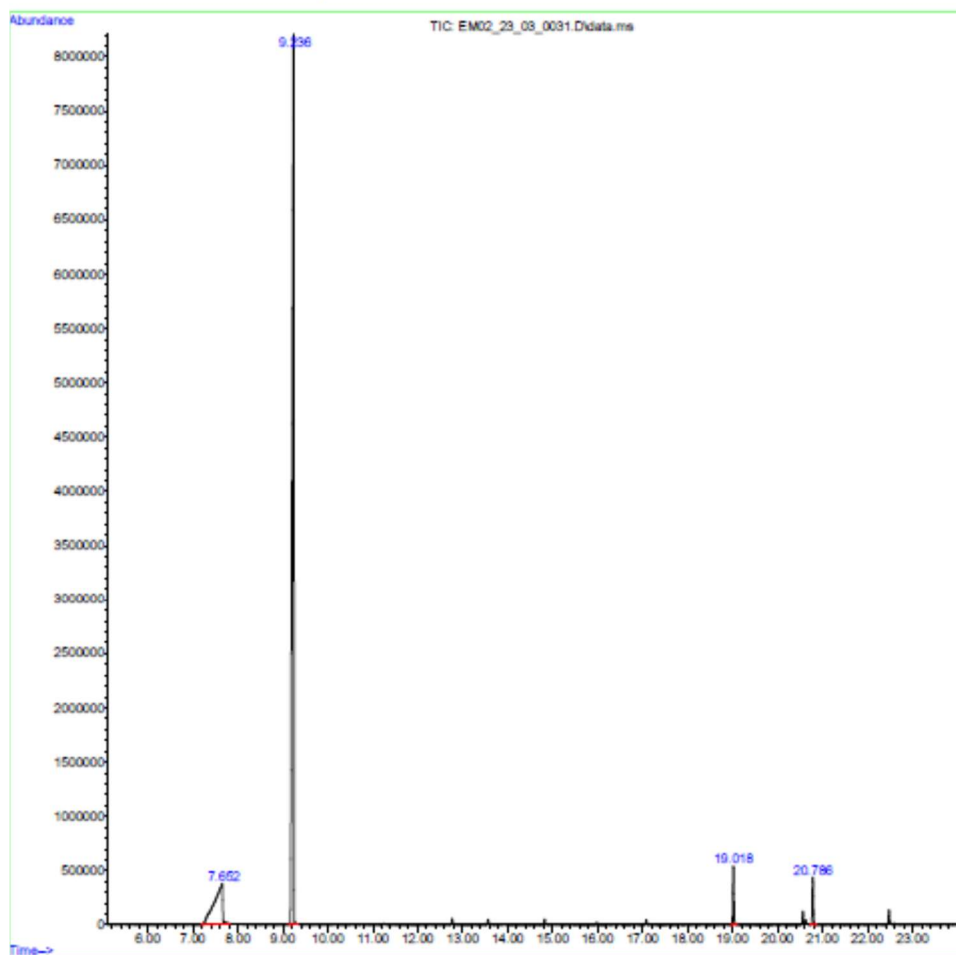
	Ref.#	CAS.#	Qual
D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1 n-Propyl benzoate	39181	002315-68-6	93
2 n-Propyl benzoate	39182	002315-68-6	91
3 n-Propyl benzoate	39179	002315-68-6	91

Library Search Report

Data Path : C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-02\2023\03_MARCO_23\
Data File : EM02_23_03_0031.D
Acq On : 28 Mar 2023 17:13
Operator : Maria Elizabeth
Sample : 3P-4-2
Misc : 231550
ALS Vial : 9 Sample Multiplier: 1

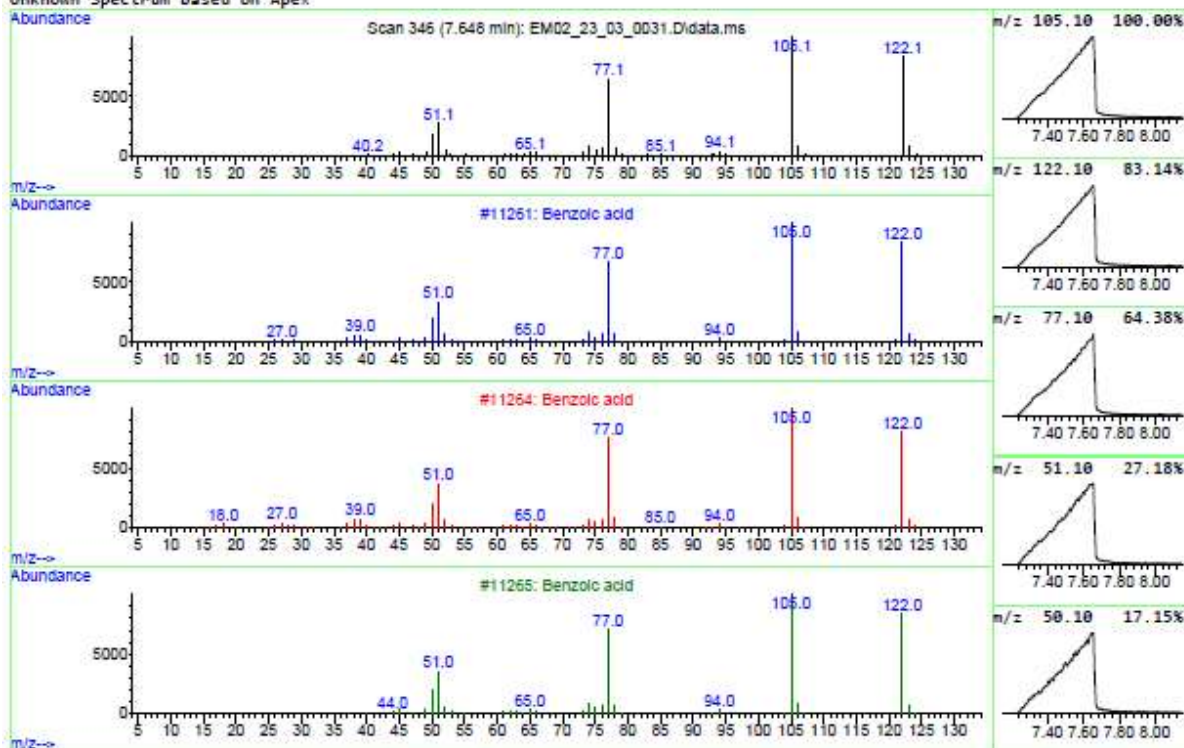
Search Libraries: D:\MassHunter\Library\NIST20.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e



Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\Users\admin\Documents\Backup do sistema\CG-EM-02\2023\03_MARCO_23\EM02_23_03_0031.D
 Sample : JP-4-2

Peak Number: 1 at 7.652 min Area: 47920247 Area % 17.61

The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual

D:\MassHunter\Library\NIST20.L			
1		Benzoic acid	11261 000065-85-0 97
2		Benzoic acid	11264 000065-85-0 97
3		Benzoic acid	11265 000065-85-0 96

