



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Estudo sobre Bactérias Degradadoras de Polietileno:
Descrição de uma potencial nova espécie bacteriana e caracterização de uma
enzima peroxirredoxina**

Tayná Diniz Frederico

Brasília, DF
Fevereiro de 2024



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana

**Estudo sobre Bactérias Degradadoras de Polietileno:
Descrição de uma potencial nova espécie bacteriana e caracterização de uma
enzima peroxirredoxina**

Tayná Diniz Frederico

Orientador: Dr. Ricardo Henrique Krüger

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Microbiana.

Brasília, DF

Fevereiro de 2024

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Ricardo Krüger, por ter respondido aquele primeiro e-mail de uma pessoa desconhecida pedido orientação no doutorado, pela confiança depositada em mim para realização do trabalho e por sempre estar disponível para ajudar em qualquer etapa do doutorado, possibilitando que eu realizasse esta etapa acadêmica.

À Julianna Peixoto, por ter iniciado o projeto polietileno dentro do laboratório, por toda ajuda no trabalho e nas correções dos documentos desde o projeto de doutorado até o documento da tese.

A minha parceira de projeto polietileno, Jéssica Fernandes, que além de colega de trabalho se tornou uma amiga, sempre me dando apoio e forças, trocando conhecimentos e estando ao meu lado nesse período.

À Carla Vizzotto por todos os ensinamentos, paciência e ajuda no trabalho, principalmente no trabalho de caracterização da bactéria. À Isabel Cunha, por além de ajudar em experimentos no laboratório, me deu forças e incentivos para continuar nessa reta final do doutorado. Ao Raul Alcântara por ter me auxiliado e tirado minhas dúvidas sobre proteínas e por todas as horas de laboratório que fizeram o trabalho ser mais leve. Ao Rafael, Jéssica, Gabrielle e Helena colegas de laboratório que viraram amigos que de alguma forma ajudaram no trabalho direta ou indiretamente, ficando mais tarde no laboratório, ajudando em dúvidas sobre experimentos ou pelas risadas e conversas entre um experimento e outro.

À Ingrid do Laboratório de Microscopia do IB-UnB que ajudou na obtenção das imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão. À Izadora e ao professor Aisel do Laboratório de Biofísica que ajudaram nos experimentos de difração circular e sempre foram muito pacientes para me ajudar a entender os resultados.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar da avaliação e aperfeiçoamento deste trabalho.

A minha família, que sem eles nada disso seria possível, minha mãe e pai, Maria e Ronaldo, pelo incentivo e apoio nas minhas decisões acadêmicas, por todos os ensinamentos, ajuda e suporte durante esse período. A minha irmã Nathalia, por estar ao meu lado, mesmo longe, me ajudando, me ouvindo ou puxando minha orelha. Ao meu namorado, João, por estar ao meu lado nesse momento, por me ajudar de várias formas possíveis e quando necessário, por me apoiar, por não me deixar desistir e pela paciência nos meus momentos de estresse.

À Universidade de Brasília pela oportunidade do doutorado em Biologia Microbiana e por toda infraestrutura fornecida. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana por proporcionar esse curso. À CAPES pelo suporte financeiro da bolsa durante todo o curso, ao CNPq e à FAP-DF pelo apoio financeiro ao nosso laboratório.

A todos, muito obrigada.

Resumo

Neste trabalho, os microrganismos previamente isolados e descritos como degradadores de polietileno – *Comamonas* sp. PE 63 e *Delftia* sp. PE 138 – foram estudados. O presente estudo consistiu na descrição taxonômica e fenotípica da bactéria *Comamonas* sp. PE 63, além da caracterização de uma proteína selecionada de *Delftia* sp. PE 138. O primeiro capítulo apresenta uma introdução ao tema e uma revisão bibliográfica sobre poluição e biodegradação de plásticos. O segundo capítulo, por sua vez, descreve a caracterização taxonômica da linhagem *Comamonas* sp. PE 63. Os resultados sugerem que a linhagem pode consistir em uma nova espécie dentro do gênero *Comamonas*, com *C. testosteroni* ATCC 11996 como o seu vizinho filogenético mais próximo. Além disso, a análise do perfil de ácidos graxos revelou distinções importantes entre as linhagens PE 63 e a ATCC 11996. Análises comparativas de pangenoma, predição de genes e caracterização fenotípica *in silico* também foram realizadas para complementar o estudo taxonômico e filogenético da *Comamonas* sp. PE 63. Por fim, o terceiro e último capítulo descreve a caracterização bioquímica de uma peroxirredoxina que está potencialmente relacionada à biodegradação do polietileno. A proteína foi selecionada com base em dados de expressão diferencial durante o cultivo de *Delftia* sp. com polietileno como única fonte de carbono. Para tanto, realizou-se a expressão heteróloga e a purificação da peroxirredoxina. Os resultados bioquímicos indicaram que a proteína é estável em uma ampla faixa de temperatura (10 a 45 °C) e que o pH ótimo de atividade é 7. Além disso, a proteína apresentou estabilidade durante sete dias quando incubada a 30 °C. Por meio de técnicas computacionais, a estrutura tridimensional dessa proteína foi prevista e validada. Os efeitos da temperatura, pH e tratamento com DTT e H₂O₂ nas estruturas secundárias da proteína foram inferidos por meio da técnica de dicroísmo circular. Os resultados obtidos neste trabalho auxiliarão na orientação de futuros pesquisadores da área, contribuindo para novos avanços na gestão de resíduos plásticos.

Palavra-chave: taxonomia, polietileno, expressão heteróloga, peroxirredoxina.

Abstract

In this work, microorganisms previously isolated and described as polyethylene degraders – *Comamonas* sp. PE 63 and *Delftia* sp. PE 138 – were further studied. The present study consisted of the taxonomic and phenotypic description of the bacterium *Comamonas* sp. PE 63, in addition to the protein characterization selected from *Delftia* sp. PE 138. Herein, the first chapter presents an introduction to the subject and a literature review on plastic pollution and biodegradation. The second chapter describes the taxonomic characterization of the *Comamonas* sp. PE 63. The results suggest that the strain might consist of a novel species of the genus *Comamonas*, with *C. testosteroni* ATCC 11996 as its closest phylogenetic neighbor. In addition, the fatty acid profile revealed key differences between the strains PE63 and ATCC 11996. Comparative pangenome analyses, gene prediction, and phenotypic characterization in silico were also carried out to complement the taxonomic and phylogenetic study of *Comamonas* sp. PE 63. Finally, the third and final chapter describes the biochemical and biophysical characterization of peroxiredoxin that is potentially related to polyethylene biodegradation. The protein was selected based on differential expression data during the cultivation of *Delftia* sp. PE 138 with polyethylene as the only carbon source. For this analysis, heterologous expression and purification of the peroxiredoxin were carried out to enable the enzymatic characterization. The biochemical results indicated that the protein is stable over a wide temperature range (10 to 45 °C) and that the optimum pH for activity is 7. Furthermore, the protein showed stability for seven days when incubated at 30 °C. The prediction and validation of its three-dimensional structure were achieved by computational techniques. The effects of temperature, pH, and treatment with DTT and H₂O₂ on the protein secondary structures were inferred by circular dichroism. The results herein described will assist on guiding future researchers in the field, contributing to further advances in plastic waste management.

Keywords: taxonomy, polyethylene, heterologous expression, peroxiredoxin.

Lista de Figuras

Figura 1.1. Estrutura química dos principais plásticos produzidos	19
Figura 2.1. Micrografias eletrônicas de varredura.....	42
Figura 2.2. Micrografias eletrônicas de transmissão	43
Figura 2.3. Árvore filogenética baseada na sequência do gene ribossomal RNA 16S... 48	
Figura 2.4. Árvore filogenética baseada em 31 marcadores moleculares proteicos selecionados pelo AMPHORA2	50
Figura 2.5. Visualização circular do alinhamento dos genomas da <i>Comamonas</i> sp. PE 63 (em cinza) e sua linhagem mais próxima de acordo com TYGS-DSMZ, <i>Comamonas testosteroni</i> ATCC 11996 (em azul)	52
Figura 2.6. Análise comparativa de pangenoma.....	53
Figura 2.7. Proteínas preditas no genoma das linhagens <i>Comamonas</i> sp. PE 63 e a referência <i>C. testosteroni</i> ATCC 11996	54
Figura 2.8. Predições fenotípicas para o genoma da <i>Comamonas</i> sp. PE 63 e os seis genomas das linhagens mais próximas, de acordo com o TYGS-DSMZ	56
Figura 2.9. Diagrama de Venn dos clusters de genes ortólogos	58
Figura 3.1. Heatmap da expressão de genes que codificam oxidoredutases em <i>Delftia</i> sp.	81
Figura 3.2. Continuação do Heatmap expressão de genes que codificam oxidoredutases em <i>Delftia</i> sp.....	82
Figura 3.3. Alinhamento da bcp_00857 com sequências do PDB que obtiveram os melhores <i>hits</i> no Blastp	84
Figura 3.4. Dendrograma de similaridade das sequências das subfamílias das peroxirredoxinas	85
Figura 3.5. Estrutura tridimensional predita pelo Alphafold para a proteína bcp_00857	86
Figura 3.6. Gráfico de Ramachandran da bcp_00857	87
Figura 3.7. Ilustração do alinhamento do modelo tridimensional da bcp_00857 com a estrutura cristalográfica de AhpC	87
Figura 3.8. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (15 %) da expressão, da fração insolúvel (pellet) e solúvel (sobrenadante) da produção da bcp_00857.....	88
Figura 3.9. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (15 %) da purificação da proteína bcp_00857 por cromatografia de afinidade por Histag	89

Figura 3.10. Perfil cromatográfico da purificação da bcp_00857 por cromatografia de exclusão molecular	90
Figura 3.11. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (15 %) da purificação da proteína bcp_00857	90
Figura 3.12. Purificação e DLS da proteína	91
Figura 3.13. Curva do efeito da variação da concentração da proteína bcp_00857 na atividade enzimática	93
Figura 3.14. Efeito do pH na atividade da bcp_00857	94
Figura 3.15. Efeito da temperatura na atividade enzimática	95
Figura 3.16. Atividade de 1 μ M de bcp_00857 em diferentes concentrações de substrato H_2O_2	96
Figura 3.17. Efeito do pH 4, 7 e 9 na estrutura secundária da bcp_00857 analisada por dicroísmo circular.	97
Figura 3.18. Efeito do pH 4, 7 e 9, e tratamentos com DTT e H_2O_2 na estrutura secundária da bcp_00857 analisada por dicroísmo circular	98
Figura 3.19. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias da bcp_0857 avaliados por dicroísmo circular	101
Figura 3.20. Efeito da temperatura na estabilidade estrutural da bcp_00857.....	104

Lista de Tabelas

Tabela 2.1. Características fenotípicas da <i>Comamonas</i> sp. PE 63 e de suas linhagens mais próximas	44
Tabela 2.2. Composição de ácidos graxos (%) da linhagem <i>Comamonas</i> sp. PE 63 e espécies correlatadas do gênero.....	45
Tabela 2.3. Comparação do gene rRNA 16S da <i>Comamonas</i> sp. PE 63 com o banco de dados do <i>NCBI</i>	47
Tabela 2.4. Dados do genoma da <i>Comamonas</i> sp. PE 63.....	49
Tabela 2.5. Identidade Média de Nucleotídeos (Average Nucleotide Identity - ANI) calculadas para a linhagem <i>Comamonas</i> sp. PE 63.....	51
Tabela 2.6. Hibridização digital do DNA (dDDH) gerado pela plataforma TYGS-DSMZ entre o genoma de <i>Comamonas</i> sp. PE 63 e as espécies descritas para o gênero	51
Tabela 2.7. A análise da anotação de genes potenciais responsáveis pela resistência a antibióticos	55
Tabela 2.8. A análise de clusters de genes biossintéticos para metabólitos secundários realizada pelo servidor AntiSMASH	55
Tabela 2.9. Comparação entre as predições fenotípicas obtidas pelo traitar e os dados da literatura para o gênero <i>Comamonas</i>	57
Tabela 3.1. Sequência dos primers com os sítios de restrição.....	71
Tabela 3.2. Meio ZYM-5052.....	74
Tabela 3.3. Percentual de estruturas secundárias da <i>bcp_00857</i> sob o efeito dos pHs 4,0, 7,0, e 9,0 e efeito do tratamento com H ₂ O ₂ e DTT.....	99
Tabela 3.4. Percentual de estruturas secundárias da <i>bcp_00857</i> sob efeito da variação de temperatura entre 25 – 95 °C e efeito do tratamento com H ₂ O ₂ e DTT	102

Lista de abreviações

- ATCC - *American Type Culture Collection*
- ANI - *Average Nucleotide Identity* (Identidade Média de Nucleotídeos)
- ARDB - *Antibiotic Resistance Genes Database*
- ATP - adenosina trifosfato
- CCT - Coleção de Culturas Tropical
- CDS - Coding Sequences (Sequências Codificadoras)
- COG - Clusters of Orthologous Groups (Grupos de Ortólogos)
- Da - daltons
- DC - Dicroísmo circular (*circular dichroism* - CD)
- dDDH - *Digital DNA-DNA hybridization* (Hibridização digital DNA-DNA)
- DLS - *Dynamic light scattering* (Dispersão dinâmica de luz)
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- DTT - Ditioneitol
- EC - *Enzyme Commission* (Comissão de enzimas)
- FAD - Dinucleotídeo de flavina
- FMN - Mononucleotídeo de flavina
- FTC - *Ferric Thiocyanate assay* (Ensaio tiocianato férrico)
- FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
- GBDP – *Genome Blast Distance Phylogeny* (Distância filogenética entre genomas)
- GC – Conteúdo GC, proporção de guanina e citosina em sequências de DNA
- HDPE - *High density PE*
- IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (isopropil β-D-1 tiogalactopiranosídeo)
- IR - Índice de refração da proteína
- KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas)
- LB - *Luria-Bertani*
- LDPE - *Low-density polyethylene*
- LLDPE - *Linear low-density PE*
- LPSN – *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (Lista de Nomes Procarióticos com Base na Nomenclatura)
- MDPE - *Medium density PE*
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NB - *Nutrient Broth*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NCTC - *National Collection of Type Cultures*

OD - *Optical density* (densidade óptica)

OGRI – *Overall Genome Related Index*

pb – Pares de bases

PCR - *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PDB - *Protein Data Bank*

PE - Polietileno

PET - Polietileno tereftalato

PHA - Polihidroxialcanoato

PHB - Polihidroxibutirato

PP - Polipropileno

PQQ - Pirroloquinolina quinona

Prx - peroxirredoxinas

PS - Poliestireno

PU - Poliuretano

PVC - Policloreto de vinila

RDP - *Ribosomal Database Project*

RMSD - *Root mean square deviation*

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

ROS - Espécies reativas de oxigênio

rRNA - *Ribosomal RNA* (RNA ribossomal)

RT-qPCR - *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*

SSU RNA – *Small subunit ribossomal*

TCA - Ácido tricloroacético

tmRNA – *Transfer messenger RNA* (RNA transferência)

TPA - Ácido tereftálico

tRNA – *Transfer RNA* (RNA transportador)

TSA - Ágar Triptona de Soja

Lista de Aminoácidos

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico (Aspartato)	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Ácido glutâmico (Glutamato)	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Thp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

Sumário

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
Lista de abreviações.....	x
Lista de Aminoácidos.....	xii
Apresentação.....	xvi
Capítulo 1 – Um estudo sobre os microrganismos degradadores de polietileno.....	17
1.1. Introdução geral.....	17
1.2. Revisão Bibliográfica.....	19
1.2.1. Plásticos: tipos de plásticos, produção mundial e poluição.....	19
1.2.2. Biodegradação de plásticos.....	21
1.2.3. Transcritômica e proteômica de microrganismos degradadores de PE.....	22
1.2.4. Oxidorredutases.....	24
1.2.4.1. Oxidorredutases e a biodegradação de plásticos.....	25
1.2.5. Enzimas e degradação de plásticos.....	27
1.2.6. Bactérias degradadoras de polietileno isoladas de resíduos plásticos encontrados no solo do Cerrado.....	29
Capítulo 2 - Caracterização taxonômica da Linhagem <i>Comamonas</i> sp. PE 63 isolada a partir de resíduos plásticos encontrados no solo do cerrado.....	30
2.1. Introdução.....	30
2.2. Objetivos.....	32
2.2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2.2. Objetivos específicos.....	32
2.3. Metodologia.....	33
2.3.1. Isolamento da Bactéria.....	33
2.3.2. Sequenciamento do genoma.....	33
2.3.3. Anotação do genoma e análise de qualidade.....	34
2.3.4. Caracterização fenotípica <i>in vitro</i>	34
2.3.4.1. Análise do crescimento em diferentes meios, temperaturas, pH, tolerância a salinidade, análise da catalase e oxidase e testes bioquímicos.....	34
2.3.4.2. Perfil de ácidos graxos.....	35
2.3.4.3. Microscopia Óptica e Microscopia eletrônica de varredura e transmissão.....	36
2.3.5. Análise do gene marcador molecular <i>rRNA</i> 16S.....	37
2.3.6. Análises filogenéticas.....	38

2.3.6.1. Árvores filogenéticas.....	38
2.3.6.2. Classificação taxonômica da linhagem com base na hibridização digital de DNA e Identidade Média de Nucleotídeos.....	39
2.3.6.3. Análise comparativa de pangenoma.....	40
2.3.7. Predição de genes e anotação funcional.....	40
2.3.8. Caracterização fenotípica <i>in silico</i>	41
2.4. Resultados	42
2.4.1. Caracterização fenotípica <i>in vitro</i>	42
2.4.2. Análise filogenética.....	46
2.4.3. Análises comparativas e características funcionais do genoma.....	52
2.5. Discussão	59
2.6. Conclusão	65
Capítulo 3 - Caracterização Bioquímica e Biofísica de uma Peroxirredoxina selecionada a partir de dados de expressão diferencial dos genes do cultivo de <i>Delftia</i> sp. PE 138 em polietileno	66
3.1. Introdução	66
3.2. Objetivos	68
3.2.1. Objetivo geral.....	68
3.2.2. Objetivos específicos.....	68
3.3. Metodologia	69
3.3.1. Seleção das enzimas.....	69
3.3.2. Propriedades físico-químicas deduzidas da sequência da proteína bcp_00857.....	69
3.3.3. Alinhamento da bcp_00857 com sequências de outras peroxirredoxinas e construção de um dendrograma de similaridade.....	70
3.3.4. Modelo tridimensional da proteína.....	70
3.3.5. Obtenção dos genes, produção do sistema de expressão e transformação e clonagem das cepas.....	71
3.3.6. Expressão heteróloga da proteína.....	73
3.3.7. Análise da expressão por SDS-PAGE e quantificação da proteína.....	75
3.3.8. Purificação da enzima bcp_00857.....	75
3.3.9. Ensaio tiocianato férrico (<i>Ferric Thiocyanate (FTC) assay</i>) e efeito da concentração da enzima do ensaio.....	76
3.3.10. Efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima.....	77
3.3.11. Efeito da temperatura na atividade da enzima e termoestabilidade da enzima nas temperaturas 30 °C e 45 °C.....	77
3.3.12. Dicroísmo Circular da bcp_00857.....	77
3.3.13. Dispersão dinâmica de luz (<i>Dynamic light scattering - DLS</i>).....	79
3.4. Resultados	80

3.4.1. Seleção das enzimas potencialmente envolvidas na biodegradação de polietileno ...	80
3.4.2. Propriedades físico-químicas deduzidas a partir da sequência da proteína bcp_00857	83
3.4.3. Alinhamento da bcp_00857 com outras peroxirredoxina e o dendrograma de similaridade.....	83
3.4.4. Modelo tridimensional da bcp_00857	86
3.4.5. Expressão da bcp_00857 em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e teste de solubilidade.....	88
3.4.6. Purificação da proteína bcp_00857.....	88
3.4.7. Atividade enzimática da proteína bcp_00857	92
3.4.7.1. Efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima	93
3.4.7.2. Efeito da temperatura na atividade da enzima e termoestabilidade da enzima nas temperaturas 30 °C e 45 °C	94
3.4.7.3. Atividade da enzima em diferentes concentrações de substrato H ₂ O ₂	95
3.4.8. Caracterização biofísica da bcp_00857 - Análise da estrutura secundária da bcp_00857 por Dicroísmo Circular (DC).....	96
3.4.8.1. Efeito do pH e do tratamento com DTT e H ₂ O ₂ na estrutura secundária da proteína	96
3.4.8.2. Efeito da temperatura e do tratamento com DTT e H ₂ O ₂ na estrutura secundária da proteína.....	99
3.5. Discussão	105
3.6. Conclusão.....	108
4 – Perspectivas	109
5 – Conclusão geral	110
6 – Referências bibliográficas.....	112
7 – Apêndice.....	125
7.1. Apêndice A.....	125
7.3. Apêndice B.....	128
8 – Anexo.....	132
Anexo A.....	132

Apresentação

O presente trabalho é uma continuidade dos estudos sobre os microrganismos isolados de resíduos plásticos encontrados no solo do Cerrado, *Comamonas* sp. PE 63 e *Delftia* sp. PE 138, e que apresentaram potencial de degradação de polietileno no estudo de Peixoto (2018).

Este trabalho está organizado em três capítulos. O primeiro capítulo trata-se de uma revisão da literatura sobre a poluição provocada pelos plásticos no ambiente e sobre os estudos de biodegradação. Já o segundo capítulo descreve a caracterização taxonômica da linhagem *Comamonas* sp. PE 63, identificada como uma nova espécie dentro do seu gênero. Por fim, o terceiro capítulo descreve a caracterização bioquímica parcial de uma peroxirredoxina selecionada a partir de dados genômicos e transcritômicos do isolado *Delftia* sp. PE 138 quando cultivado com polietileno.

Capítulo 1 – Um estudo sobre os microrganismos degradadores de polietileno

1.1. Introdução geral

A demanda por plásticos e sua produção vem crescendo a cada ano. Em 2021 a produção de plástico foi de 390,7 milhões de toneladas, já em 2022 a produção chegou a 400,3 milhões de toneladas. Esse aumento aliado ao descarte inadequado e ao gerenciamento ineficiente dos plásticos pós-consumo acarreta a poluição ocasionada pelo acúmulo de plástico no ambiente, um dos principais problemas ambientais da atualidade (Geyer; Jambeck; Law, 2017; MacLeod *et al.*, 2021; Plastics Europe, 2022, 2023).

A biodegradação de plásticos, que consiste na utilização de microrganismos ou as moléculas secretadas por esses, como as enzimas, no processo de degradação, tem se mostrado uma das alternativas na busca por gerir e solucionar a problemática ocasionada pelo acúmulo desses polímeros no ambiente (Zhang *et al.*, 2022). Trata-se de uma solução mais sustentável para disposição final desses materiais, em contraste as opções atuais de gerenciamento como deposição em aterros e incineração que provocam o acúmulo de resíduos no ambiente e a liberação de inúmeras substâncias tóxicas, respectivamente (Ali *et al.*, 2021; Geyer; Jambeck; Law, 2017; Kwon *et al.*, 2023; Ru; Huo; Yang, 2020).

Microrganismos como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Ideonella*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas* e *Delftia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* já apresentaram algum nível de capacidade para a biodegradação de diferentes tipos de plásticos (Dey *et al.*, 2020; Peixoto; Silva; Krüger, 2017; Zhang; Ding; Yuan, 2022). Na busca por enzimas presentes nesses microrganismos e capazes de participar da degradação dos plásticos, duas técnicas são comumente utilizadas: a transcritômica e proteômica. Por meio dessas técnicas já foram identificadas enzimas da classe das oxidoredutases que se mostraram como potenciais agentes no processo de biodegradação de plástico (Gao; Liu; Sun, 2022; Gravouil *et al.*, 2017; Tao *et al.*, 2023; Yoon; Jeon; Kim, 2012).

O estudo de Peixoto (2018) mostrou que os isolados *Comamonas* sp. PE 63, *Delftia* sp. PE 138 e *Stenotrophomonas* sp. PE 591 apresentaram capacidade de degradação de polietileno de altíssima massa molecular sem a necessidade de pré-tratamentos. Ademais, utilizando de técnicas genômicas e transcritômicas foi possível identificar uma série de enzimas nesses microrganismos possivelmente participantes no processo de degradação de polietileno (Peixoto, 2018; Peixoto *et al.*, 2022; Peixoto; Silva; Krüger, 2017).

Diante disso, há uma necessidade de se estudar de modo mais aprofundado os microrganismos degradadores de plásticos, bem como conhecer suas enzimas a fim de buscar uma solução para combater a poluição. Assim, este trabalho visa o estudo e caracterização taxonômica da bactéria *Comamonas* sp. PE 63. Além disso, nesse trabalho foi realizada a caracterização bioquímica da proteína peroxirredoxina, selecionada com base nos dados genômicos e transcritômicos da bactéria *Delftia* sp. PE 138 quando cultivada com polietileno.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.2.1. Plásticos: tipos de plásticos, produção mundial e poluição

Os plásticos (i.e. polímeros sintéticos) são materiais que se tornaram uma parte fundamental do cotidiano do ser humano. Tratam-se de materiais muito versáteis que podem ser moldados de diferentes formas, apresentam baixo custo de produção, além de serem resistentes a uma ampla faixa de temperatura e a vários produtos químicos (Andrady; Neal, 2009). A partir deles é produzido uma variedade de materiais, como embalagens, sacolas, garrafas, tubos, revestimentos, isolamentos e componentes de partes de aviações e carros (Plastic Europe, 2023; Plastics Europe, 2022).

Em 2022, a produção de plásticos chegou a 400,3 milhões de toneladas, sendo aproximadamente 362,3 milhões de toneladas decorrentes de materiais derivados do petróleo, 35,6 milhões de toneladas decorrentes de plásticos pós-consumo mecanicamente reciclados e 2 milhões de toneladas de materiais derivados de biomassa (Plastics Europe, 2023). Dentre essa produção, os principais plásticos produzidos são polietileno (PE, 26,9%), polipropileno (PP, 19,3 %) e policloreto de vinila (PVC, 12,9 %). O principal país produtor de plásticos, de acordo com o último informe da *Plastics Europe* de 2023, é a China, com um percentual de 32 % da produção mundial, seguido do restante da Ásia com 22 %, da América do Norte com 17 %, e da União Europeia com 14 %. Enquanto isso, América Latina apresentou uma produção de 4 % do que foi produzido no mundo (Plastics Europe, 2023).

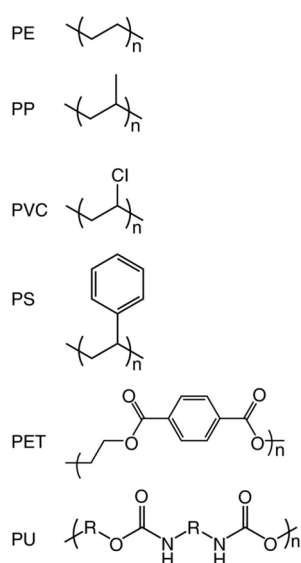


Figura 1.1. Estrutura química dos principais plásticos produzidos (adaptado de Wilkes e Aristilde (2017)). PE: polietileno, PP: polipropileno, PVC: policloreto de vinila, PS: poliestireno, PET: polietileno tereftalato, PU: poliuretano.

Os plásticos são moléculas poliméricas sintéticas formadas pela junção de monômeros diversos que irão determinar o tipo de plástico formado, podendo ser divididos em termoplásticos e termofixos (Speight, 2020). Os termoplásticos suportam vários ciclos de aquecimento e resfriamento sem sofrer quebra estrutural, fazendo com que esses plásticos possam ser moldados e remoldados diversas vezes (Das-Gupta, 1994; Speight, 2020). Os principais plásticos produzidos hoje fazem parte do grupo de termoplásticos, como as poliolefinas (PE e PP), PVC, bem como o poliestireno (PS), polietileno tereftalato (PET) e a poliamida (nylon) (Plastics Europe, 2023; Speight, 2020).

Os termofixos são polímeros que, quando solidificados, permanecem sólidos, não podendo ser aquecidos e remoldados, são plásticos duros, resistentes, quebradiços, insolúveis em quase todos os solventes orgânicos e difíceis de serem reciclados. Esses polímeros são moldados na forma desejada aplicando calor e pressão. Os principais exemplos de termofixos são os poliuretanos (PU), as resinas de formaldeído, resinas de poliésteres insaturados e resinas epóxi (Speight, 2020).

Além de seus respectivos constituintes, são adicionadas aos plásticos substâncias chamadas de aditivos, que irão aperfeiçoar algumas características e aparência do produto final. Os aditivos são empregados para reforço do material, como estabilizadores térmicos que auxiliam no processamento dos plásticos em altas temperaturas, plastificantes para tornar o material maleável e flexível, retardadores de fogo, estabilizadores UV para evitar a degradação por exposição a luz solar, corantes e aditivos de brilho (Andrady; Neal, 2009).

O PE, um dos principais termoplásticos produzidos, foi descoberto em 1933 e foi primeiramente sintetizado como polietileno de baixa densidade (*low-density polyethylene* – LDPE) em 1935 (Andrady; Neal, 2009). Ele é produzido a partir da junção de monômeros de etileno, contendo regiões cristalinas e amorfas, e é classificado de acordo com densidade média da sua resina podendo ser: LLDPE (*linear low-density PE*) 0,925 g/cm³, LDPE (*low-density polyethylene PE*) 0,930 – 0,934 g/cm³, MDPE (*medium density PE*) 0,930 – 0,945 g/cm³ e HDPE (*high density PE*) 0,945 – 0,965 g/cm³ (Andrady; Neal, 2009; Das-Gupta, 1994). O PE é um dos plásticos mais produzidos no mundo, permitindo a produção de filmes plásticos, sacolas e sacos em geral, revestimentos de caixas de alimentos, cabos elétricos, embalagens, garrafas variadas, caixas, vasilhas para alimentos, brinquedos, entre outros produtos (Plastic Europe, 2023; Plastics Europe, 2022).

O PP é produzido desde 1957 e é atualmente o segundo plástico mais produzido (Plastics Europe, 2023). Ele é formado pela polimerização da molécula de propileno,

podendo ser moldado por injeção, moldado a sopro ou termomoldado. É muito utilizado na indústria de automóveis, de embalagens de alimentos, na produção de engradados empilháveis para transporte e armazenamento, garrafas e em fibras longas utilizadas na indústria têxtil (Andrady; Neal, 2009; Speight, 2020).

A destinação final dessa grande quantidade de plásticos produzida é a deposição em aterros, a incineração e o descarte incorreto, métodos que em diferentes graus causam impacto ambiental, como liberação de substâncias poluentes e tóxicas, como dioxinas, compostos semelhantes às dioxinas, monóxido de carbono e óxidos de nitrogênio (Ali *et al.*, 2021; Thompson *et al.*, 2010). Estimativas preveem que 274 milhões de toneladas de plásticos que atingiram o mar em 2010 poderão chegar a 710 milhões de toneladas até 2040 (Arp *et al.*, 2021). Outro problema da contaminação por plásticos no ambiente é a geração de microplásticos, partículas de plásticos menores que 5 mm. Estima-se que mais de 8 milhões de toneladas de microplásticos estejam presentes nos oceanos (Arp *et al.*, 2021; MacLeod *et al.*, 2021; Thompson *et al.*, 2010). Além das ilhas de acúmulos de plásticos já relatadas no mundo todo, observa-se também a ingestão desses plásticos por aves, peixes e outros mamíferos, além da contaminação de corais e de seres humanos (Arp *et al.*, 2021; Azevedo-Santos *et al.*, 2021; Lamb *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2010).

1.2.2. Biodegradação de plásticos

Devido ao grande acúmulo e contaminação por plásticos no ambiente somado às problemáticas da gestão ineficiente de resíduos plásticos, alto custo da gestão pós-consumo e baixa taxa de reciclagem, a biodegradação vem ao longo dos anos se tornando de grande interesse nas pesquisas como uma forma mais sustentável de manejo dos resíduos (Ali *et al.*, 2021; Sanluis-Verdes *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022).

A biodegradação consiste na utilização de microrganismos ou as moléculas secretadas por esses no processo de degradação de um material (Zhang *et al.*, 2022). Na busca por soluções, alguns microrganismos já foram estudados e apresentaram algum nível de capacidade para a biodegradação de diferentes tipos de plásticos, como as bactérias *Enterobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Ideonella*, *Marinobacter*, *Arenibacter*, *Aneurinibacillus*, *Chelatococcus*, *Achromobacter*, *Comamonas*, *Stenotrophomonas* e *Delftia*; além dos fungos: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Zalerion*, *Chaetomium*, *Pullularia* e *Phanerochaete* (Dey *et al.*, 2020; Peixoto; Silva; Krüger, 2017; Wilkes; Aristilde, 2017; Zhang; Ding; Yuan, 2022).

Estudos sugerem que o processo de biodegradação de plásticos tem três etapas fundamentais: a biodeterioração, biofragmentação e a assimilação (Lucas *et al.*, 2008). A primeira etapa é a biodeterioração que ocorre devido ao crescimento de um microrganismo na superfície do material, nessa etapa ocorre a degradação superficial do material, ocasionada pelas primeiras modificações químicas e físicas (Lucas *et al.*, 2008). Na etapa de biofragmentação os microrganismos liberam enzimas e/ou radicais livres que irão realizar a quebra de ligações, a oxidação e a despolimerização dessas moléculas poliméricas em moléculas de menor massa molecular para que seja possível a assimilação. A etapa final é a assimilação pelos microrganismos realizando a oxidação desses oligômeros ou monômeros para obtenção de energia (Lucas *et al.*, 2008)

1.2.3. Transcritômica e proteômica de microrganismos degradadores de PE

Duas técnicas podem ser utilizadas para a descoberta de novas enzimas que atuam na degradação de plástico, a análise do transcrito e a proteômica. Transcritoma é análise do perfil de expressão de genes por meio do sequenciamento de RNAs transcritos de uma amostra (Wang; Huo, 2022). A proteômica é o estudo do perfil proteico de uma amostra e das propriedades das proteínas como a sequência, a quantidade, o estado de modificação, as interações com outras proteínas, atividade, distribuição e estrutura subcelular (Patterson; Aebersold, 2003). Como as duas técnicas são um reflexo das atividades biológicas e metabólicas que estão ocorrendo em determinada amostra, a análise do transcrito e da proteômica são ferramentas importantes para a mineração de enzimas e para a descoberta de vias metabólicas que participam da biodegradação de plásticos (Zhu; Wang; Wei, 2022).

No estudo de Gravouil *et al.* (2017) os mecanismos de mineralização e as vias que participam na degradação de PE da linhagem de *Rhodococcus ruber* C208 foram investigados quando a bactéria foi cultivada em cinco diferentes condições de cultivo: sem carbono, com manitol, com PE (4000 g/mol) em pó oxidado e não oxidado e PE oxidado composto por 80% de LLDPE e 20% de LDPE. Além de observar a capacidade da linhagem C208 na modificação da molécula de PE, o estudo do transcrito dessa bactéria nos diferentes cultivos mostrou que vias de degradação de ácidos graxos, como a de alceno e da β -oxidação, apresentaram expressão aumentada. Nesse estudo, entre as enzimas com expressão aumentada nos cultivos com PE em destaque estão as alceno-1-monooxigenase, álcool desidrogenase, ligase de acil-CoA de ácido graxo de cadeia longa, Acil-Coa desidrogenase, enoil-CoA hidratase, acetil-CoA C-aciltransferase e

diacilglicerol quinase. Além disso, no cultivo da bactéria com PE em pó oxidado as enzimas 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e aldeído desidrogenase (NAD⁺) também apresentaram expressão aumentada (Gravouil *et al.*, 2017).

O estudo de Zampolli *et al.* (2021) que analisou o transcrito de uma *R. opacus* R7 cultivada com PE mostrou que além da expressão aumentada das proteínas participantes da β -oxidação, o microrganismo apresentou transcritos com expressão aumentada associados a atividade oxigenases/oxidases, aos processos catabólicos de hidrocarbonetos, metabolismo central e transporte transmembrana. Além disso, juntamente aos dados transcritômicos, os resultados da análise de RT-qPCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) mostraram três genes mais expressos anotados como LMCO (*laccase-like multicopper oxidase*) 1, 2 e 3 e uma alcano monooxigenase (alkB). Ademais, o cultivo com PE também mostrou uma expressão aumentada do citocromo P450 hidroxilase, enzima envolvida na biodegradação de cadeias carbônicas alifáticas que catalisam a degradação da cadeia lateral do colesterol e/ou são ativadas na presença de óleo diesel (Zampolli *et al.*, 2021).

A pesquisa de Tao *et al.* (2023) referente a degradação de PE ocasionada pela linhagem *Rhodococcus* A34, possivelmente *R. qingshengjii*, mostrou uma possível despolimerização do PE pela bactéria após 30 dias cultivada com PE em pó, com uma redução de peso molecular e redução do peso molecular médio do PE de 45% e 23%, respectivamente. Nesse trabalho, por meio da análise do proteoma da bactéria quando cultivada com PE, identificou-se uma série de proteínas possivelmente envolvidas na degradação de PE como multicobre oxidase (lacase), lipase, esterase, álcool desidrogenase, CoA ligase de ácido graxo de cadeia longa, acil-Coa desidrogenase, 3-*ketoacyl-CoA thiolase* e MCE, uma lipoproteína que realiza o transporte de lipídios. Além disso foram detectadas em alta abundância proteínas presentes nas vias da β -oxidação, biossíntese de ácidos graxos, ciclo do TCA, ciclo do piruvato, ciclo do glioxilato, biossíntese de aminoácidos, via das pentoses fosfato. Proteínas das vias de glicólise e gliconeogênese foram detectadas quase que por completa, com exceção da hexoquinase e glicose 6-fosfatase, assim como a 3-oxoadipil-CoA que não foi detectada participante do metabolismo do fenilacetato, via metabólica envolvida no metabolismo de compostos aromáticos (Tao *et al.*, 2023).

Utilizando múltiplas técnicas, o estudo de Gao, Liu e Sun (2022) mostrou que o fungo *Alternaria alternata* FB1 apresentou capacidade de degradação de PE, reduzindo o grau de cristalinidade relativa do plástico bem como uma redução de 95 % de seu peso

molecular. Além disso, o perfil do transcrito do fungo quando cultivado com e sem PE apresentou possíveis enzimas participantes no processo. Foram identificados 153 transcritos codificadores de enzimas (e.g. peroxidases, lacases, hidroxilases, desidrogenases, oxidorreduções, oxidases, redutases, esterases, lipases e cutinases) potencialmente associadas com a biodegradação, sendo 85,6% de oxidorreduções. Destacando-se as enzimas lacase (*Gene id: evm.TU.contig_8.535*), peroxidase (*Gene id: evm.TU.contig_5.872*) e uma oxidorredução (*Gene id: evm.TU.contig_5.292*) que apresentaram um nível de transcrição aumentadas no cultivo com PE (Gao; Liu; Sun, 2022).

Esses estudos além de apresentarem a participação da via da β -oxidação, de proteínas do processo de transporte celular e de metabolismo energético na degradação de PE, também mostraram que várias oxidorreduções podem estar relacionadas diretamente com o processo de degradação.

1.2.4. Oxidorreduções

As enzimas são proteínas que vão atuar em reações químicas como catalisadores biológicos, acelerando a reação. As enzimas podem ser divididas em seis grandes classes: (i) oxidorreduções, que catalisam reações de óxido-redução, reações com transferência de elétrons; (ii) transferases, que catalisam a reações de transferência de grupos (como as aminotransferases que transferem grupos amino NH_2); (iii) hidrolases, que catalisam as reações de hidrólise (reações que há a participação de moléculas de água) ; (iv) liases, responsáveis pela quebra de ligações C-C, C-O ou C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de duplas ligações ou anéis, ou adição de grupos a duplas ligações; (v) isomerases, ligadas a transferência de grupos dentro de uma mesma molécula resultam na formação de isômeros; e (vi) ligases, que são enzimas que catalisam a ligação de duas moléculas, por meio de formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares (Nelson; Cox, 2014).

As oxidorreduções, como mencionado anteriormente, são enzimas que vão atuar na catálise de reações de transferência de elétrons entre duas moléculas, remoção/transferência de prótons e/ou hidrogênio, transferência de hidretos (composto inorgânicos hidrogenados) e adição de oxigênios. As reações catalisadas por essa classe de enzimas ocorrem por meio de centros redox-ativos que estão presentes nessas proteínas. Esses centros redox comumente incluem resíduos de aminoácidos (como tirosina e/ou cisteína), íons ou complexos metálicos (por exemplo, Cu, Mo, Fe,

aglomerado de Fe-S ou grupos heme) ou coenzimas (como mononucleotídeo de flavina - FMN, dinucleotídeo de flavina - FAD, pterina e pirroloquinolina quinona - PQQ) (Husain; Ullah, 2019; Xu, 2005).

As oxidorredutases são divididas em cinco subclasses: oxidases, desidrogenases, hidroxilases, oxigenases, peroxidases e redutases. Nas reações catalisadas pelas oxidases, o oxigênio molecular (O_2) participa como acceptor de elétrons. As desidrogenases são enzimas que oxidam um substrato pela transferência de hidrogênio para o acceptor da molécula que normalmente é uma nicotinamida adenina dinucleotídeo / nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NAD^+/NADP^+$) ou uma coenzima flavina. As hidroxilases realizam a adição de um grupo hidroxila (-OH) ao substrato. As oxigenases são enzimas que catalisam a oxidação de um substrato realizando a transferência de oxigênio molecular. As peroxidases catalisam a oxidação de substrato fazendo a redução do peróxido de hidrogênio ou outros hidroperóxidos. E as redutases participam de reações que envolvem a redução de um substrato e, na maioria dos casos, agem como oxidases (Husain; Ullah, 2019; Twala *et al.*, 2020).

Além disso, as enzimas oxidorredutases, enzimas que catalisam a troca de elétrons ou equivalentes redox entre moléculas doadoras e receptoras, já foram citadas em outros trabalhos devido ao seu potencial na degradação de plásticos e outras aplicações como na transformação da lignina, aplicações na indústria têxtil, na oxidação de corantes e na biodescontaminação de ambientes (Varga *et al.*, 2019; Xu, 2005; Xu, J. *et al.*, 2019; Yoon; Jeon; Kim, 2012)

1.2.4.1. Oxidorredutases e a biodegradação de plásticos

Uma das primeiras oxidorredutases estudadas em relação a degradação de polietileno foi uma manganês peroxidase (MnP) do fungo *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998). Nesse estudo de Iiyoshi, Tsutsumi e Nishida (1998), foi observado que o tratamento do PE com a enzima parcialmente purificada com adição de surfactante Tween 80, $MnSO_4$ e tampão de malonato de sódio, sem a adição de H_2O_2 exógeno, resultou em redução do peso molecular (Mw) do PE (de 716.000 para 89.500), diminuição da elongação relativa e resistência de tração do plástico. Além disso, foi observado uma maior produção da enzima MnP quando o fungo era cultivado com polietileno (Ehara *et al.*, 2000; Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998).

Ainda na subclasse de peroxidase, no estudo de Rong *et al.* (2024) uma glutatona peroxidase (GPX) da *Rhodococcus* sp. C-2 apresentou uma expressão elevada nas

análises de transcrito e RT-qPCR quando o microrganismo foi cultivado com LDPE. A fim de realizar uma investigação mais aprofundada sobre o papel dessa enzima na degradação de PE, ela foi purificada e testada com filme de LDPE. Nesse estudo, após reação de 96 h da enzima com o filme de LDPE, o filme apresentou rachaduras e depressões na superfície, diminuição de 30,2 % do peso molecular, uma diminuição de polímeros de alto peso molecular e um aumento em polímeros de baixo peso molecular. Foram observados também novos grupos funcionais no filme incluindo grupos hidroxila, grupos carbonila e ligações C = C e C – O. Ainda nesse estudo, utilizando da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), quatro possíveis produtos de degradação foram encontrados (1-dodeceno (C₁₂H₂₄), ácido n-hexadecanóico (C₁₆H₃₆O₂), ácido octadecanóico (C₁₈H₃₆O₂) e 2-(octadeciloxi) etanol (C₂₀H₄₂O₂) (Rong *et al.*, 2024).

Outra subclasse estudada no processo de degradação foi a classe das hidroxilases. A fim de se investigar o potencial de uma alceno hidroxilase no processo de degradação de PE, a enzima foi isolada da *Pseudomonas sp.* E4, uma bactéria isolada de uma praia contaminada por petróleo e que se mostrou capaz de biodegradar LDPE. O gene que codifica uma alceno hidroxilase foi clonado em uma *E. coli* BL21. A BL21 recombinante foi então cultivada com LDPE por 80 dias e apresentou uma biodegradabilidade do PE de 19,3 % enquanto a *Pseudomonas sp.* E4 apresentou biodegradabilidade de 28,6 % do PE, após o mesmo período de cultivo. Além disso, nos primeiros 20 dias a taxa de biodegradabilidade da BL21 recombinante e da *Pseudomonas* E4 foram próximas, mostrando que possivelmente a alceno hidroxilase tem um papel inicial na degradação do LDPE (Yoon; Jeon; Kim, 2012).

Um complexo de enzimas chamado de *AH (alkane hydroxylase) system* da bactéria *P. aeruginosa* E7 foi investigado em relação ao seu papel na degradação da molécula de PE no estudo de Jeon e Kim (2015). O *AH system* é formado pelas proteínas alceno monooxigenase (gene *alkB1*), uma ou duas rubredoxinas (genes *rubA1* e *rubA2*) e rubredoxina redutase (gene *rubB*). Para estudar a possível ação desse complexo na degradação de LDPE, a degradação pela linhagem *P. aeruginosa* E7 foi comparada a degradação de três linhagens recombinantes, onde uma recebeu apenas o gene *alkB1* (a linhagem BCA), a segunda os genes *alkB1*, *rubA1* e *rubA2* (linhagem BCAR), e a última *alkB1*, *rubA1*, *rubA2* e *rubB* (linhagem BCARB). As linhagens recombinantes BCA, BCAR e BCARB cultivadas com LDPE por 78 dias apresentaram uma taxa de conversão do carbono do LDPE a CO₂ de 18,5%, 26,3% e 30,5%, respectivamente. Já a *P.*

aeruginosa E7 no mesmo período converteu 40,8% do carbono da LDPE em CO₂ e obteve uma expressão de *alkB* quatro vezes maior quando cultivada em meio basal contendo LDPE em relação ao cultivo em NB (Jeon; Kim, 2015).

Na pesquisa de Jeon e Kim (2016), outro gene de alceno monooxigenase (*AlkB*) de *P. aeruginosa* E7 que apresentou expressão aumentada no cultivo com LDPE e níveis de transcrição superior ao do gene *alkB1* foi o gene *alkB2*. Construindo e realizando experimentos com LDPE com duas linhagens recombinantes contendo o gene *alkB2* (linhagem BCA2) e os genes *alkB2*, *rubA1* e *rubA2* (linhagem BCA2R), foi observado que a linhagem BCA2 apresentou maior biodegradação de LDPE, em comparação com a BCA, e níveis de degradação similares a linhagem BCARB. Os níveis de biodegradação do PE pela linhagem recombinante BCA2R não foram maiores que a da linhagem BCA2 (Jeon; Kim, 2016).

As lacases são multicobre oxidases que realizam a oxidação de uma grande variedade de substratos e são de grande interesse nas pesquisas de degradação de PE (Santo; Weitsman; Sivan, 2013). Com o propósito de se estudar mais a fundo o papel de uma lacase da *R. ruber* C208, foi realizada a indução da enzima utilizando cobre e posteriormente o extrato bruto contendo a lacase foi utilizado nos testes de degradação de LDPE. A utilização de cobre provocou o aumento da expressão de lacase e um aumento de 75% na biodegradação de LDPE pela *R. ruber* C208. Com a utilização do extrato bruto contendo lacase foi observado uma redução de 20% no peso molecular médio em peso (M_w) e redução de 15% no peso molecular em número (M_n) normal do polietileno. Além disso, uma lacase de *T. versicolor* (Sigma) que foi utilizada como comparação não obteve resultados positivos de biodegradação (Santo; Weitsman; Sivan, 2013).

O potencial das monooxigenases também já foi investigado a nível computacional no estudo de Xu *et al.* (2019), utilizando cálculos de mecânica quântica para desvendar o mecanismo bio-catalítico da degradação de PE e PS por uma monooxigenase P450. Esse trabalho mostrou que a transição de radicais livres induzida pela enzima reduziu significativamente a força da ligação C-C da molécula dos plásticos e resultou na quebra da ligação. Tais resultados indicam uma possível correlação dessa enzima com a clivagem da ligação C-C em PE/OS e facilitação da biodegradação (Xu, J. *et al.*, 2019).

1.2.5. Enzimas e degradação de plásticos

Além das oxidoredutases, outras classes de enzimas já foram estudadas em relação ao potencial de processar os plásticos. As cutinases são importantes hidrolases e

devido seu potencial em aplicações industriais (e.g. biocatalisadores para sintetizar e modificar compostos químicos como o petróleo, compostos aromatizantes, compostos fenólicos) sua ação na degradação de plásticos, em especial o PET, foi investigada (Kawai *et al.*, 2014). A cutinase, *cutinase putative* (cut190), da termófila *Saccharomonospora viridis* AHK190, foi avaliada em relação ao seu papel na degradação de PET. A enzima foi capaz de degradar filme PET em temperaturas acima de 60 °C, com uma redução do peso do PET em 13,5 % e o ácido tereftálico (TPA), monômero do PET, foi observado como produto de degradação (Kawai *et al.*, 2014).

A PETase da bactéria *Ideonella sakaiensis* 201-F6, que é capaz de utilizar PET como única fonte de carbono, se mostrou uma das alternativas na problemática do acúmulo de PET. Duas hidrolases capazes de agir no PET foram encontradas e isoladas dessa bactéria. A PETase, que realiza a hidrólise do PET e produz ácido mono-(2-hidroxiethyl) tereftálico (MHET), como produto em maior quantidade, e em pequenas quantidades o TPA e bis-(hidroxiethyl) tereftalato (BHET). E a MHET hidrolase, a MHETase, que faz a conversão de MHET em TPA e etilenoglicol (EG), dois monômeros utilizados para produção de PET (Yoshida *et al.*, 2016).

Com o objetivo de modificar e produzir uma PETase mais eficiente, no estudo de Lu *et al.* (2022) foi utilizado um algoritmo de aprendizado de máquina baseado em estrutura para desenhar e modificar a PETase. Por meio dessa técnica foi desenhada e produzida uma PETase com cinco mutações, em relação a PETase de tipo selvagem (PETase da *I. sakaiensis* 201-F6), chamada de FAST-PETase. A enzima apresentou atividade de hidrólise de PET superior em relação às alternativas de tipo selvagem. Além disso, os testes com PET pós-consumo não tratados revelaram uma degradação quase que completa do PET pela FAST-PETase após uma semana de incubação (Lu *et al.*, 2022).

Um dos primeiros trabalhos a abordar enzimas não relacionadas a bactérias ou fungos capazes de degradar PE diz respeito a uma enzima da saliva do verme de cera *Galleria mellonella* (Sanluis-Verdes *et al.*, 2022). No trabalho de Sanluis-Verdes *et al.* (2022), duas proteínas foram selecionadas, isoladas e purificadas a partir da saliva do verme, a proteína *arylphorin subunit alpha-like*, renomeada Demetra, e a *hexamerin*, renomeada Ceres. As duas foram testadas em PE com massa de 4000 g/mol e mostraram deterioração e oxidação da molécula de PE confirmadas pelas técnicas de RAMAN e FTIR. O sobrenadante da reação do plástico com a Demetra apresentou como produtos de degradação, 2-acetonas de 10 a 20 carbonos e acetona com 22 carbonos, que somente apareceu após 10 aplicações da enzima (Sanluis-Verdes *et al.*, 2022).

1.2.6. Bactérias degradadoras de polietileno isoladas de resíduos plásticos encontrados no solo do Cerrado

Nos trabalhos de Peixoto (2013) e (2018) foram isoladas nove bactérias pertencentes aos gêneros *Comamonas*, *Delftia* e *Stenotrophomonas* de plásticos pós-consumo, constituídos principalmente de polietileno, com indícios macroscópicos de degradação que foram descartados na Chapada dos Veadeiros. Essas bactérias mostraram-se capazes de degradar polietileno de alta massa molecular ($191.000 \text{ g.mol}^{-1}$) sem a necessidade de pré-tratamentos após um cultivo de 90 dias. Além disso, utilizando de técnicas genômicas e transcritômicas, observou uma série de enzimas com expressão aumentada no cultivo com PE e um mecanismo metabólico para degradação do PE por esses microrganismos foi proposto, envolvendo a ação de várias vias metabólicas e enzimas, assim como a atuação sinérgica entre enzimas e espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio no processo de degradação extracelular (Peixoto, 2013, 2018; Peixoto; Silva; Krüger, 2017).

Capítulo 2 - Caracterização taxonômica da Linhagem *Comamonas* sp. PE 63 isolada a partir de resíduos plásticos encontrados no solo do cerrado

2.1. Introdução

O gênero *Comamonas*, pertencente à família Comamonadaceae, é constituído por microrganismos gram-negativos, bacilares, não fermentadores, com flagelos polares e metabolismo quimiorganotróficos (Willems; De Vos, 2006). Em 1923, a primeira *Comamonas* foi isolada e inicialmente nomeada como *C. percolans*. Mais tarde, em 1962, esta foi reclassificada como *C. terrigena* (Hugh, 1962). Em 1985, o gênero foi estudado mais detalhadamente quanto às suas características bioquímicas, fisiológicas e nutricionais e, em decorrência desse processo, microrganismos classificados em outros gêneros foram reclassificados como pertencentes ao gênero *Comamonas* (De vos *et al.*, 1985). Em 1987, outros dois microrganismos passaram por reclassificação, a *Pseudomonas acidovorans*, isolada em 1926, foi reclassificada e designada como *C. acidovorans* e a *Pseudomonas testosteroni*, descrita em 1956, reclassificada e nomeada *C. testosteroni* (Tamaoka; Ha; Komagata, 1987).

Atualmente, esse gênero apresenta 26 espécies listadas na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (LPSN) (acesso em 13/11/2023) (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022). Os microrganismos pertencentes ao gênero *Comamonas* são ubíquos no meio ambiente e já foram isolados de ambientes diversos como filtrados de infusão de feno, água, solo e solos contaminados, amostras clínicas e/ou material humano, fontes de enxofre, lodo ativado, reator desnitrificante para tratamento de lixiviados de aterros sanitários, intestino do cupim *Odontotermes formosanus*, mina de fosfato, solo próximo a geleira Collins, Antártica, entre outros lugares (Chipirom *et al.*, 2012; De vos *et al.*, 1985; Hatayama, 2014; Narayan; Pandey; Das, 2010; Park; Kim; Cha, 2022; Sun *et al.*, 2013; Tamaoka; Ha; Komagata, 1987; Wauters *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2011).

Além de ser encontrado em diversos ambientes, o gênero *Comamonas* apresenta um papel importante na aplicação biotecnológica. Estudos já mostraram a capacidade de algumas espécies do gênero na degradação da lignina, de compostos aromáticos e de plásticos, como o poliuretano (Akutsu; Nakajima-Kambe; Nomura, 1998; Chai *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2018). Além disso, exemplares do gênero já foram utilizados na produção de polihidroxialcanoatos (PHA), um termoplástico biodegradável, como biosensor para análise de biodegradação de PET e

suas enzimas já foram utilizadas para clivagem oxidativa e descoloração de tintas da indústria têxtil (Dierkes *et al.*, 2023; Jadhav *et al.*, 2009; Zakaria *et al.*, 2010).

Uma linhagem de *Comamonas* sp. foi isolada de resíduos plásticos pós-consumo, em sua maioria polietileno, descartados em solos de reservas ecológicas da região da Chapada dos Veadeiros (Peixoto, 2013). Esse isolado apresentou potencial para degradar polietileno de alta massa molecular sem a necessidade de pré-tratamentos (Peixoto, 2018; Peixoto; Silva; Krüger, 2017).

Neste capítulo, será descrita a caracterização taxonômica da linhagem de *Comamonas* sp. PE 63 isolada de resíduos plásticos encontrados em solo do Cerrado, propondo-se sua descrição como uma nova espécie do gênero.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

O presente capítulo visa realizar a caracterização taxonômica da *Comamonas* sp. PE 63 isolada de resíduos plásticos do cerrado. A caracterização será realizada de forma comparativa com a sua linhagem mais próxima, a fim de averiguar a possibilidade de a linhagem configurar uma nova espécie do gênero.

2.2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente a linhagem PE 63, comparando-a com a linhagem mais próxima do gênero;
- Determinar, com base na sequência completa do gene 16S rRNA, a filogenia da linhagem *Comamonas* sp. PE 63;
- Realizar a classificação genômica da linhagem *Comamonas* sp. PE 63 com base na sua sequência genômica;
- Realizar análises de genômica comparativa com outras linhagens do gênero *Comamonas*.

2.3. Metodologia

2.3.1. Isolamento da Bactéria

O isolamento da *Comamonas* sp. PE 63 está descrito detalhadamente nos trabalhos de Peixoto (2013) e (2018). Resumidamente, diversos resíduos plásticos com evidências macroscópicas de degradação, como rachaduras, buracos, quebras e mudanças de cor e textura, foram coletados do solo do Cerrado, especificamente na região da Chapada dos Veadeiros. Os microrganismos aderidos aos plásticos foram suspensos em tampão salino (NaCl 0,9 %). Essa solução salina contendo os microrganismos foi utilizada para inocular placas de cultura contendo os meios NB (*Nutrient Broth*), R2A, *Czapek-Dox*, *Middlebrook* ou *Marine Broth* (Difco, Holanda) com ágar 1,5% (Acumedia, EUA). As colônias foram selecionadas, isoladas e cultivadas em seus respectivos meios líquidos e incubadas a 28°C sob agitação (150 rpm) por 24 horas. Após o isolamento, o DNA genômico foi extraído e sequenciado (Peixoto, 2013, 2018).

2.3.2. Sequenciamento do genoma

O sequenciamento do genoma da *Comamonas* sp. PE 63 foi realizado e está descrito detalhadamente no trabalho de Peixoto (2018). Brevemente, as células foram inoculadas em 5 mL de meio NB (Difco, Holanda) e mantidos a 28°C sob agitação (150 rpm) por 24 h. Em seguida, as células foram resgatadas por centrifugação (5.500 ×g por 5 min a 4 °C), e o DNA total foi extraído e purificado com o kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich, EUA) e quantificado com o fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA) utilizando o kit dsDNA BR Quant-it assay kit (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A biblioteca de sequenciamento foi criada utilizando o kit de reagentes MiSeq *reagent kit* (Illumina, San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante; o guia do usuário do sistema MiSeq, revisão L (*part number* 15027617; Illumina), foi usado no protocolo de sequenciamento; e o genoma foi sequenciado na plataforma Illumina MiSeq (2 x 300 pb paired-end reads) (Macrogen, Seul, Coreia do Sul) (Peixoto, 2018; Peixoto *et al.*, 2022).

As *reads* resultantes do sequenciamento foram submetidos à análise de qualidade pelo programa FastQC v. 0.11.3 e apenas as sequências com qualidade superior a 20 na escala *phred* foram mantidas (Wingett; Andrews, 2018). A montagem *de novo* das *reads* em *scaffolds* foi realizada por meio do *pipeline* A5-miseq, que inclui a remoção das sequências de qualidade inferior 20 na escala *phred* e menores que 200 bp através do programa Trimmomatic v. 0.35, bem como a montagem dos *contigs* realizada com o

algoritmo IDBA-UD v. 1.1.1 (Bolger; Lohse; Usadel, 2014; Coil; Jospin; Darling, 2015; Peng *et al.*, 2012).

2.3.3. Anotação do genoma e análise de qualidade

A anotação do genoma foi realizada pelo *software* Prokka v. 1.14.6, utilizando o banco de dados do UniProt (Seemann, 2014). Para análise de contaminação e completude do genoma foi utilizado o *software* CheckM v. 1.0.13 (Parks *et al.*, 2015). O pacote *Stats* do *software* BBmap v. 38.76 foi utilizado para gerar as estatísticas de montagem (Bushnell; Rood; Singer, 2017). A cobertura dos *reads* foi determinada pelo *software* SAMtools v. 1.9, Bowtie2 v. 2.3.4.1 e o pacote *Pileup* do BBmap v. 38.76 (Bushnell; Rood; Singer, 2017; Danecek *et al.*, 2021; Langmead; Salzberg, 2012).

2.3.4. Caracterização fenotípica *in vitro*

2.3.4.1. Análise do crescimento em diferentes meios, temperaturas, pH, tolerância a salinidade, análise da catalase e oxidase e testes bioquímicos.

A bactéria foi crescida nos meios NB (Difco, Holanda), LB (Sigma-Aldrich), R2A (Difco, Holanda) e TSA (Ágar Triptona de Soja) (Sinergia Científica, Brasil). Para efeito de comparação, os experimentos desse tópico foram realizados com a linhagem PE 63 e a linhagem *Comamonas testosteroni* ATCC 11996. Trata-se de uma linhagem de referência ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA – USA) certificada, a qual foi obtida pela Coleção de Culturas Tropical – CCT (<https://fat.org.br/>). Os experimentos desse tópico foram realizados em triplicata.

Para verificar a temperatura ótima de crescimento, as células foram cultivadas em placas com meio sólido NB 1,5% de ágar e incubadas nas temperaturas de 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50, 55 e 60 °C por uma semana, o crescimento de colônias nas placas foram analisadas diariamente. Para a análise do crescimento em diferentes pHs, as células foram cultivadas em meio NB líquido em uma faixa de pH de 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 e incubadas a 30 °C com agitação (150 rpm) por 3 dias. Foi utilizado o protocolo de preparo do meio descrito por Zhu *et al.* (2014), onde foi adicionado ao meio NB líquido tampão citrato Na₂HPO₄ 50 mM para o pH 4 a 6, tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 100 mM para pH 7 - 8 e tampão NaHCO₃/Na₂CO₃ 100 mM para pH 9 e 10. A tolerância a diferentes concentrações de sal foi examinada em cultivos em meio NB líquido suplementado com NaCl (0, 1, 2, 3, 4 e 5 %) e incubados a 30°C por três dias. Para monitorar o crescimento em diferentes pHs e diferentes concentrações de NaCl a densidade celular foi examinada a partir da

densidade óptica a OD₆₀₀ utilizando o espectrofotômetro SpectraMax M3 com *software* SoftMax Pro 6.0.

Apenas para linhagem PE 63, outro método de cultivo para avaliar o crescimento em diferentes pHs foi utilizado. O meio líquido NB foi ajustado com HCl ou NaOH para obtenção de diferentes pHs, variando o pH de 4 a 9, em intervalos de 1,0, e a bactéria foi inoculada nos diferentes pHs e incubada a 30 °C sob leve agitação. A densidade celular foi monitorada em intervalos de 30 – 30 minutos por 21 horas no espectrofotômetro SpectraMax M3 com *software* SoftMax Pro 6.0. O teste de atividade de oxidase foi conduzido por meio de *Oxidase Strips* 40560 (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante. A atividade catalase foi testada por presença ou ausência de efervescência após a adição de peróxido de hidrogênio 3% a uma alíquota da cultura cultivada em meio NB a 30°C, sob agitação (150 rpm) por 3 dias (Tindall *et al.*, 2014).

O kit Enterokit B (Probac, Brasil) foi utilizado para os testes bioquímicos, de acordo com as instruções do fabricante. O Enterokit B contém os meios de cultura EPM, MILi e Citrato de Simmons, para os seguintes testes: (i) meio EPM: testes de fermentação e produção de gás em glicose, produção de H₂S, hidrólise da uréia e desaminação do triptofano; (ii) meio MILi: testes de motilidade, indol e descarboxilação de lisina; e (iii) meio citrato de Simmons: utilização do citrato como única fonte de carbono. As bactérias foram cultivadas nos três meios sólidos disponíveis pelo kit Enterokit B, incubadas a 30°C e o crescimento da bactéria foi examinado após 24 horas.

2.3.4.2. Perfil de ácidos graxos

Os experimentos desse tópico foram realizados de forma comparativa entre as linhagens PE 63 e a *C. testosteroni* ATCC 11996. Para análise do perfil de ácidos graxos as células foram cultivadas em meio TSA sólido e incubadas a 30°C. Após 48 horas de crescimento, as colônias foram coletadas e transferidas para tubos de vidro para análises de ácidos graxos celulares, conforme descrito por Ramaprasad e colaboradores, 2015. Foi realizada a saponificação dos ácidos graxos utilizando 1 mL de solução metanol / NaOH (150 mL água deionizada, 150 mL metanol, 45 g NaOH) à 100°C por 30 minutos. Foram adicionados ao tubo, 2 mL de metano 6 M em HCL e os tubos foram incubados por 10 minutos à 80 °C. Para separação dos ésteres metílicos dos ácidos orgânicos, 1,25 mL de hexano / éter terc-butílico (1:1 v/v) foi adicionado aos tubos que foram submetidos a agitação por 10 minutos. A fase superior que continha os ácidos graxos metil-ésteres foi recuperada, lavada com 0,25 M NaOH e estocada para análise posterior (Sasser, 1990).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados no cromatógrafo gasoso (Agilent 7890^a) equipado com o *software Sherlock Microbial Identification System* (Sherlock, v. 6.2) utilizando a biblioteca do método RTSBA6 (Sasser, 1990). O experimento desse tópico foi realizado em triplicata.

2.3.4.3. Microscopia Óptica e Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

Os experimentos desse tópico foram realizados de forma comparativa entre as linhagens PE 63 e a *C. testosteroni* ATCC 11996. Um cultivo das linhagens crescidas *overnight* em meio NB líquido foi corado utilizando a técnica de coloração diferencial de gram (Reddy *et al.*, 2007). As células coradas foram observadas por microscopia óptica utilizando o microscópio Leica DM750.

A análise morfológica das células foi realizada por visualização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e eletrônica (MET). Para a visualização em MEV, as células foram crescidas em 5 mL de meio NB *overnight* a 30°C sob agitação (150 rpm), 2 mL do cultivo foi centrifugado (5.000xg por 5 min) para obtenção das células, o *pellet* resultante da centrifugação foi lavado três vezes com 1X tampão salino de fosfato (PBS). Em seguida, foi realizado o primeiro processo de fixação utilizando solução Karnovsky (2% (v/v) paraformaldeído, 2% (v/v) glutaraldeído, 3% (p/v) sacarose e 0,05 M de tampão cacodilato). Para a segunda fixação foi utilizado a solução de tetróxido de ósmio (1% p/v) em seguida as células fixadas foram aderidas em lamínula com poli-L-lisina. A lamínula com as células aderidas passou por um processo de desidratação das células utilizando uma solução de acetona com concentração crescente (50 – 70 – 90 - 100%, v/v). As células foram submetidas a secagem em ponto crítico realizada com CO₂, em seguida as células foram cobertas com uma fina camada de ouro (Souza, 2007). O microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F foi utilizado para visualização das células (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

Na Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), as células foram lavadas e fixadas com o mesmo protocolo descrito anteriormente para o MEV. Em seguida, as células fixadas passaram pelo processo de contrastação *in block* em solução aquosa de acetato de uranila 0,5% *overnight* com a solução. Posteriormente, foi realizada a desidratação com solução de concentração crescente de acetona (30 – 50 – 70 – 90 – 100 - 100%, v/v) e por fim elas foram embebidas em resina Spurr's. Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos que foram contrastados com acetato de uranila e visualizados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

2.3.5. Análise do gene marcador molecular *rRNA* 16S

Para a extração do DNA total, a *Comamonas* sp. PE 63 foi cultivada em 5 mL de meio NB e incubada a 30°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Em seguida, o cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 5 min a 4 °C e o DNA total foi extraído utilizando o kit *Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) com tampão TBE 0,5% (0,05 M Trizma base, 0,05 M Ácido Bórico e 0,001 M EDTA), utilizando o marcador de massa molecular 1 kb DNA *ladder* (Invitrogen, EUA). Para quantificação do DNA foi utilizado o kit *dsDNA BR Quant-it assay kit* (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e o fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA).

O gene rRNA 16S foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR) com os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3'). Para reação foi utilizado 1-2 ng de DNA total, tampão 10x, MgCl 1,5 mM, 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) em um volume de reação de 20 uL. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% (v/v) com tampão TBE 0,5% e purificado com o kit Gene Jet *PCR Purification Kit* (Thermo Scientific).

O fragmento do gene rRNA 16S purificado foi ligado ao vetor pGEM[®]-T Easy (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, para obtenção da sequência completa do gene. Para clonagem, foi utilizada a bactéria termo-competente *Escherichia coli* DH10b. As células termo-competentes (*E. coli* DH10b e BL21) foram obtidas por meio da transformação das células de *E. coli* tratadas com CaCl₂ por choque térmico, os procedimentos para obtenção de células termo-competentes foram retirados da seção II do Capítulo X do livro Técnicas básicas em biologia molecular (De-Souza; Brigido; Maranhão, 2016; Maranhão, 2016). Os seguintes passos foram realizados para a transformação das bactérias por choque térmico: (i) 3 uL de reação de ligação foram adicionadas a 50 uL de células competentes; (ii) as células passaram por um ciclo térmico de 30 minutos em gelo, 90 segundos a 42°C e um minuto em gelo novamente; (iii) e após o ciclo térmico, foram adicionadas 1 mL de meio LB e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora.

As células transformadas foram espalhadas em meio LB sólido suplementado com ampicilina (150 µg/mL), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) (0.00625% p/v) e IPTG (0,5 mM) e incubadas a 37°C *overnight*. As colônias positivas

para a transformação com plasmídeo e inserto (brancas) foram inoculadas em LB + ampicilina (150 µg/mL) e incubadas a 37°C sob agitação de 150 rpm *overnight*. O cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 5 min a 4 °C e o pellet foi utilizado para extração e purificação do DNA plasmidial utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Para quantificar o DNA plasmidial foi utilizado o kit *dsDNA BR Quant-it assay kit* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e o fluorômetro Qubit (Invitrogen, USA).

Para confirmar a eficiência da transformação e a presença dos insertos, o DNA plasmidial extraído foi digerido com a enzima de restrição EcoR1 (PROMEGA) e a digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (v/v) com tampão TBE 0,5%, avaliando o padrão de bandas. Em seguida, o DNA plasmidial dos clones foi sequenciado utilizando a plataforma Sanger pela empresa Macrogen (Seoul, Coréia do Sul). Os pares de primers para os promotores T7 (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3') e SP6 (5' ATTTAGGTGACACTATA 3') e os pares 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1494R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3') foram utilizados para o sequenciamento. As sequências passaram por uma avaliação de qualidade utilizando o *Phred score* utilizando a ferramenta Asparagin, disponível em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/> (Ewing *et al.*, 1998; Togawa *et al.*, 2006). Foram removidas as bases provenientes do vetor e foram mantidas as sequências com *Phred score* maior que 30 para as análises seguintes. O software Bioedit foi utilizado para alinhamento das sequências pares com o software ClustalW e após foi gerado a sequência consenso do gene (Hall, 2011; Larkin *et al.*, 2007).

Para a análise da assinatura taxonômica, foi utilizado a ferramenta Blastn, que utiliza o banco de dados do *GenBank* do *NCBI* (*National Center for Biotechnology information*) para comparação por similaridade das sequências (parâmetros utilizados no Blastn - banco de dados: *Standard databases, Nucleotide collection (nr/nt); Program Selection: Highly similar sequences (megablast)*). Em adição, foi utilizado a ferramenta SINA (v1.2.12) (<https://www.arb-silva.de/aligner/>) que utiliza o banco de dados do SILVA, realizando o alinhamento das sequências de genes de rRNA de acordo com o alinhamento global do SILVA para genes de rRNA (Pruesse; Peplies; Glöckner, 2012).

2.3.6. Análises filogenéticas

2.3.6.1. Árvores filogenéticas

A partir da sequência completa do gene rRNA 16S foi realizada a construção da árvore filogenética pelo método *Maximum-likelihood* (ML) com 1000 repetições de

amostragem (*Bootstrap*), para estimar a posição evolutiva da linhagem (Felsenstein, 1985; Kimura, 1980). Para construção, foi utilizado sequências do gene rRNA 16S das linhagens de espécies do gênero válidas e listadas no LPSN e depositadas no banco de dados *NCBI*. O software ClustalW foi utilizado para fazer o alinhamento das sequências (Larkin *et al.*, 2007). A construção da árvore filogenética foi realizada no programa Mega 11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021).

Ademais, foi construída uma árvore filogenética utilizando 31 marcadores moleculares selecionados do genoma pelo software AMPHORA2 (Wu; Scott, 2012). Além do genoma da PE 63, foram utilizados os genomas das linhagens do gênero listadas no LPSN e depositadas no banco de dados *NCBI* para seleção dos marcadores e construção da árvore. Após, a seleção dos marcadores as sequências foram concatenadas. Em seguida, as sequências concatenadas foram alinhadas utilizando o software ClustalW e a árvore foi construída utilizando o método *Maximum-likelihood* (ML) com 1000 repetições de amostragem (*Bootstrap*) no programa MEGA 11 (Felsenstein, 1985; Kimura, 1980; Tamura; Stecher; Kumar, 2021) .

2.3.6.2. Classificação taxonômica da linhagem com base na hibridização digital de DNA e Identidade Média de Nucleotídeos

A hibridização digital de *DNA* (dDDH - *digital DNA:DNA hybridization*) foi realizada na plataforma TYGS – DSMZ, para classificação taxonômica da linhagem e a confirmação da identidade (Meier-Kolthoff *et al.*, 2022).

A análise de *ANI* (Identidade Média de Nucleotídeos) foi analisada em 3 plataformas. Foi calculado o ANI na plataforma JSpeciesWS (<https://jspecies.ribohost.com/>), que gera o *ANIb* que representa a identidade nucleotídica média com base no cálculo BLAST e a *ANIm* que é a identidade nucleotídica média com base no cálculo MUMmer (Richter *et al.*, 2016). Também foram utilizados o *software* GTDB-Tk v. 1.7.0, disponibilizado na plataforma Kbase (Arkin *et al.*, 2018; Chaumeil *et al.*, 2022) e a ferramenta TrueBac ID disponibilizada no servidor do EZBioCloud (Ha *et al.*, 2019).

O genoma da PE 63 foi alinhado com o do genoma de sua linhagem mais próxima, de acordo com o resultado do TYGS-DSMZ, utilizando o *pipeline* PlotNucmer (https://github.com/fmalmeida/plot_nucmer), uma automação do MUMmer v 3.1 toolkit, que faz o alinhamento dos genomas por comprimento e identidade, juntamente com

Ggbio que gera uma visualização circular (Kurtz *et al.*, 2004; Yin; Cook; Lawrence, 2012).

2.3.6.3. Análise comparativa de pangenoma

Para a análise comparativa de pangenoma foi utilizada a ferramenta Roary v 3.13.0, a partir da anotação utilizando a ferramenta Prokka v 1.14.6 disponível no servidor Galaxy (AFGAN *et al.*, 2016; SEEMANN, 2014). Foram utilizadas a sequência do genoma de PE 63 e as sequências das dez linhagens mais próximas, de acordo com a classificação do TYGS-DSMZ. Os genomas das linhagens mais próximas foram obtidos do banco de dados do *NCBI*. Para agrupar os genes que codificam sequências completas de proteínas em genomas centrais foi definida uma identidade percentual mínima para BLASTp de 80% (Corretto *et al.*, 2017). O aplicativo *web* Phandango (<https://jameshadfield.github.io/phandango>) foi utilizado para visualização interativa do resultado do pangenoma (Hadfield *et al.*, 2018).

O servidor *web* OrthoVenn3 foi utilizado para uma análise comparativa do genoma da PE 63 e os genomas de duas linhagens mais próximas. Os parâmetros utilizados foram: algoritmo OrthoMCL; padrões de *E-value* ($1e-2$) e *Inflation value* (1,50). OrthoVenn3 é um servidor *web* que realiza análises genômicas comparativas realizando a identificação e anotação de *clusters* de genes ortólogos e a inferência de relações filogenéticas (Sun *et al.*, 2023).

2.3.7. Predição de genes e anotação funcional

Para a identificação de *clusters* gênicos relacionados ao metabolismo secundário (BCGs) dos microrganismos foi utilizado o *software* AntiSMASH v. 6.1.1 (Blin *et al.*, 2021). O Banco de Dados de Genes de Resistência a Antibióticos (*ARDB*) foi utilizado para seleção e anotação de genes potencialmente responsáveis pela resistência a antibióticos (Liu; Pop, 2009).

As categorias funcionais baseadas na classificação de *Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG)* da PE 63 e da sua linhagem mais próxima foram obtidas pela versão on-line do eggNOG-mapper v.2, onde vias metabólicas e genes de interesse foram comparados ao banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* (Huerta-Cepas *et al.*, 2017; Kanehisa *et al.*, 2007).

2.3.8. Caracterização fenotípica *in silico*

O software Traitair (*Microbial Trait Analyzer*) foi utilizado para prever fenótipos com base nas sequências do genoma de PE 63 e das linhagens mais próximas de acordo com TYGS-DSMZ, para comparação. Os genomas foram obtidos do banco de dados do *NCBI*. Este *software* realiza a busca 67 características fenotípicas utilizando o *software* Prodigal para predição de genes, em seguida as sequências de aminoácidos são anotadas com famílias de proteínas Pfams do banco de dados Pfam (versão 27.0) com o comando *hmmsearch* do HMMER 3.0 (Weimann *et al.*, 2016a).

O *software* usa dois modelos de predição para determinar as características fenotípicas: (i) o modelo *phypat* que prevê a presença/ausência de proteínas encontrados no fenótipo de 234 espécies bacterianas, e (ii) uma combinação de modelos *phypat* + *PGL* que utiliza a informação de *phypat* combinada com a informação da aquisição ou perda de famílias de proteínas e fenótipos através da evolução (Weimann *et al.*, 2016a). Com os dados gerados pelo traitair, um *heatmap* foi desenhado utilizando o software R com RSTUDIO com as ferramentas *viridis*, *heatmaply*, *ggplot2*, *hrbrthemes* e *plotly* (R Development Core Team, 2019; RStudio Team, 2021; Wickham, 2009).

2.4. Resultados

2.4.1. Caracterização fenotípica *in vitro*

As características fenotípicas das colônias da PE 63 diferenciam-se entre os meios NB e LB. Em meio NB, as colônias da *Comamonas* sp. PE 63 apresentam um formato redondo, convexo e irregular, envolta por uma névoa, já em meio LB as colônias apresentavam um formato mais sólido e sem a névoa em torno. Diferentemente do crescimento da *C. testosteroni* ATCC 11996, utilizada como linhagem de referência, que apresentou o formato de colônia sólida, convexo, com formato regular, sem névoa nos dois meios de cultura. Ambas são bactérias gram-negativas (Figura S2.1, Apêndice A) com células com formato bacilar (Figura 2.1), com uma membrana frágil e irregular, conforme observado na Figura 2.2 (a e d). No interior de suas células pode ser observado pequenos vacúolos, estruturas circulares com aparência em branco ou mais claras na imagem (Figura 2.2a, 2.2b, 2.2d e 2.2e) e múltiplos flagelos polares (Figura 2.2c e 2.2f).

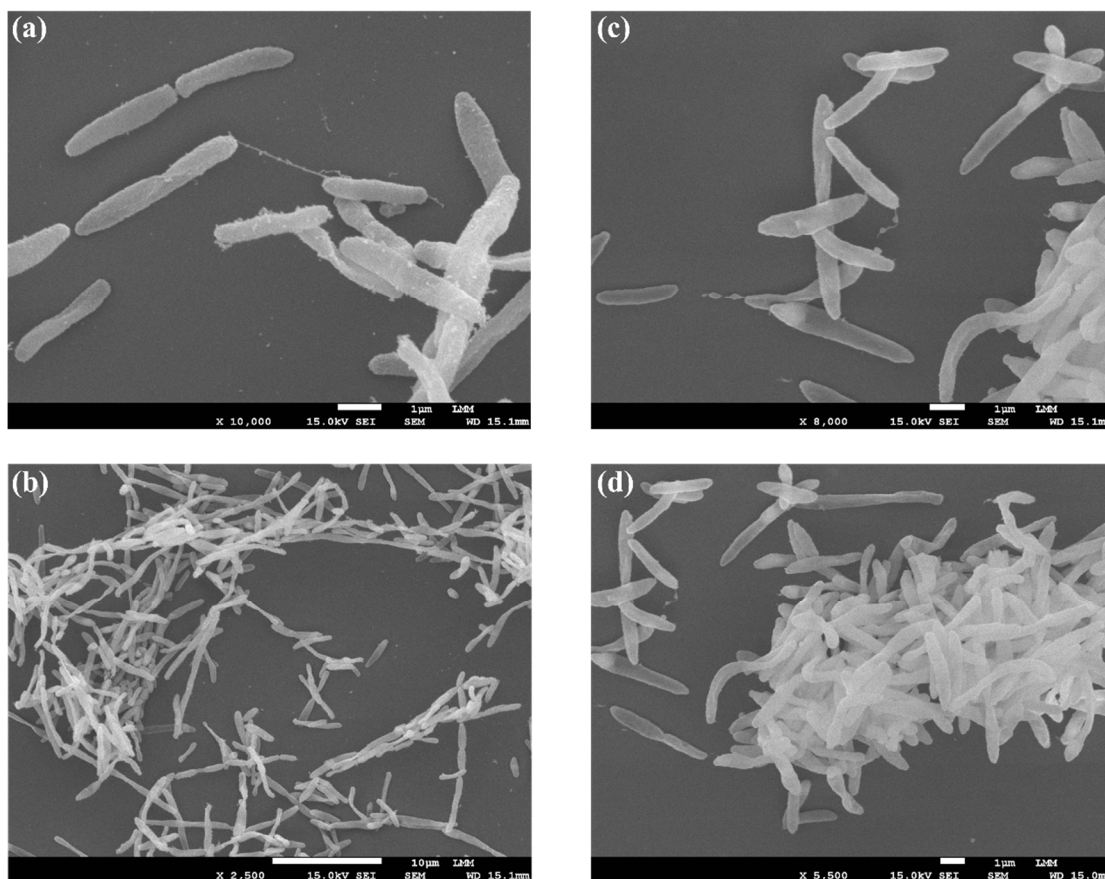


Figura 2.1. Micrografias eletrônicas de varredura. (a) e (b) *Comamonas* sp. PE 63; e (c) e (d) *C. testosteroni* ATCC 11996. (a) ampliação 10000x; (b) ampliação 2500x; (c) 8000; e (d) ampliação 5000x.

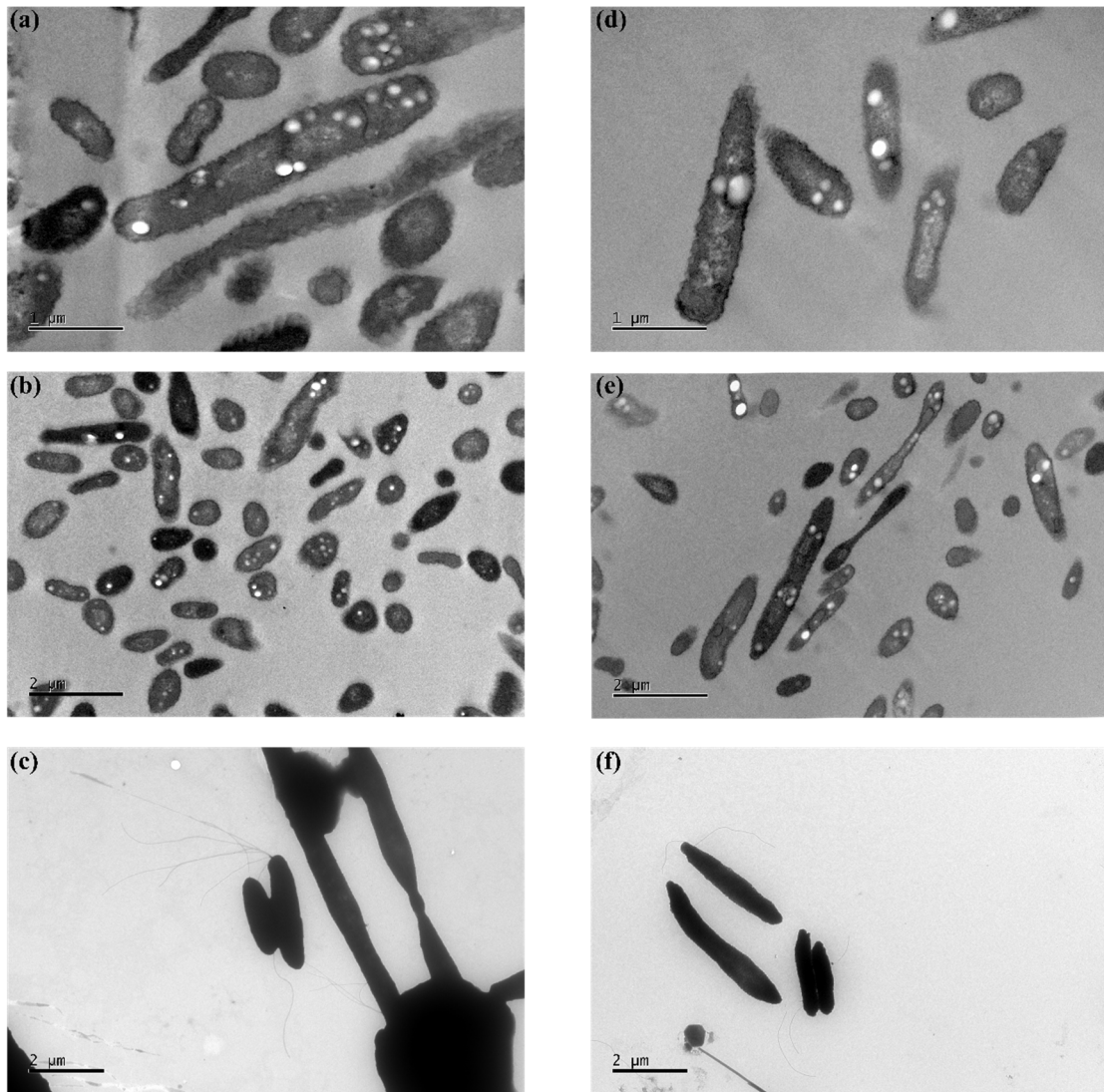


Figura 2.2. Micrografias eletrônicas de transmissão. (a), (b) e (c) *Comamonas* sp. PE 63; e (d), (e) e (f) *C. testosteroni* ATCC 11996. (a) e (d) aumento 5k; (b) e (e) 2500x.; (c) e (f) 2k.

A linhagem PE 63 apresentou crescimento entre as temperaturas 15 – 35 °C em meio NB, com crescimento ótimo a 30 °C (Tabela 2.1). Em relação a tolerância ao sal, a PE 63 cresceu em concentrações de NaCl (p/v) entre 0 – 4 %, com crescimento ótimo a 0 %, gráfico do crescimento na Figura S2.2 (Apêndice A). Nas condições as quais foram submetidas, utilizando meio de cultura com tampão para diferentes pHs as linhagens PE 63 e ATCC 11996 cresceram apenas em pH 8, porém com o crescimento sem a adição de tampão variando o pH com HCl e NaOH a linhagem PE 63 apresentou crescimento entre pHs 5 – 9, com pH ótimo a 7 (Figura S2.3, Apêndice A). Ambas as linhagens (PE 63 e ATCC 11996) foram positivas para atividade catalase, atividade oxidase, assimilação de citrato, hidrólise de uréia e mobilidade. Além disso, ambas as linhagens (PE 63 e ATCC 11996) obtiveram resultado negativo para assimilação de lisina, assimilação de triptofano,

produção de H₂S e gás (Tabela 2.1). Resultados das características fenotípicas estão descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Características fenotípicas da *Comamonas* sp. PE 63 e de suas linhagens mais próximas. Linhagens: 1. PE 63; 2. *C. testosteroni* ATCC 11996; 3. *C. testosteroni* NCTC 10698T; e 4. *C. thiooxydans* DSM 17888. Dados das linhagens PE 63 e ATCC 11996 foram gerados nesse trabalho, dados das demais foram extraídos do trabalho de Tamaoka *et al.* (1987) e Narayan *et al.* (2010).

	1	2	3	4
Temperatura (°C)	15 – 35 (30)	15 - 30 (30)	10 - 40	10 - 45
pH (NB com tampão)	8	8	-	-
pH	5 – 9 (7)	-	6 – 8,5	6 - 9
NaCl (%)	0 - 4 (0)	0 - 3 (0)	0 - 2	0 - 3
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-
Mobilidade	+	+	+	+
Produção de H₂S	-	-	-	+
Hidrólise de Uréia	+	+	+	+
Triptofano	-	-	-	-
Produção de gás	-	-	-	-

Os ácidos graxos mais abundantes na PE 63 foram C 16:0 (26,94%), C 15:0 iso (10,94), C 14:0 (8,94%), *Summed Feature 3* (16:1 w7c ou 16:1 w6c ou 16:1) (15,8%), *Summed Feature 8* (18:1 w7c e/ou 18:1 w6c) (12,03%), *Sum In Feature 3* (16:1 w7c ou 16:1) (15,8%) e *Sum In Feature 8* (18:1 w7c) (12,03%). Em comparação com as demais linhagens, somente a PE 63 apresentou os ácidos graxos de cadeia ramificada C 13:0 iso, C 15:0 iso, C 16:0 iso e C 15:0 anteiso. A PE 63 não apresentou os C 12:0 iso e C 19:0 cyclo w9c presentes nas linhagens da literatura utilizadas na comparação (Tabela 2.2). Em relação as outras linhagens, apenas a PE 63 apresentou o ácido graxo com hidroxila C 16:0 3-OH, os ácidos graxos de cadeia ramificada e hidroxila e os ácidos graxos insaturados.

No que diz respeito, aos *Summed Feature* e *Sum in Feature*, que são picos com separação imperfeita, apenas a linhagem PE 63 apresentou os *Summed Feature 2*, um possível ácido graxo C 12:0 aldeído, e *Summed Feature 9*, possivelmente o ácido graxo

de caída linear C 16:0 10-methyl ou o ácido graxo insaturado de cadeia ramificada C 17:1 iso w9c; e o *Sum in Feature 2*, ácido graxo com hidroxila C 14:0 3-OH ou o ácido graxo de cadeia ramificada C 16:1 iso I e *Sum in Feature 9*, possivelmente o ácido graxo insaturado de cadeia ramificada C 17:1 iso w9c (Tabela 2.2).

A *C. testosteroni* NCTC 10698T e a ATCC 11996 são a mesma linhagem depositadas em bancos de coleções distintas. *C. testosteroni* NCTC 10698T depositada no banco de coleção NCTC (*National Collection of Type Cultures*) do Reino Unido e a ATCC 11996 está depositada no ATCC (*American Type Culture Collection*), dos EUA.

Tabela 2.2. Composição de ácidos graxos (%) da linhagem *Comamonas* sp. PE 63 e espécies correlatadas do gênero. Linhagens: 1. *Comamonas* sp. PE 63; 2. *Comamonas testosteroni* ATCC 11996; 3, *C. testosteroni* NCTC 10698T; e 4, *C. thiooxydans* DSM 17888. Dados da *Comamonas* sp. PE 63 e *Comamonas testosteroni* ATCC 11996 foram gerados nesse trabalho, dados das demais foram extraídos do trabalho de Park *et al.* (2022). TR: Quantidade traço (<0,5%)

Ácido graxo	1	2	3	4
Cadeia linear				
C 10:0	-	-	2,3	2
C 12:0	0,59	2,78	4,5	4,4
C 14:0	8,94	0,63	1,4	1,6
C 16:0	26,94	31,37	32,9	30,6
C 17:0	0,58	0,50	TR	-
C 18:0	5,42	0,55	TR	TR
Cadeia ramificada				
C 12:0 iso	-	-	2,3	0,6
C 13:0 iso	1,34*	-	-	-
C 15:0 iso	10,94*	-	-	-
C 16:0 iso	TR	-	-	-
C 15:0 anteiso	TR	-	-	-
C 17:0 cyclo	2,41	0,69	0,7	1
C 19:0 cyclo w8c	TR	TR	-	-
C 19:0 cyclo w9c	-	-	TR	TR
Hidroxila				
C 10:0 3-OH	-	4,62	4,2	3,8
C 11:0 2-OH	-	-	0,6	0,5
C 14:0 2-OH	-	0,50	0,6	0,5

C 16:0 2-OH	-	1,79	2,2	2,3
C 16:0 3-OH	1,18*	-	-	-
C 16:1 2-OH	-	TR	0,6	0,76
Cadeia ramificada e hidroxila				
C 17:0 iso 3-OH	2,25*	-	-	-
C 15:0 iso 3-OH	1,11*	-	-	-
Insaturado				
C 18:1 w9c	3,01*	-	-	-
<i>Summed Feature</i>				
1 (C 13:0 3-OH e/ou iso-C 15:1)	-	-	0,9	0,8
2 (12:0 aldeído)	4,34*	-	-	-
3 (16:1 w7c ou 16:1 w6c ou 16:1)	15,8	37,35	37,6	40
8 (18:1 w7c e/ou 18:1 w6c)	12,03	18,43	9,9	10,3
9 (16:0 10-methyl ou 17:1 iso w9c)	2,19*	-	-	-
<i>Sum in Feature</i>				
2 (14:0 3-OH / 16:1 iso I)	4,34*	-	-	-
3 (16:1 w7c ou 16:1)	15,8	37,35	-	-
8 (18:1 w7c)	12,03	18,43	-	-
9 (17:1 iso w9c)	2,19*	-	-	-

*ácidos graxos presentes apenas na linhagem *Comamonas* sp. PE 63.

2.4.2. Análise filogenética

Realizando a comparação do gene marcador molecular rRNA 16S com o banco de dados do *NCBI* pela ferramenta BLASTn o gene da linhagem PE 63 obteve uma identidade de 99,8 % com o gene da *Comamonas testosteroni* CP2D3-03 (MK533986.1) (Tabela 2.3). Utilizando a ferramenta SINA v1.2.12 ACT foi realizado a comparação do gene em questão com o banco de dados do Silva, onde resultou em uma identidade de 99,93 % com o gene de *Comamonas testosteroni*.

Tabela 2.3. Comparação do gene rRNA 16S da *Comamonas* sp. PE 63 com o banco de dados do *NCBI*, através da ferramenta *BLASTn*.

Descrição	Max Score	Total Score	Cobertura	Identidade	Nº de acesso
<i>C. testosteroni</i> CP2D3-03	2717	2717	98%	99.80%	MK533986.1
<i>C. testosteroni</i> 74	2715	2715	98%	99.80%	MF457557.1
<i>C. testosteroni</i> CP2D8-05	2715	2715	98%	99.80%	MK534008.1
<i>C. testosteroni</i> KS	2737	2737	99%	99.73%	NR_029161.2
<i>C. thiooxydans</i> R2	2737	24624	99%	99.73%	AP026738.1
Uncultured bacterium clone M127	2737	2737	99%	99.73%	KC894574.1
Uncultured bacterium clone BloS7-072	2737	2737	99%	99.73%	JQ906327.1
<i>P. testosteroni</i> 16S	2737	2737	99%	99.73%	M11224.1
<i>C. testosteroni</i> CP2D6-04	2713	2713	99%	99.73%	MK533998.1
<i>C. testosteroni</i> CP2D5-06	2713	2713	99%	99.73%	MK533995.1
Uncultured <i>Comamonas</i> sp.	2732	2732	99%	99.66%	LC093418.1
<i>C. thiooxydans</i> isolate C19	2732	5464	99%	99.66%	LN879547.1
<i>C. testosteroni</i> X13	2732	21858	99%	99.66%	CP090445.1
<i>C. sp.</i> C11	2732	24590	99%	99.66%	CP101743.1
<i>C. sp.</i> A-3 16S	2732	2732	99%	99.66%	OP048079.1

A árvore filogenética gerada a partir das sequências do gene rRNA 16S mostrou que a PE 63 está presente no mesmo clado que as *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxydans* S23 (Figura 2.3).

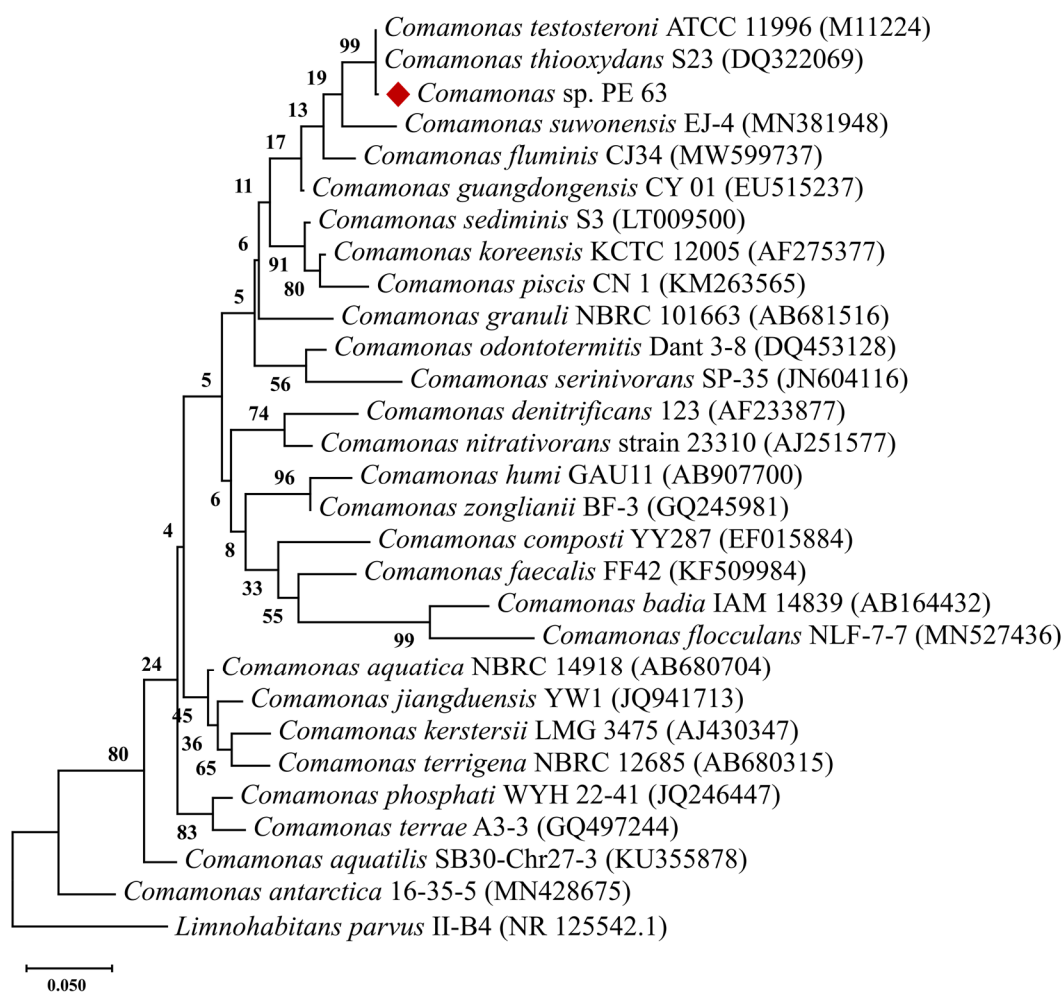


Figura 2.3. Árvore filogenética baseada na sequência do gene ribossomal RNA 16S obtido por clonagem e sequenciamento de Sanger da linhagem *Comamonas* sp. PE 63. A posição evolutiva da linhagem foi estimada pela construção de uma árvore filogenética usando o método Maximum-likelihood (ML) com 1000 repetições de Bootstrap, usando sequências representativas do gene rRNA 16S de linhagens do gênero presentes no banco de dados do *NCBI*. Alinhamento realizado no Clustalw e construção da árvore realizada no MEGA 11. ◆: Destaque para a *Comamonas* sp. PE 63.

O genoma da *Comamonas* sp. PE 63 apresenta tamanho de 5,4 Mb, em 9 *contigs*, apresentando teor de G+C de 62,1 %. Os parâmetros de qualidade mostraram uma contaminação de 0,62 %, completude de 99,85 %, cobertura de 743x, N50 de 915,874 % e L50 igual a 2. A anotação gerada pelo software Prokka identificou 4872 *CDS* (sequências codificadoras), 6 rRNA, 80 tRNA e 1 TmRNA (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Dados do genoma da *Comamonas* sp. PE 63 (GCF_018292285.1). A anotação foi realizada com o software Prokka e os parâmetros de qualidade foram avaliados nos softwares CheckM, Bowtie2 e Quast.

Dados da montagem	
<i>Contigs</i>	9
CDS	4872
rRNA	6
tRNA	80
TmRNA	1
Teor de G+C (%)	62,1
Contaminação (%)	0,62
Compleitude (%)	99,85
Cobertura	743x
L50	2
N50 (kb)	915,874
Tamanho Total (Mb)	5,4

A árvore gerada com os 31 marcadores selecionados pelo *software* AMPHORA2 e concatenados, agrupou a *Comamonas* sp. PE 63 no mesmo clado que *C. testosteroni* ATCC 1196 e *C. thiooxydans* DSM 17888, porém essas duas últimas formavam um subclado separado dentro do clado com a PE 63 (Figura 2.4).

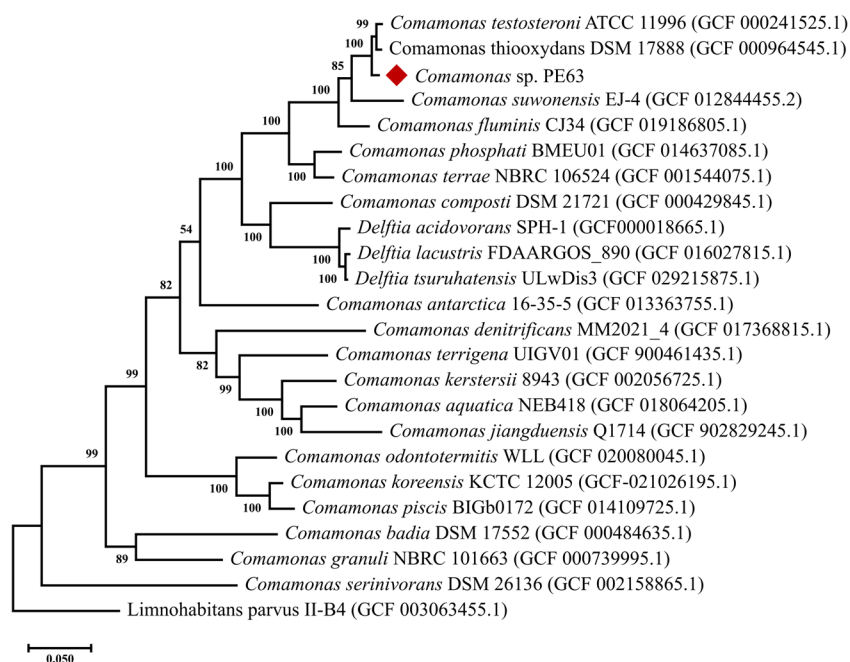


Figura 2.4. Árvore filogenética baseada em 31 marcadores moleculares proteicos selecionados pelo AMPHORA2 indicando o posicionamento taxonômico de *Comamonas* sp. PE 63. A posição evolutiva da linhagem foi estimada pela construção de uma árvore filogenética usando o método Maximum-likelihood (ML) com 1000 repetições de amostragem (Bootstrap). Alinhamento realizado no ClustalW e construção da árvore realizada no MEGA 11. *Limnohabitans parvus* II-B4 foi utilizado como outgroup. Todas as outras seqüências das linhagens utilizadas para construção da árvore foram obtidas do banco de dados do NCBI.

O cálculo de *ANI* (*Average Nucleotide Identity*) analisados tanto pela plataforma JspeciesWS (*ANIm* e *ANIm*) quanto pela plataforma GTDB-tk (*ANI Estimate*) e pelo servidor TrueBac ID calculados para o genoma da *Comamonas* sp. PE 63 determinaram um ANI < 93 % em relação ao genoma da *Comamonas testosteroni* (Tabela 2.5). A análise da hibridização digital de DNA dDDH gerada pelo TYGS – DSMZ mostrou que a linhagem mais próxima a PE 63 é a *Comamonas testosteroni* ATCC 11996, com valor de dDDH de 48,6 % (Tabela 2.6). O alinhamento dos genomas da PE 63 e ATCC 11996 apresentou um valor de 10,76 % de regiões desalinhadas, mostrando que os genomas apresentam poucas divergências entre si (Figura 2.5).

Tabela 2.5. Identidade Média de Nucleotídeos (Average Nucleotide Identity - ANI) calculadas para a linhagem *Comamonas* sp. PE 63, calculada na plataforma JSpeciesWS (ANiB e ANIm), na plataforma GTDB-Tk (ANI Estimate) e no servidor TrueBac ID (EZBioCloud) (ANI).

Linhagem isolada do Cerrado	Linhagens Comparativas	JspeciesWS		GTDB-tk	TrueBac ID
		ANiB (%)	ANIm (%)	ANI (%)	ANI (%)
<i>Comamonas</i> sp. PE 63	<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996*	91.91	93.00	92.9617	
	<i>C. thiooxidans</i> DSM 17888*	91.35	92.57	92.5447	
	<i>C. testosterone</i>				93
	<i>C. thiooxidans</i>				92.54

* *C. testosteroni* ATCC 11996 (AHIL01000001), *C. thiooxidans* DSM 17888 (NZ_BBVD01000043).

Tabela 2.6. Hibridização digital do DNA (*dDDH*) gerado pela plataforma TYGS-DSMZ entre o genoma de *Comamonas* sp. PE 63 e as espécies descritas para o gênero até novembro de 2023.

dDDH Fórmula 4 -d₄			
<i>Comamonas</i> sp. PE 63	(Similaridade baseada na identidade das sequências)		
Genoma de referência	dDDH (d ₄ %)	Model C.I. (%)	G+C Difference (%)
<i>C. testosteroni</i> ATCC 11996	48,6	[46 – 51,2]	0,59
<i>C. thiooxydans</i> DSM 17888	46,8	[44,2 – 49,3]	0,48
<i>C. suwonensis</i> EJ-4	26,2	[23,9 – 28,7]	3,21
<i>C. fluminis</i> CJ34T	26	[23,6 – 28,4]	2,34
<i>C. phosphati</i> CGMCC 1.12294	25,7	[23,4 – 28,2]	3,11
<i>C. terrae</i> NBRC 106524	25,2	[22,9 – 27,7]	3,67
<i>C. terrigena</i> NBRC 13299	24	[21,7 – 26,4]	3,04
<i>D. lacustris</i> LMG 24775	23,2	[20,9 – 25,7]	4,16
<i>D. acidovorans</i> NBRC 14950	23,2	[20,9 – 25,7]	4,69
<i>D. tsuruhatensis</i> NBRC 16741	23,2	[20,9 – 25,6]	4,52
<i>C. composti</i> DSM 21721	22,8	[20,5 – 25,3]	1,21
<i>C. avium</i> Sa2CVA6	21,9	[19,6 – 24,3]	4,56
<i>A. anthurii</i> DSM 16745	21,1	[18,9 – 23,6]	6,82
<i>L. parvus</i> CIP109845	20,1	[17,8 – 22,5]	2,83

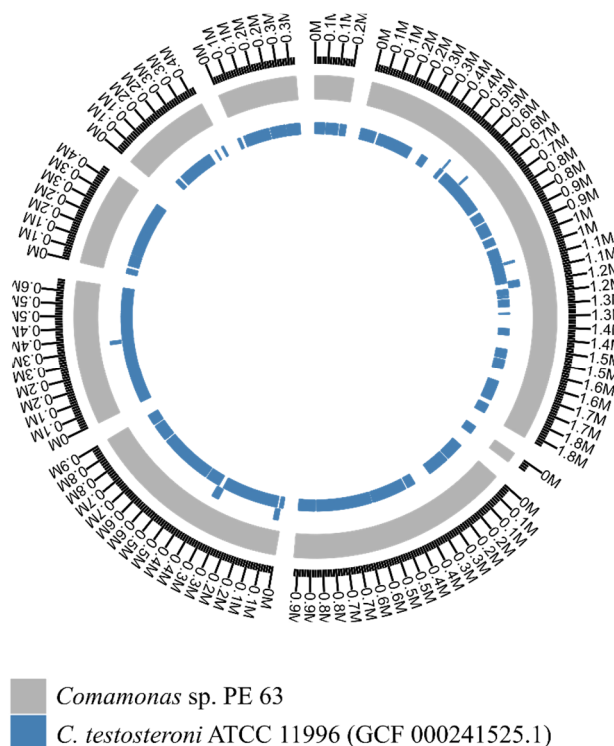


Figura 2.5. Visualização circular do alinhamento dos genomas da *Comamonas* sp. PE 63 (em cinza) e sua linhagem mais próxima de acordo com TYGS-DSMZ, *Comamonas testosteroni* ATCC 11996 (em azul). O alinhamento e a ilustração foram gerados usando o PlotNucmer. Apenas os blocos de alinhamento do genoma com pelo menos 1000 nucleotídeos e 90% de identidade são mostrados. A banda externa é a escala de tamanho dos *contigs*. A dupla camada de profundidade da banda azul representa duas sequências da linhagem mais próxima que se sobrepõem no mesmo local na linhagem *Comamonas* sp. PE 63.

2.4.3. Análises comparativas e características funcionais do genoma

Realizando a análise do pangenoma da PE 63 com as linhagens mais próximas de acordo com o resultado do TYGS-DSMZ, foram identificadas 20835 famílias gênicas e, dentre essas, 4,49 % estavam presentes no núcleo do genoma (*Core genes*), 39,98 % de genes acessórios (*Shell genes*) e 55,57 % de genes raros (*Cloud genes*) (Figura 2.6a). A visualização gráfica interativa dos dados gerados pelo Roary no aplicativo *web Phandango*, mostrou que *Comamonas* sp. PE 63 se agrupou no mesmo clado que *C. testosteroni* e *C. thiooxydans*, porém essas duas últimas formavam um subclado separado. Além disso, a matriz de ausência (partes em branco) e presença (partes em azul) de genes raros, gerada pelo Phandango, pode ser observado um padrão de ausência e presença muito semelhante entre os três microrganismos em comparação com os demais próximos a PE 63 (Figura 2.6b).

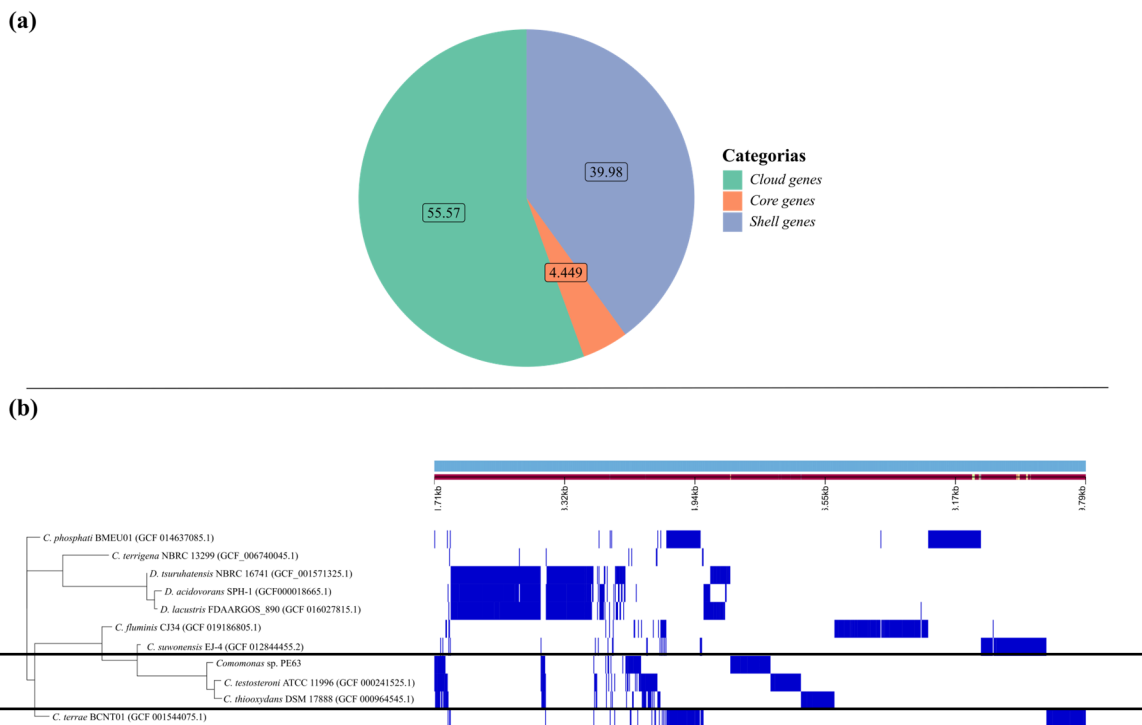


Figura 2.6. Análise comparativa de pangenoma. (a) Análise comparativa de pangenoma realizada no Roary, identidade percentual mínima para BLASTp de 80% foi definida para agrupar os genes que codificam seqüências de proteínas completas em genomas centrais.; (b) Visualização gráfica gerada pelo servidor Phandango, onde é mostrado a árvore filogenética gerada pelo Roary e uma matriz de ausência (partes em branco) e presença (partes em azul) de genes raros, o retângulo em preto está destacando o clado da PE 63 e a matriz dos genomas desse clado.

A análise das categorias funcionais baseadas na classificação de *Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG)*, representadas por letras (Tatusov, 2000; Tatusov *et al.*, 2003), mostrou que 21 % dos *Clusters* do genoma da PE 63 foram classificados na categoria S, proteínas de função desconhecida. As categorias mais abundantes, dentre as anotadas são as categorias C (8 %) - metabolismo energético (produção e conversão de energia), E (8 %) - metabolismo de aminoácidos e transporte, K (9 %) - transcrição e P (6 %) - transporte e metabolismo de íons inorgânicos. As proteínas que não foram anotadas em nenhuma das categorias *COG* estão representadas pela categoria *unknow* (6 %) (Figura 2.7).

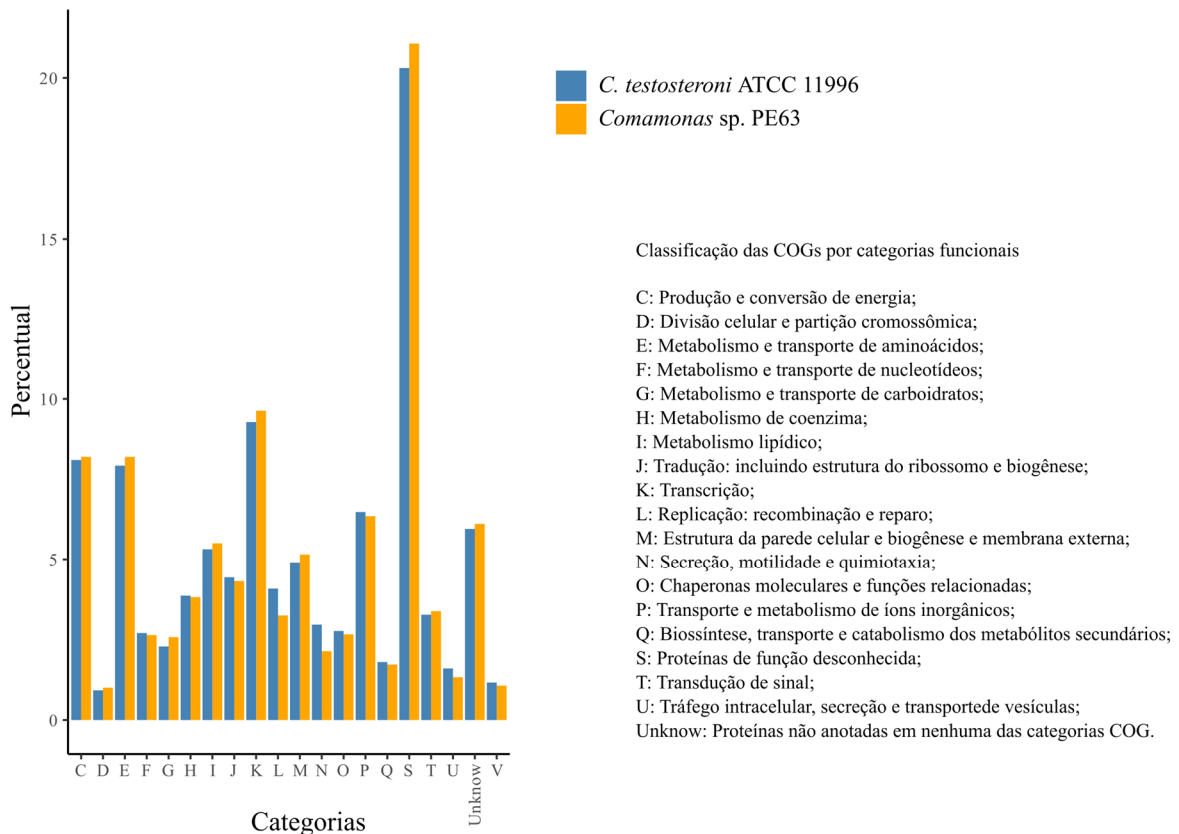


Figura 2.7. Proteínas previstas no genoma das linhagens *Comamonas* sp. PE 63, barras em laranja, e a referência *C. testosteroni* ATCC 11996, barras em azul, classificadas de acordo com as categorias COGs.

Os genes anotados como potenciais responsáveis pela resistência a antibióticos no banco de dados do ARDB apresentaram valores de similaridades semelhantes para a PE 63 e ATCC 11996. Ambas apresentaram um gene *qacJ*, gene referente a uma bomba de efluxo de antibiótico para resistência a compostos de amônio quaternário, com similaridade < 40 %, dois genes *adeF*, referentes a uma bomba de efluxo de antibiótico para resistência de fluoroquinolona e tetraciclina, com similaridades de um < 71 % e < 60 %, respectivamente, e um gene *FosA8*, gene que codifica produto que confere resistência a fosfomicina pelo mecanismo de inativação de antibiótico, com similaridades < 60% (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. A análise da anotação de genes potenciais responsáveis pela resistência a antibióticos utilizando o Banco de Dados de Genes de Resistência a Antibióticos (ARDB). 1: *Comamonas* sp. PE 63; e 2: *C. testosteroni* ATCC 11996. Similaridade em porcentagem (%).

Gene	Família	Classe de droga	Mecanismo de resistência	1 (%)	2 (%)
qacJ	Bomba de pequena resistência a múltiplas drogas (SMR)	Agentes desinfetantes antissépticos	Bomba de efluxo e (resistência a compostos de amônio quaternário)	39,42	40,38
adeF	Resistência-Nodulação-Divisão celular (RND)	Fluoroquinolona tetraciclina	Bomba de efluxo e	70,98	70,98
adeF	Resistência-Nodulação-Divisão celular (RND)	Fluoroquinolona tetraciclina	Bomba de efluxo e	58,45	58,26
FosA8	Fosfomicina transferase	tiol-Fosfomicina (antibiótico derivado do ácido fosfônico)	Inativação de antibiótico	56,62	55,88

Foram identificados três tipos de clusters de genes para a biossíntese de metabólitos secundários em comum nas linhagens PE 63, ATCC 11996 e DSM 17888. São eles: *clusters* de terpeno, dois de betalactona e um resorcinol. O *cluster* NAPAA foi encontrado somente na PE 63 (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. A análise de clusters de genes biossintéticos para metabólitos secundários realizada pelo servidor AntiSMASH (v. 7.0.1). 1: *Comamonas* sp. PE 63; 2: *C. testosteroni* ATCC 11996 (GCF 000241525.1); e 3: *C. thiooxidans* DSM 17888 (GCF 000964545.1).

	Metabólitos secundários		
	Nº clusters		
	1	2	3
NAPAA	1	-	-
Terpeno	1	1	1
Betalactona	2	2	2
Resorcinol	1	1	1

A figura 2.8 apresenta a comparação das predições das características fenotípicas de PE 63 e das seis linhagens mais próximas de acordo com o resultado do TYGS-DSMZ. Para a construção do *heatmap* foram retiradas as predições dos fenótipos que obtiveram resultado zero (predição negativa) em todas as linhagens. De acordo com o resultado, a

linhagem PE 63 apresenta características fenotípicas próximas com as linhagens *C. testosteroni*, *C. thiooxydans* e *C. suwonensis*. A predição de redução de nitrato a nitrito, assimilação de glicerol para a linhagem PE 63 foi positiva apenas para um dos preditores enquanto para as outras linhagens foram positivas para os dois preditores. Assimilação de celobiose foi positiva para PE 63 nos dois preditores e as outras três linhagens apenas para o preditor phypat+PGL ou nenhum. Somente a PE 63 apresentou resultado positivo para assimilação de D-xilose, no preditor phypat.

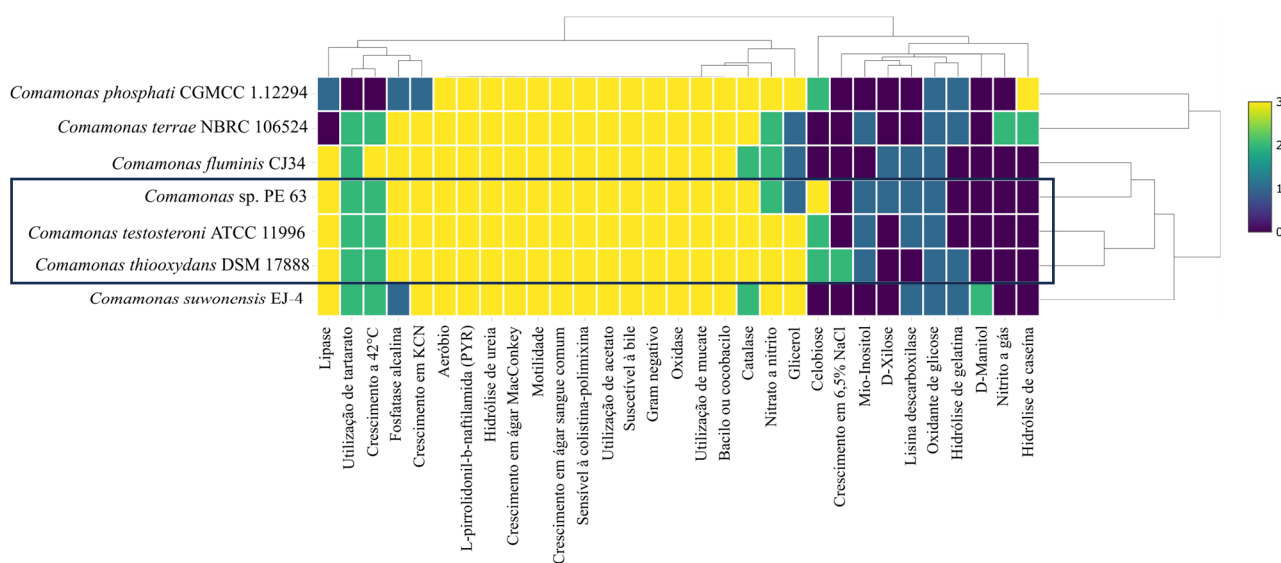


Figura 2.8. Predições fenotípicas para o genoma da *Comamonas* sp. PE 63 e os seis genomas das linhagens mais próximas, de acordo com o TYGS-DSMZ, obtidas no banco de dados do *NCBI*. A análise realizada pelo *software* Traitair. O valor 3 (coloração amarela): fenótipo positivo nos dois preditores (phypat e phypat+PGL); Valor 2 (coloração verde): fenótipo positivo no preditor phypat+PGL; Valor 1 (coloração azul): fenótipo positivo no preditor phypat; e Valor 0 (coloração roxa): fenótipo negativo nos dois preditores. Foram retirados os fenótipos que tiveram valor zero para todas as linhagens. O retângulo em preto está destacando a linhagem PE 63, a ATCC 11996 e a DSM 17888.

As predições fenotípicas geradas pelo *software* Traitair para *Comamonas* PE 63 (Tabela 2.9) apresentaram como positivas as características como atividade para catalase, oxidase e urease. Além disso, as predições se mostraram negativas para formação de esporos, fermentação, produção de H₂S, produção de gás, utilização de lisina e triptofano. Pelas predições a linhagem PE 63 é dotada de mobilidade e não assimila D-manitol, maltose, L-Arabinose, D-manose, lactose, amido, sacarose, sorbitol, esculina, L-arabinose, L-ramnose, melibiose, trealose, rafinose, salicilina e caseína, mas assimila celobiose, glicose, xilose, glicerol e inositol. Em relação as atividades enzimáticas, foram positivas para fosfatase alcalina, redução de nitrato, lipase e pirrolidoniol peptidase, β-

galactosidase e negativa para beta-hemólise, produção de coagulase e DNase. Pela predição, a linhagem PE 63 não assimila arginina, ornitina, triptofano, assimila malonato, vermelho de metila e utiliza tartarato e acetato e lisina.

Tabela 2.9. Comparação entre as predições fenotípicas obtidas pelo trítar e os dados da literatura para o gênero *Comamonas*. Linhagens: 1, PE 63 resultado trítar; 2, ATCC 11996 resultado trítar; 3, *C. testosteroni* ATCC 11996, 4 *C. thiooxidans* DSM 17888; 5 *C. fluminis* CJ34. Dados das linhagens 3, 4 e 5 foram obtidos dos trabalhos de Tamaoka *et al.* (1987), Narayan *et al.* (2010) e de Park *et al.* (2022). Os fenótipos preditos pelo trítar que foram positivos para os dois preditores estão com o símbolo de “+”; aqueles que obtiveram positivo apenas para o preditor phyptat+PGL estão com o símbolo de “+²”; e aqueles que obtiveram positivo apenas para o preditor phyptat estão com o símbolo de “+¹”. Espaços em branco: sem dados presentes na literatura. ND: sem dados

	1	2	3	4	5
Aeróbios, mobilidade,					
Gram negativo,	+	+	+	+	+
Oxidase					
Anaeróbio	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Indol	-	-	ND	-	-
Crescimento em ágar					
MacConkey e	+	+	+	+	ND
Utilização de acetato					
Formação de esporos	-	-	-	ND	ND
DNase	-	-	-	ND	-
Urease	+	+	+	+	-
Redução de nitrato	+ ²	+	+	+	-
Produção de H₂S	-	-	-	+	ND
Citrato	-	-	+	+	-
β-galactosidase	-	-	+	-	-
Fosfatase alcalina	+	+	+	-	ND
Arginina hidrolase	-	-	-	+	-
Assimilação de					
malonato	-	-	-	ND	ND
Utilização de tartarato	+ ²	+ ²	-	ND	ND
Fontes de carbono					
Sacarose	-	-	-	-	ND
Glicose	+ ¹	+ ¹	-	+	-

Lactose	-	-	-	+	ND
D-Xilose	+ ¹	-	-	-	ND
Celobiose	+	+ ²	-	ND	-
Glicerol	+ ¹	+	-	ND	ND
Hidrólise de amido	-	-	-	+	-
D-manose	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-
D-Manitol, Maltose, e	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-

Pelo diagrama de Venn, gerado pelo servidor *web* Orthovenn3, 3846 *clusters* de genes ortólogos são compartilhados entre as três linhagens de *Comamonas* (PE 63, ATCC 11996 e DSM 17888). O número de *clusters* de genes ortólogos únicos nas linhagens foi 36 para PE 63, 21 para ATCC 11996 e 15 para DSM 17888, mostrando maior presença de *clusters* únicos na PE 63. Analisando os *clusters* de genes ortólogos compartilhados entre cada linhagem, foi observado que a PE 63 e a DSM 17888, compartilharam mais *clusters* com a ATCC 11996 (174 para PE 63 e 241 para DSM 17888) do que entre si (Figura 2.9).

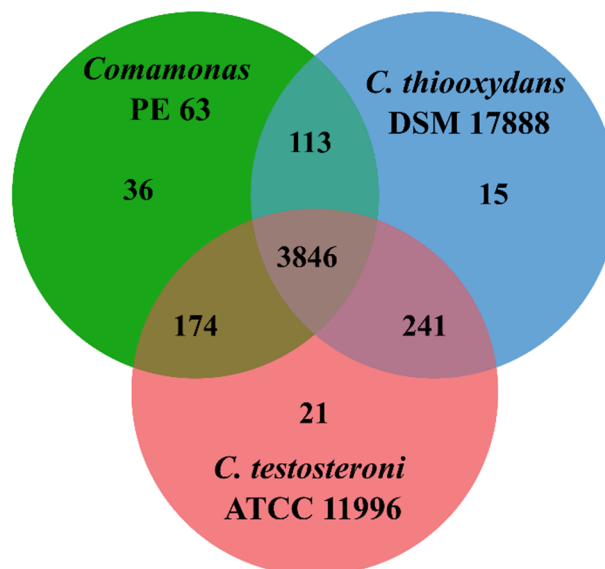


Figura 2.9. Diagrama de Venn dos *clusters* de genes ortólogos da *Comamonas* sp. PE 63 e das linhagens do gênero mais próximas. Diagrama gerado pelo orthovenn3, servidor que realiza a comparação dos genomas por meio da identificação de *clusters* de genes ortólogos.

2.5. Discussão

Comamonas sp. PE 63 é um microrganismo bacilar gram-negativo, aeróbio, flagelar, com colônias com formato irregular e envolta por uma névoa quando crescidas em NB. Assim como outras espécies de *Comamonas*, como a *C. terrigena* ATCC 8451, *C. testosteroni* ATCC 1196 e *C. acidovorans* ATCC 15668 (Tamaoka; Ha; Komagata, 1987), que acumulam polihidroxicanoatos (PHA) nas suas células, a PE 63 apresenta em suas células estruturas circulares que, provavelmente, são grânulos de PHA. Tais estruturas podem ser verificadas em outras micrografias de MEV, onde aparecem refletidas e totalmente brancas (Mumtaz *et al.*, 2010; Zakaria *et al.*, 2013). Outro indicativo de que essas estruturas possam ser PHA é a presença de genes no genoma da PE 63 que participam da produção dessa molécula, como acetoacetil-CoA redutase (gene phaB), acetil-CoA acetiltransferase (gene phaA), poly(3-hidroxicanoato) polimerase (gene phaC). Além disso, análises de pangenoma mostraram que o gênero *Comamonas* apresenta vias metabólicas centrais que utilizam várias fontes de nutrientes e armazenam recursos em excesso na forma de PHB (um tipo de PHA) (Wu; Zaiden; Cao, 2018a).

Os PHAs são bioplásticos produzidos por diversos microrganismos que estão ganhando muita atenção de pesquisadores de polímeros, devido às suas propriedades térmicas e mecânicas semelhantes aos plásticos de base petroquímica. A produção e a utilização de PHAs pode vir a ser uma alternativa sustentável para substituir os plásticos convencionais (Lee; Azizan; Sudesh, 2004; Saito; Doi, 1994; Tamaoka; Ha; Komagata, 1987; Wu; Zaiden; Cao, 2018b; Zakaria *et al.*, 2013).

Diferentemente da *C. testosteroni* NCTC 10698T e *C. thiooxydans* DSM 17888 que crescem entre 10 – 40 °C, PE 63 cresce em um menor intervalo de temperaturas, entre 15 - 35°C. Ainda em relação ao cultivo, a linhagem PE 63 tolera até 4 % de concentração de NaCl e seu crescimento ocorre em valor de pH a partir de 5, enquanto as linhagens de comparação suportam até 3 % de NaCl, com crescimento a partir do pH 6 (Narayan; Pandey; Das, 2010; Tamaoka; Ha; Komagata, 1987).

O perfil de ácidos graxos analisados por cromatografia gasosa é uma técnica bem robusta e bastante utilizada para identificação de bactérias, essa técnica não só realiza a identificação de uma bactéria pela presença ou ausência de cada ácido graxo, mas também por uma análise quantitativa de cada ácido. O *MIDI Research and Development Laboratory* com o Sherlock™ Microbial Identification System (MIS) identifica as bactérias com base em seus perfis únicos de ácidos graxos e já analisou mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados em bactérias. A biblioteca Sherlock consiste em

mais de 100.000 análises de linhagens obtidas de várias coleções de cultura (Sasser, 1990).

A comparação do perfil de ácidos graxos da PE 63 contra o perfil da *C. testosteroni* ATCC 11996, da *C. testosteroni* NCTC 10698T e *C. thiooxydans* DSM 17888, mostrou que o ácido graxo de cadeia linear C 16:0 é o mais abundante em todas. Esse ácido graxo C 16:0 está presente em todas as linhagens de *Comamonas*, com valores superiores a 25% (Kang *et al.*, 2016; Narayan; Pandey; Das, 2010; Park; Kim; Cha, 2022; Park *et al.*, 2021; Tamaoka; Ha; Komagata, 1987; Xie *et al.*, 2016; Xu, Q. *et al.*, 2019).

Dentre os ácidos graxos de cadeia linear, diferentemente dos dados das linhagens da literatura NCTC 10698T e DSM 17888, a PE 63 não apresentou o ácido graxo C 10:0. As demais linhagens, ATCC 11996, NCTC 10698T e DSM 17888, apresentavam valores dos ácidos graxos C 14:0 e C 18:0 < 0,6%, já a linhagem PE 63 apresentou valores de 8,94% e 5,42%, respectivamente. Analisando e comparando os ácidos graxos de cadeia ramificada, a linhagem PE 63 não apresentou os ácidos graxos C 12:0 iso e C 19:0 cyclo w9c que estavam presentes nas outras linhagens, enquanto isso as demais linhagens não apresentaram os ácidos graxos C 13:0 iso, C 15:0 iso, C 16:0 iso e C 15:0 anteiso que estavam presentes na PE 63. Vale destacar, a quantidade de ácido graxo C 17:0 cyclo três vezes superior para a linhagem PE 63 em relação as demais.

A respeito dos ácidos graxos com hidroxila, a PE 63 apresentou somente o C 16:0 3-OH, ausente nas outras linhagens, e não apresentou os outros ácidos graxos com hidroxila (C 10:0 3-OH, C 11:0 2-OH, C 14:0 2-OH, C 16:0 2-OH e C 16:1 2-OH) presentes nas linhagens comparadas. Por fim, somente a linhagem PE 63 apresentou os ácidos C 17:0 iso 3-OH (2,25%), C 15:0 iso 3-OH (1,11%), C 18:1 w9c (3,01%), *Summed Feature 2* (12:0 aldeído), *Summed Feature 9* (16:0 10-methyl ou 17:1 iso w9c), *Sum in Feature 2* (14:0 3-OH / 16:1 iso I) e *Sum in Feature 9* (17:1 iso w9c).

A análise de identidade de sequências do gene rRNA 16S por si só não garante a identificação de uma nova espécie, porém pode fornecer a primeira indicação que uma nova espécie foi isolada quando os valores de identidade são menores que 97 % (Tindall *et al.*, 2010). A linhagem PE 63 apresentou identidade do gene rRNA 16S de 99,8 % com a *Comamonas testosteroni* e quando observada na árvore filogenética criada com sequências do gene rRNA 16S a linhagem estava agrupada no mesmo clado que a *C. testosteroni* e *C. thiooxydans*.

Contudo, somente a análise de identidade do gene rRNA 16s com valores de similaridade da sequência superiores a 97%, não possibilita a rejeição da caracterização

de uma nova espécie dentro do gênero. Outros métodos devem ser investigados como a hibridização DNA-DNA ou análises de sequências genéticas com maior resolução (Tindall *et al.*, 2010). Verificando as análises de ANI e dDDH, realizadas com o genoma completo, foram obtidos valores de ANI < 93 % (entre 91 – 93 % Tabela 2.5) e valores de dDDH < 49 % (Tabela 2.6) para PE 63. De acordo com os parâmetros genômicos *OGRI (Overall Genome Related Index)* que delimita valores de ANI < 95~96 % e dDDH < 70 % para verificar e relacionar linhagens diferentes (Chun *et al.*, 2018), os valores de ANI e dDDH da PE 63 indicam que essa linhagem se trata de uma possível nova espécie dentro do gênero *Comamonas*. Ainda analisando aos parâmetros ANI e dDDH, só que desta vez entre *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxydans* DSM 17888, ANIb de 93,57 % - ANIm de 94,37 % e dDDH de 55,6 %, os valores são superiores a comparação entre PE 63 e a ATCC 1196. A árvore filogenética construída com os 31 marcadores moleculares proteicos, mostrou que *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxydans* DSM 17888 formaram um subclado dentro do clado principal que continha a PE 63, apresentando mais uma vez essa similaridade maior entre ATCC 11996 e DSM 17888, em comparação com a ATCC 11996 e PE 63.

Apesar das diferenças observadas, o alinhamento do genoma da PE 63 e a ATCC 11996 apresentou um valor de 86 % de regiões alinhadas, mostrando que há uma semelhança entre esses dois genomas. Entretanto, esse resultado não deve descartar a possibilidade de a PE 63 ser uma espécie nova, visto que o alinhamento do genoma da *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxydans* DSM 17888 também apresentou valores acima de 80 % (alinhamento de 82,33 %, Figura S2.4 – Apêndice A).

A análise de pangenoma da linhagem PE 63 com os microrganismos mais próximos de acordo com o Roary, mostrou uma porcentagem de cloud genes de 55,57 % de genes raros (*cloud genes*), genes observados apenas em uma minoria dos genomas. Diferente dos *cloud genes*, os *core genes* estão presentes em todos os genomas, e os *shell genes* são encontrados na maioria dos genomas, não contribuem para nenhuma diferença entre genomas (Snipen; Ussery, 2010).

Essa grande porcentagem de genes raros pode ser explicada pelo modo que foi realizado a análise, onde foram utilizadas as linhagens mais próximas a PE 63 de acordo com o TYGS e entre essas continham genomas de três espécies do gênero *Delftia*. Esse gênero apesar de ser muito próximo ao gênero *Comamonas*, com várias características semelhantes entre eles, a ponto de no passado microrganismos do gênero *Delftia* terem sido classificados como *Comamonas*, é um gênero distinto (Sly; Wen; Fegan, 2015; Wen

et al., 1999). Somado a isso, o alto percentual de genes raros também pode ser explicado devido ao parâmetro de 80 % de Blastp ter sido utilizado para agrupar os genes que codificam sequências de proteínas completas em genomas centrais (que seriam os *core genes*), valor um pouco mais alto se comparado a outros trabalhos de pangenoma (Udaondo; Duque; Ramos, 2017; Wu; Zaiden; Cao, 2018a).

No diagrama de Venn também é evidenciada essa proximidade entre os três microrganismos, PE 63, ATCC 11996 e DSM 17888, com um número maior de *clusters* de genes ortólogos compartilhados entre as três linhagens, em comparação aos *clusters* únicos. Entretanto, em comparação com as linhagens ATCC 11996 e DSM 17888, a PE 63 é a que apresenta o maior número de *clusters* únicos. Além disso, o valor de *clusters* compartilhados entre ATCC 11996 e DSM 17888 foi superior aos números de *clusters* compartilhados entre ATCC 11996 e PE 63 ou DSM 17888 e PE 63. Esse valor superior de *clusters* compartilhados entre *C. testosteroni* NCTC 10698^T e *C. thiooxydans* DSM 17888 também já foi observado em análises com a *C. fluminis* CJ34^T, apresentando mais uma vez a proximidade entre esses dois microrganismos (Park; Kim; Cha, 2022).

Com a visualização gráfica interativa dos dados gerados pelo Roary no servidor Phandango, foi possível observar na árvore gerada que o clado formado por PE 63, *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxydans* DSM 17888 apresentou a mesma conformação na árvore construída com os genes selecionados pelo *software* AMPHORA2, onde verifica-se um subclado separado com *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxydans* DSM 17888. O padrão da matriz de ausência e presença de *cloud genes* observado na visualização interativa do Phandango mostrou a grande similaridade entre os genes raros dos três microrganismos.

A análise das categorias funcionais baseadas na classificação de *Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG)* mostrou um padrão de categorias COGs similar para a PE 63 e a ATCC 11996, apresentando maior porcentagem na categoria S (21 %), de proteínas de função desconhecida, seguida da categoria K com 9%, das categorias C e E com 8 % cada e P com 6 %. Esse padrão foi similar ao de categorias com maiores percentuais encontradas na linhagem *C. testosteroni* KF-1, que obteve valores de 8 % para as categorias K, S e R (R: previsão funcional geral); valores de 6 % para as categorias C, E e P; e valor de 26 % para categoria NA (ou *Unknow*) (Weiss *et al.*, 2013).

Apesar dos resultados da anotação dos genes potenciais responsáveis pela resistência a antibióticos utilizando o ARDB apresentarem uma similaridade de 70,98 % para resistência a fluoroquinolona e tetraciclina, trabalhos mostram que a *C. testosteroni*

apresenta sensibilidade a tetraciclina (Chipirom *et al.*, 2012). Na análise de identificação de clusters de genes biossintéticos para metabólitos secundários o resultado do AntiSMASH mostrou um perfil de metabólitos iguais para os três microrganismos (PE 63, ATCC 11996 e DSM 17888) com uma única diferença para a PE 63 que apresentou gene para o composto NAPAA. NAPAA poli-aminoácidos não alfa é um composto bioativo que pode ter aplicações biológicas em engenharia de tecidos, sistemas de distribuição de medicamentos/genes e medicina regenerativa (Arulprakasam; Dharumadurai, 2021).

O Traitair é uma ferramenta que realiza a predição de 67 características fenotípicas relacionada ao uso de vários substratos como fontes de carbono e energia, necessidade de oxigênio, morfologia, suscetibilidade a antibióticos, proteólise e atividades enzimáticas, com uma taxa de precisão de 87 – 89% para as 234 bactérias descritas no GIDEON I (*Global Infectious Disease and Epidemiology Online Network*) e para as 42 descritas no GIDEON II e entre 72,4 – 72,9% para as 296 bactérias descritas no Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) (Weimann *et al.*, 2016b).

A maioria das predições realizadas através do Traitair concordaram com os dados encontrados na literatura, exceto pelas predições de crescimento a 42 °C que foram positivas para todos os microrganismos no Traitair, enquanto na literatura apenas a *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxidans* DSM 17888 crescem a 40 °C. De acordo com o Traitair, *C. thiooxydans* DSM 17888 é positiva para o crescimento em 6,5 % NaCl, entretanto os dados da literatura mostram que essa espécie tolera apenas até 3 % de NaCl (Narayan; Pandey; Das, 2010). Vale ressaltar que PE 63, de acordo com presente estudo, cresce em NaCl a 4 %. Em relação a utilização de citrato, o resultado do Traitair foi negativo para todas as linhagens, porém os resultados para PE 63 e ATCC 11996 obtidos com o teste Enretokit B (Probac) e os dados da literatura para *C. testosteroni* ATCC 11996 e *C. thiooxidans* DSM 17888 mostram resultados positivos. β -galactosidase e a utilização de tartarato apresentam divergências entre os resultados do Traitair para ATCC 11996 e os encontrados na literatura (Narayan; Pandey; Das, 2010; Tamaoka; Ha; Komagata, 1987).

Comparando os resultados das predições do Traitair para PE 63 e os dados da literatura para a *C. testosteroni* ATCC 11996, com exceção dos dados de citrato que obtiveram resultado negativo no Traitair mas positivo para PE 63 quando utilizado o kit Enterokit B. As diferenças fenotípicas encontradas entre PE 63 e ATCC 11996 são entre

a utilização de tartarato, presença de atividade β -galactosidase e assimilação de D-xilose, glicose, celobiose e glicerol.

2.6. Conclusão

A *Comamonas* sp. PE 63 isolada de resíduos plásticos encontrados no solo do cerrado é uma bactéria gram-negativa, bacilar, aeróbia, não formadora de esporos, não fermentadora, dotada de mobilidade devido a presença de múltiplos flagelos polares. Suas colônias em meio NB apresentam um formato redondo, convexo e irregular, com uma névoa em torno. A linhagem cresce em temperaturas entre 15 – 35°C (ótimo a 30°C), em pH 5 – 9 (ótimo pH 7) e em concentrações de NaCl entre 0 – 4% (ótimo a 0%). Apresenta atividade oxidase e catalase positiva. Positiva para assimilação de citrato e atividade de urease. Negativa para produção de H₂S, produção de gás, utilização de lisina e triptofano.

Os principais ácidos graxos presentes na *Comamonas* sp. PE 63 são C 16:0 (26,94%), C 15:0 iso (10,94%), C 14:0 (8,94%), *Summed Feature* 3 (16:1 w7c ou 16:1 w6c ou 16:1) (15,8%), *Summed Feature* 8 (18:1 w7c e/ou 18:1 w6c) (12,03%), *Sum In Feature* 3 (16:1 w7c ou 16:1) (15,8%) e *Sum In Feature* 8 (18:1 w7c) (12,03%).

Utilizando técnicas de predição fenotípica a PE 63 possivelmente não assimila uma grande variedade de carboidratos, mas assimila celobiose, glicose, xilose, glicerol e inositol. Com atividade enzimática positiva para fosfatase alcalina, redução de nitrato, lipase e pirrolidonil peptidase, β-galactosidase e negativa para beta-hemólise, produção de coagulase e DNase. Não assimila arginina, ornitina, triptofano, malonato, vermelho de metila e utiliza tartarato, acetato e lisina.

Apesar da linhagem PE 63 apresentar algumas características similares a *C. testosteroni* ATCC 11996, os dados ANI, dDDH, as análises de genoma (pangenoma e análise comparativa de clusters de genes ortólogos) e perfil de ácidos graxos sugerem que essa linhagem é uma espécie nova dentro do gênero *Comamonas*.

Este capítulo será submetido em forma modificada para publicação na revista *Brazilian Journal of Microbiology*.

Capítulo 3 - Caracterização Bioquímica e Biofísica de uma Peroxirredoxina selecionada a partir de dados de expressão diferencial dos genes do cultivo de *Delftia* sp. PE 138 em polietileno

3.1. Introdução

As peroxirredoxinas (Prx) são uma família de enzimas com atividade peroxidase dependente de cisteína que realizam a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros substratos hidroperóxidos (Hofmann; Hecht; Flohé, 2002; Soito *et al.*, 2011). Estas apresentam atuação crucial na proteção celular contra o estresse oxidativo nos organismos e são responsáveis pela remoção de mais 90 % dos peróxidos celulares com base em sua abundância relativa (Cao; Lindsay, 2017). Ainda, fornecem proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros radicais livres que acarretam a degradação do DNA e de outras macromoléculas relevantes para a viabilidade celular (Cao; Lindsay, 2017).

Em 1988, a primeira Prx foi identificada na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e classificada inicialmente como TSA (*thiol-specific antioxidant*) (Kim *et al.*, 1988). Apesar de apresentarem atividade de peroxidase, a homologia de sequência dessas enzimas não se correlaciona significativamente a catalases, superóxido dismutases ou a outras peroxidases, como as glutationa peroxidases que contém selenocisteínas e não apresentam cofatores redox como grupo heme, flavina ou íons metálicos (Knoops; Loumaye; Eecken, 2007). As Prxs são capazes de reduzir uma ampla variedade de substratos peróxidos, como o terc-butil hidroperóxido e peróxidos orgânicos mais complexos (e.g. hidroperóxido de cumeno e hidroperóxido de timidina) (Dubbs; Mongkolsuk, 2007).

A família da peroxirredoxina é dividida em cinco subfamílias, sendo estas: Prx1/AhpC, Prx6, Prx5, Tpx, BCP/PrxQ (BCP encontrada em bactérias e a PrxQ encontrada em plantas) e AhpE (Karplus; Hall, 2007; Nelson *et al.*, 2011). Essas enzimas apresentam um sítio ativo e uma sequência motivo bastante conservada PxxxTxxC_p contendo uma cisteína peroxidática (C_p). Além dos aminoácidos prolina (Pro) e treonina (Thr), uma arginina (Arg) está presente no sítio ativo totalmente enovelado da maioria das Prxs e em contato por ligação de van der Waals com a C_p (Karplus; Hall, 2007; Nelson *et al.*, 2011).

Todas as Prxs apresentam um ciclo catalítico em comum que inclui uma etapa conformacional e três etapas químicas. A primeira etapa desse ciclo é a reação do substrato peróxido com a cisteína C_p da proteína completamente enovelada. Essa reação

provoca a oxidação da C_p , na forma de um ácido sulfênico (-S-OH) – S_pOH , e a redução do peróxido ao seu álcool correspondente. A segunda etapa, etapa de resolução, envolve um grupo tiol livre (R-S-H) (S_rH) da cisteína de resolução (C_r) reagindo com o ácido sulfênico S_pOH da cisteína C_p , liberando água com a formação do dissulfeto (R-S-S-R). Essa reação do grupo tiol com C_p é referida como resolução, isso porque reverte o bloqueio do ciclo catalítico resultante da acessibilidade ruim da C_p ocasionada pela reação ao substrato natural. Para que a resolução ocorra, uma mudança conformacional é necessária para tornar a cadeia lateral da cisteína acessível. A terceira e última etapa da reação ocorre quando o dissulfeto é reciclado para regenerar a cisteína oxidada (a cisteína peroxidática - C_p) e os tióis da cisteína C_r , dessa forma a Prx adota novamente o sítio ativo totalmente enovelado (Karplus; Hall, 2007).

De acordo com o mecanismo de resolução da enzima, que ocorre na catalise enzimática, estas podem ser categorizadas em 3 grupos: 1-Cys, 2-Cys típicas e 2-Cys atípicas. Essa categorização depende do mecanismo de resolução da enzima, bem como da presença ou ausência de uma cisteína de resolução (C_r) localizada na região C-terminal dessas enzimas (Knoops; Loumaye; Eecken, 2007). Como não há a C_r nas 1-Cys Prxs, um tiol de outra proteína ou molécula pequena irá participar na etapa de reciclagem do dissulfeto. Nas 2-Cys Prxs típicas, a cisteína de resolução C_r é encontrada na região C-terminal de outra subunidade da enzima, produzindo uma ligação dissulfeto inter-subunidade após a oxidação. Já a 2-Cys Prxs atípica apresenta essa C_r em outras posições na mesma subunidade da enzima onde geralmente forma uma ligação dissulfeto intra-subunidade (Nelson *et al.*, 2011).

Em relação à estrutura terciária, as Prxs apresentam um sítio catalítico altamente conservado, variando apenas no comprimento e conformações dos *loops* e extensões N- e C-terminal, com uma estrutura central contendo 7 folhas- β e 5 α -hélices. Na estrutura totalmente enovelada, a C_p está localizada na primeira curva da segunda α -hélice (Karplus; Hall, 2007). No que se refere a estrutura quaternária das Prxs, apenas a BCP da *Saccharomyces cerevisiae* é monomérica (Karplus; Hall, 2007).

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar e produzir a enzima peroxirredoxina selecionada a partir de dados genômicos e transcritômicos da bactéria *Delftia* sp. PE 138 quando cultivada com polietileno.

3.2.2. Objetivos específicos

- Realizar a anotação do genoma da *Delftia* sp. PE 138;
- Selecionar enzimas possivelmente participantes do processo de degradação de polietileno, com base na análise expressão diferencial dos genes;
- Analisar a sequência de aminoácidos da proteína e deduzir as propriedades físico-químicas com base na sequência;
- Realizar a predição do modelo tridimensional da proteína;
- Produzir a proteína por expressão heteróloga em *E. coli* BL21 (DE3);
- Purificar a enzima resultante da expressão heteróloga em *E. coli*;
- Caracterizar a enzima, em relação ao pH e temperatura ótimos;
- Analisar por dicroísmo circular (*circular dichroism* - CD) o efeito da variação de pH, temperatura, o efeito de agente redutor e oxidante na estrutura secundária da enzima, bem como estimar a termoestabilidade desta;

3.3. Metodologia

3.3.1. Seleção das enzimas

Um dos primeiros passos para escolha das enzimas foi refazer a anotação do genoma *Delftia* sp. PE 138 e a análise de expressão diferencial dos genes (RNA-seq). Para isso foram utilizados o genoma montado de *Delftia* sp. PE 138 e os dados do sequenciamento do RNA (RNA-seq), após os filtros de qualidade, fornecidos por Peixoto (2018). A anotação do genoma foi realizada pelo *software* Prokka v. 1.14.6, utilizando o banco de dados do UniProt (Seemann, 2014).

Para o processamento inicial dos dados de RNA-seq foi utilizado o protocolo de Pertea *et al.* (2016), em que primeiramente foi utilizado o programa HISAT2 (Kim *et al.*, 2019) para o mapeamento e alinhamento das reads de RNA com o genoma, em seguida foi utilizado o samtools (Danecek *et al.*, 2021) para converter os arquivos em formato SAM para BAM. Após esta etapa, foi utilizado o stringtie (Pertea *et al.*, 2015, 2016) para a montagem e quantificação da expressão dos genes e transcritos, onde foi utilizado a anotação realizada pelo prokka.

Para a análise de expressão diferencial dos genes foi utilizado o *workflow* do edgeR do servidor Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) (Liu *et al.*, 2015; Robinson; McCarthy; Smyth, 2010). Para visualização gráfica dos resultados da expressão diferencial dos genes foi utilizado o *workflow* do heatmap2 (Batut *et al.*, 2018; Doyle, 2023) no servidor Galaxy, utilizando um cutoff do $\log_{2}FC < 0,25$ para selecionar as enzimas.

Para escolha das enzimas para estudos de caracterização foi utilizado com critério para escolha a classes das enzimas, no caso as oxidoredutases, as enzimas mais expressas no cultivo com PE, como base no resultado da análise de expressão diferencial dos genes. Além disso, as enzimas já estudadas em relação da degradação de PE também foram utilizadas como critério de escolha.

3.3.2. Propriedades físico-químicas deduzidas da sequência da proteína bcp_00857

A ferramenta ProtParam do servidor ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi utilizada para análise inicial das propriedades físico-químicas da sequência da proteína peroxirredoxina (código bcp_00857). O ProtParam é uma ferramenta que permite a realização do cálculo de vários parâmetros físicos e químicos para uma determinada sequência de aminoácidos, gerando os dados referentes ao massa molecular, ponto isoelétrico (pI) teórico, composição de aminoácidos, composição atômica, coeficiente de

extinção, estimativa da meia-vida, índice de instabilidade, índice alifático e grande média do valor de hidropaticidade (GRAVY) (Gasteiger *et al.*, 2005).

3.3.3. Alinhamento da bcp_00857 com sequências de outras peroxirredoxinas e construção de um dendrograma de similaridade

Primeiramente, foi realizada a busca por sequências de aminoácidos homólogas a proteína bcp_00857 utilizando a ferramenta Blastp (NCBI) contra o banco de dados do PDB (*Protein Data Bank*) e contra o banco de dados de sequências não-redundantes (Parâmetro utilizado - *Program Selection: blastp (protein-protein BLAST)*). Em seguida, a sequência da bcp_00857 foi alinhada com as cinco sequências de proteínas mais similares encontradas no banco de dados do PDB utilizando o software ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Em seguida, o alinhamento foi visualizado com o servidor *web* ESPrnt 3.0 (<https://esprnt.ibcp.fr/>) que, além de gerar a visualização, renderiza a semelhança de sequências e informações de estrutura secundária a partir do alinhamento (Robert; Gouet, 2014).

Dendrogramas de similaridade foram construídos utilizando: (i) as sequências de aminoácidos do banco de dados do PDB e a sequência da bcp_00857, e (ii) a sequência de aminoácidos da bcp_00857 e as sequências de vários subtipos de peroxirredoxinas, de microrganismos do gênero *Delftia* ou de gêneros próximos. As sequências foram obtidas do banco de dados do NCBI. As sequências foram alinhadas com o software ClustalW e o programa FastTree 2.1.11 foi utilizado para a construção do dendrograma (Larkin *et al.*, 2007; Price; Dehal; Arkin, 2010).

3.3.4. Modelo tridimensional da proteína

Para desenho do modelo estrutural da proteína foi utilizado o programa AlphaFold 2 presente no servidor Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) (Afgan *et al.*, 2016; Jumper *et al.*, 2021). Os parâmetros utilizados no servidor Galaxy foram: (i) *Database: full database*; e (ii) *Model preset: monomer*. Ao final, foram gerados cinco modelos.

Para escolha do melhor modelo e assegurar a confiabilidade, os cinco modelos gerados foram avaliados utilizando o programa PROCHECK e a ferramenta QMEAN. Foi utilizado o PROCHECK no servidor Verify3D (<https://www.doe-mbi.ucla.edu/verify3d/>), para obtenção do gráfico de Ramachandran (Eisenberg; Lüthy; Bowie, 1997; Laskowski; Macarthur; Thornton, 2006). Foi utilizada a ferramenta QMEAN (*Qualitative Model Energy ANalysis*) disponível no servidor Swiss-Model via

servidor Expasy (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>) (Benkert; Biasini; Schwede, 2011).

O programa PyMOL 2.5.5 foi utilizado para obtenção das representações gráficas da estrutura tridimensional da proteína e para seleção do sítio ativo (DeLano, 2002; Schrödinger, 2015). Além disso, o modelo da proteína foi alinhado no PyMOL com a estrutura da proteína com maior porcentagem de similaridade de acordo com o resultado do Blastp, contra o banco de dados do PDB, realizado anteriormente.

3.3.5. Obtenção dos genes, produção do sistema de expressão e transformação e clonagem das cepas

Para obtenção do gene da *bcp_00857*, primeiramente a sequência de nucleotídeos da enzima (sequência de gene da *bcp_00857*, Apêndice A) foi utilizada para o desenho dos primers utilizado o *software web* Primer3Plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). Além disso, foram adicionadas regiões para o corte das enzimas de restrição nos primers para inserção do gene posteriormente no plasmídeo pET-24a(+). No primer *forward* - F (Tabela 3.1), foi adicionado o sítio de restrição da enzima NdeI (CATATG) e uma sequência de nucleotídeos TATA antes da sequência sítio de restrição. No primer *reverse* - R (Tabela 3.1), foi adicionado o sítio de restrição da enzima XhoI (CTCGAG) e uma sequência de nucleotídeos CGCA antes da sequência do sítio de restrição.

Tabela 3.1. Sequência dos primers com os sítios de restrição. BCP F e R, foram os primers para a proteína Peroxirredoxina (*bcp_00857*). As sequências dos sítios de restrição estão sublinhadas na tabela.

Código do primer	Sequência dos Primers
BCP F	TATA <u>CATATG</u> GCGATCGTTGTCAACAAACC
BCP R	CGCA <u>CTCGAG</u> GGCAGCCTGCTTCAATG

Para obtenção do DNA da *Delftia* sp. PE 138, a bactéria foi crescida em 5 mL de meio NB (Difco, Holanda) a 30 °C e 200 rpm por 24 h. Em seguida, o cultivo foi centrifugação a 5.500 ×g por 5 min a 4 °C e o DNA total foi extraído com o kit *GenElute™ Bacterial Genomic DNA* (Sigma Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total extraído foi quantificado com o fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA) utilizando o kit *dsDNA HS Quant-it assay kit* (Invitrogen, EUA) e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) com 1x tampão TAE (estoque TAE 50X Anexo B), por 60 minutos a 100V.

Para reação de PCR (*polymerase chain reaction* – PCR) foi utilizado 0,6 μ M de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 1x de tampão (Cellco Biotech, Brasil) e DNA 0,5 – 1 μ g em um volume final de 25 μ L. As condições de termociclagem foram: temperatura inicial de desnaturação 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação 95°C por 1 minuto, anelamento 57°C, extensão a 72°C por 1 min, e por fim um período de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de 0,8% de agarose com 1x tampão TAE, por 60 minutos a 100V. A banda do gene foi cortada do gel, extraída e purificada utilizando o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System* (Promega, EUA). O produto de PCR extraído e purificado foi quantificado com o fluorômetro Qubit (Invitrogen, EUA) utilizando o kit *dsDNA HS Quant-it assay kit* (Invitrogen, EUA)

O produto da PCR purificado e o pET-24a(+) passaram pelo processo de digestão com as enzimas NdeI e XhoI (Cellco Biotech, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. A reação com um volume final de 20 μ L continha 1x de *Universal Buffer* 10x (UB), 1 μ g de produto de PCR, 1 U de cada enzima. As reações foram incubadas a 37°C por um período de 1 hora e 30 minutos ou 2 horas e a reação foi interrompida por um período de aquecimento a 65 °C por 20 minutos. Em seguida, foi realizado o processo de ligação entre o plasmídeo pET-24a(+) e o gene, utilizado a T4 ligase e *Standard Ligation Buffer* (SB) 10x (Cellco Biotech, Brasil). Na reação de ligação foi utilizado 1x de SB 10x, 5 U de enzima T4 ligase e uma proporção molar de 3:1 de fragmento de PCR/ vetor (plasmídeo). A reação foi incubada a 4 °C *overnight*.

O próximo passo foi a transformação das bactérias *E. coli* DH10b e BL21 (DE3). A transformação das bactérias *E. coli* DH10b competentes por choque térmico foi realizada conforme as seguintes etapas: (i) 5 μ L de reação de ligação foram adicionadas a 50 μ L de células competentes; (ii) as células passaram por um ciclo térmico de 30 minutos em gelo, 90 segundos a 42 °C e um minuto em gelo novamente; (iii) Após o ciclo térmico, foram adicionadas 1 mL de meio LB (*Luria-Bertani*) e as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora.

Em seguida, as células então foram centrifugadas a 10.000 xg por 1 minuto, 500 μ L do sobrenadante foi descartado e o restante homogeneizado. As células (200 μ L) foram inoculadas em placas contendo meio LB sólido e 100 μ g/mL de canamicina (Sigma Aldrich, EUA) e incubadas a 37 °C *overnight*. Após o crescimento, as colônias contidas

na placa foram inoculadas em 5 mL de meio líquido LB e 100 µg/mL de canamicina (Sigma Aldrich, EUA) e incubadas a 37 °C a 200 rpm *overnight*. Em seguida, os insertos foram extraídos utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep Kit*, QIAGEN (QIAGEN, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Para assegurar que os plasmídeos continham os insertos, 2 µL de plasmídeo foi digerido com as enzimas NdeI e XhoI de acordo com os passos da etapa de digestão. O produto da reação dessa digestão foi submetido a eletroforese em gel de 0,8 % de agarose com 1x tampão TAE, por 60 minutos a 100 V. Após a confirmação, o DNA do plasmídeo com inserto foi utilizado para fazer a transformação da *E. coli* BL21(DE3) competente utilizando o mesmo protocolo de transformação da *E. coli* DH10b descrito anteriormente.

3.3.6. Expressão heteróloga da proteína

Dois processos foram utilizados para indução, um com meio LB contendo IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e um outro por autoindução com um meio autoindutor contendo lactose. Para os dois processos primeiramente foi realizado um inóculo inicial, pré inóculo, das bactérias BL21(DE3) transformadas onde elas foram cultivadas com meio LB com 100 µg/mL de canamicina a 37 °C a 200 rpm por um período de 18 horas.

Para o cultivo com IPTG, 100 µL de pré inóculo foi inoculado em 100 mL de meio LB com 100µg/mL de canamicina e incubados a 37 °C a 200 rpm até atingir uma OD₆₀₀ entre 0,6 - 0,9. Após atingir a OD₆₀₀ necessária, foram adicionados 0,1 mM de IPTG para a indução. Para o cultivo com meio de autoindução contendo lactose, 100 µL do mesmo pré inóculo foi cultivado em 100 mL de meio ZYM-5052 (Tabela 3.2) conforme descrito por Studier (2005), salvo pela utilização de triptona ao invés de N-Z amine. Para os dois meios de cultivo, com IPTG e o autoindutor, a bactéria com o inserto da proteína foi cultivada em duas temperaturas 30 °C e 37 °C por 18 horas a 200 rpm.

Tabela 3.2. Meio ZYM-5052, baseado em Studier (2005). Todos os reagentes são da Sigma Aldrich, EUA.

Reagentes	Concentração
Triptona	1 %
Extrato de levedura	0,5 %
Na ₂ HPO ₄	25 mM
KH ₂ PO ₄	25 mM
NH ₄ Cl	50 mM
Na ₂ SO ₄	5 mM
MgSO ₄	2 mM
Glicerol	0,5 %
Lactose	0,2 %
Glicose	0,05 %
Metais traços*	0,2x
*Solução estoque de metais traços 1000x: 50 mM FeCl ₃ , 20 mM CaCl ₂ , 10 mM de MnCl ₂ e ZnSO ₄ , 2 mM de CoCl ₂ , CuCl ₂ , NiCl ₂ , Na ₂ MoO ₄ , Na ₂ SeO ₃ e H ₃ BO ₃	

Após a indução, com IPTG e meio autoindutor, os cultivos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em tampão A (100 mM de Tris-HCl e 100mM de NaCl, pH 7). Para 100 mL de cultivo centrifugado, foi utilizado 20 mL de tampão para ressuspender o pellet e um volume de coquetel inibidor de protease (Sigma Aldrich, EUA), de acordo com as instruções do fabricante (1 mL de coquetel para 20 g de pellet de *E. coli*). Para lise celular, a mistura do pellet ressuspendido com tampão e coquetel inibidor de protease foi então sonicada em banho de gelo por 15 minutos, com amplitude de 50 %, em pulsos de 01 segundos on e off utilizando o sonicador Sonics Vibra-Cell VCX 500.

Em seguida, os lisados foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4 °C, para separação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (*pellet*). Após a separação, a parte insolúvel foi ressuspendida em 20 mL de tampão. Para detectar se a proteína estava sendo produzida na fração solúvel ou insolúvel, foi realizado o teste de solubilidade, onde alíquotas do pré inóculo, da expressão, da fração solúvel e insolúvel foram guardadas e aplicadas no gel de SDS-PAGE.

3.3.7. Análise da expressão por SDS-PAGE e quantificação da proteína

Para confirmar a expressão e produção da proteína, uma alíquota do pré-inóculo, da expressão, da parte solúvel e insolúvel do lisado foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 15%. Alíquotas de 20 µL de cada amostra foram misturadas com 5 µL de tampão de amostra 5X (200 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10 % (m/v), 10 mM β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05 % (m/v) e 40% de glicerol) e fervidas a 100 °C por 5 minutos, em seguida foram aplicadas ao gel de SDS-PAGE 15 %. O gel de SDS-PAGE apresenta duas camadas, uma chamada de gel separador e outra de gel concentrador (Liu, 2008). Foi utilizado um gel separador de 15 % (m/v) contendo para 5 mL de gel: 1,1 mL de H₂O destilada, 2,5 mL de acrilamida 30 % (m/v), 1,25 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 µL de SDS 10% (m/v), 50 µL de 10 % PSA (persulfato de amônia) e 2 µL de TEMED. O gel concentrador de 5 % (m/v) foi preparado utilizando-se para 1 mL de gel: 680 µL de H₂O destilada, 170 µL de acrilamida 30 % (m/v), 130 µL de Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, 10 µL de SDS 10 % (m/v), 10 µL de 10 % PSA e 1 µL de TEMED. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese (*Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell*, BIO-RAD) com tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 % (m/v)) a 20 – 25 mA.

Após a corrida, o gel foi corado com solução corante de Coomassie R-350 (PlusOne Coomassie Tablets, PhastGel Blue R-350) (Cytiva, EUA) e descorado com descorante contendo 30 % (v/v) de etanol e 7 % (v/v) de ácido acético glacial para visualização das bandas de proteínas. A quantificação das enzimas foi realizada utilizando o protocolo de Lowry (descrição do protocolo no Anexo A) (Lowry *et al.*, 1951).

3.3.8. Purificação da enzima bcp_00857

A purificação da proteína foi realizada em duas etapas, a primeira por cromatografia de afinidade por Histag em coluna contendo a resina de NI-NTA e a segunda por cromatografia de exclusão molecular.

Para a purificação por cromatografia de afinidade por Histag, a resina de NI-NTA (15 mL de resina) foi lavada com Tampão A em uma proporção de tampão 2x para o volume de resina. Após, a fração solúvel, obtida de acordo com o tópico 3.3.5, foi adicionada a resina NI-NTA do QIAexpress Kit (QIAGEN, Alemanha) e deixada em leve agitação por 1 hora a 4°C, para que houvesse a ligação da cauda de histidina da enzima à resina contendo níquel. Em seguida, foi realizada a eluição da parte solúvel por gravidade, chamada aqui de *flow through*, e após um volume 30 mL de Tampão A contendo 20mM de imidazol foi adicionado a resina, para que houve a retirada de enzimas que não

aderiram a resina de níquel. Por fim, 30 mL de Tampão A contendo 300 mM de imidazol e, em seguida, tampão A contendo 500 mM de imidazol, foram adicionados a resina para recuperar a proteína. A amostra e as frações que passaram pela coluna foram guardadas e uma alíquota foi retirada para realização da análise em SDS-PAGE 15 %.

Para diminuir a concentração de imidazol a $< 0,008$ mM, foi realizada a diálise da fração contendo 300 mM de imidazol utilizando a membrana *dialysis tubing cellulose membrane* de 12 kDa (Sigma Aldrich, EUA). A diálise foi deixada a 4 °C por 24 hs para retirada do imidazol.

A próxima etapa da purificação da bcp_00857 foi por cromatografia de exclusão molecular. A amostra, que passou por diálise, foi então concentrada com Amicon em *cut-off* de 3 kDa (Millipore) até um volume de 5 mL. Para a purificação foi utilizado o ÄKTA *purifier* e a coluna *Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 High Resoluion* (Cytiva, EUA). A coluna foi equilibrada com dois volumes de coluna utilizando o Tampão A em um fluxo de 1 mL/min e uma pressão de até 0,5 Mpa. O volume de 5 mL da amostra concentrada foi injetada a coluna em fluxo de 0,5 mL/min. Após, a proteína foi eluída com Tampão A (fluxo 1 mL/min).

A fração que foi eluída foi guardada e uma alíquota foi retirada para análise em SDS-PAGE 15 %. O gel de SDS-PAGE da purificação por cromatografia por coluna de exclusão molecular foi corado com nitrato de prata (Oakley; Kirsch; Morris, 1980).

3.3.9. Ensaio tiocianato férrico (*Ferric Thiocyanate* (FTC) *assay*) e efeito da concentração da enzima do ensaio

O ensaio tiocianato férrico (FTC) foi realizado para medir a atividade peroxidase da bcp_00857 quanto à sua capacidade de reduzir H₂O₂. O experimento foi realizado baseado nos experimentos de Limauro *et al.* (2008) e Gupta *et al.* (2022), com modificações.

Diferentes concentrações de proteína (1, 2, 3, 4 e 5 µM) foram incubadas a 30 °C por 10 minutos com tampão de reação (20 mM de tampão Tris-HCl, pH 7, e 1 mM de DTT). Após esse período, foi adicionado 100 µM do substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na reação e a reação foi novamente incubada por 10 minutos a 30 °C. O volume final da reação foi de 0,1 mL. Os controles da reação foram: (i) reação sem adição de H₂O₂ (sem proteína e sem o tampão da proteína); (ii) reação sem H₂O₂ e com proteína; e (iii) reação com adição de H₂O₂ e o mesmo tampão que estava a proteína. O branco foi a reação com adição de H₂O₂ sem proteína.

Após os 10 minutos de incubação, a reação foi parada com a adição de 40 µL de ácido tricloroacético - TCA (25 %). A atividade da bcp_00857 foi determinada a partir da quantidade de peróxido de hidrogênio restante, detectada a partir da medição do complexo ferritocianato, de cor avermelhada, formado após a adição de 40 µL de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ (10 mM) e 20 µL de KSCN (2,5 M). A quantidade de complexo de ferritocianato foi determinada por absorvância a 475 nm utilizando o espectrofotômetro de placa SpectraMax M3. O experimento deste tópico foi realizado em triplicata.

3.3.10. Efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima

Para determinar o efeito de diferentes pH na atividade da enzima foi realizado o ensaio FTC com diferentes tampões de reação. Foi utilizado o tampão acetato nas faixas de pH de 3 a 6; o tampão McIlvaine (MI) nas faixas de pH de 3 a 8; o tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico / fosfato de sódio dibásico) nas faixas de pH de 7 a 9; tampão citrato nas faixas de pH de 3 a 6; tampão Tris-HCl nas faixas de pH de 7 a 9; e tampão glicina nas faixas de pH de 8 e 9. Esse experimento foi realizado conforme descrito no ensaio FTC do tópico 3.3.8, com exceção do pH 9, onde na segunda parte de incubação, o ensaio foi incubado por um minuto na bancada. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.11. Efeito da temperatura na atividade da enzima e termoestabilidade da enzima nas temperaturas 30 °C e 45 °C

Para analisar o efeito da temperatura o ensaio FTC foi realizado nas temperaturas 10 a 65 °C, com intervalos de 5 °C, no termociclador Modelo Veriti 96 – Well Thermal Cycler, Life Technologies. O experimento foi realizado também nas temperaturas de 0 °C e 4 °C, para temperatura de 4 °C o ensaio foi incubado na câmara fria a 4 °C. Para temperatura de 0 °C o experimento foi realizado em banho de gelo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para analisar a termoestabilidade, a proteína foi incubada por sete dias a 30 °C, realizando-se análises diárias. Para o experimento a 45 °C, a proteína foi incubada por 60 minutos e analisada em um intervalo de 10 a 10 minutos. O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.12. Dicroísmo Circular da bcp_00857

Para avaliar o conteúdo de estrutura secundárias e termoestabilidade da proteína em diferentes pH, nos estados oxidado e reduzido foi realizada pela técnica de Dicroísmo

Circular (DC) utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporação, Tóquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura *Peltier*, conectado a uma bomba de água (Instrumentos analíticos, Japão).

Para diminuir a concentração dos sais do tampão da proteína purificada para a análise de DC, foi realizada a diálise da proteína purificada utilizando a membrana *Dialysis tubing cellulose membrane* de 12kDA (Sigma Aldrich, EUA). A diálise foi deixada a 4 °C por 24hs para diminuição da concentração de sais até 5mM de Tris-HCl.

O experimento foi realizado utilizando 0,25 mg/mL de proteína nas seguintes condições: sem tratamento, com incubação por 0 e 20 minutos em DTT, para análise no estado reduzido, e com incubação por 0 e 20 minutos em H₂O₂, para análise no estado oxidado. Os tampões utilizados nesse experimento, com e sem adição de 1 mM de DTT ou 1 mM H₂O₂, foram: (i) tampão acetato de sódio 5 mM, pH 4; (ii) tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0; e (iii) tampão Tris-HCl 5 mM, pH 9,0.

Os espectros dicróicos foram obtidos em comprimentos de onda distantes da luz UV (197- 260 nm) com intervalos de 0,2 nm e uma taxa de escaneamento de 100 nm/min, tempo de resposta de 4 segundos e largura da banda de 1,0, na temperatura de 25 °C. Os resultados foram analisados no software Spectra Manager II. Os espectros resultantes de cinco leituras consecutivas para cada condição, foram corrigidos com a subtração da contribuição dos tampões. As elipticidades (mdeg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ([θ]) (deg.cm².dmol⁻¹) baseado na massa molecular média calculada por resíduo de 115 Da, segundo a equação 1:

$$\text{Equação 1} = \frac{115 * \theta}{C * \ell * 15}$$

Onde θ é o sinal dicróico em mdeg, C a concentração da proteína em mg/mL (0,25 mg/mL) e ℓ é caminho ótico (0,1 cm) da cubeta. Os percentuais do conteúdo de estruturas secundárias nos diferentes pH, na presença dos agentes redutores e oxidantes, e durante a variação de temperatura foram estimados a partir dos espectros ajustados utilizando o servidor web Bestsel (<https://bestsel.elte.hu/index.php>) para deconvolução dos dados (Micsonai *et al.*, 2022).

Os ensaios da estabilidade térmica da estrutura foram conduzidos nos pH 4,0 e 7,0, fixando o comprimento de onda em 222 nm, correspondente a região estruturada da proteína e realizados em temperaturas entre 25 e 95 °C. Simultaneamente, os espectros

dicróicos foram coletados a cada 10 °C, na faixa de 197-260 nm (regiões far-UV). Para obtenção dos dados em elipticidade molar $[(\theta)]$ ($\text{grau.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$) foi utilizado a equação 1.

3.3.13. Dispersão dinâmica de luz (*Dynamic light scattering* - DLS)

Uma amostra de 1,5 mL da bcp_00857, purificada em tampão Tris-HCl 5 mM, pH 7,0, foi previamente centrifugada a (5000xg por 2 minutos) e filtrada através de uma membrana Millipore (Billerica, MA) de diâmetro de poro de 0,22 μm . Em seguida, 1 mL da amostra centrifugada e filtrada foi adicionada a uma cubeta de vidro *PCS8501* com abertura redonda para ser desgaseificada por vácuo durante 5 min. Foi utilizado para as leituras, o equipamento Zetasizer Series Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) equipado com um laser He-Ne 633 nm para medições a 173° de detecção por retrodispersão a 25 °C com o programa Zetasizer Software v7.11 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido). Os parâmetros adicionais utilizados para as medições foram: material com índice de refração (IR) de proteína IR = 1,45 e absorção de 0,001, e dispersante na condição de solução 5 mM Tris-HCl pH 7, com viscosidade 0,8893 cp e IR = 1,332. Foram usados os parâmetros Mark-Houwink no cálculo do massa molecular por DLS e o modelo de análise para proteínas.

3.4. Resultados

3.4.1. Seleção das enzimas potencialmente envolvidas na biodegradação de polietileno

O microrganismo *Delftia* sp. PE 138 foi o primeiro escolhido para esse estudo e para a seleção de possíveis enzimas relacionadas com a degradação de polietileno a serem caracterizadas funcional e bioquimicamente. Apesar de todas as bactérias estudadas no trabalho de Peixoto (2018), apresentarem resultados positivos para degradação de PE, *Delftia* sp. PE 138 foi priorizada devido aos resultados superiores em comparação as demais (Peixoto, 2018; Peixoto; Silva; Krüger, 2017).

As enzimas foram selecionadas com base na expressão diferencial dos genes que as codificam com relação ao cultivo da *Delftia* sp. com PE (DLF138PE), cultivo com glicose (DLF138G) e/ou à ausência de fontes de carbono (DLF138C). Nas Figuras 3.1 e 3.2, observamos que aqueles que estão com tonalidades mais escuras de roxo estão mais expressas.

Foram selecionadas 71 enzimas mais expressas no cultivo com PE de *Delftia* sp. PE 138 (indicadas com pontos em vermelho nas Figuras 3.1 e 3.2), dentre estas desidrogenases, oxigenases e hidroxilases. A enzima peroxiredoxina (gene *bcp*) foi selecionada para o estudo de caracterização, devido à sua expressão aumentada no cultivo com PE comparada ao cultivo com glicose e sem fonte de carbono. Além disso, as peroxidases já foram citadas por seu potencial na degradação de PE (e.g. manganês peroxidase, glutathiona peroxidase e lignina peroxidase) (Iiyoshi; Tsutsumi; Nishida, 1998; Rong *et al.*, 2024; Santacruz-Juárez *et al.*, 2021).

Além da peroxirredoxina, outras quatro enzimas foram escolhidas, devido sua expressão aumentada no cultivo com PE, para trabalhos posteriores: a coniferil aldehida desidrogenase (gene *calB*), 3-isopropil malato desidrogenase (gene *leuB*) e duas 6-hydroxynicotinate 3-monooxygenase (genes *nicC_1* e *nicC_2*) (marcadas com pontos em amarelos com borda vermelhas nas Figuras 3.1 e 3.2).

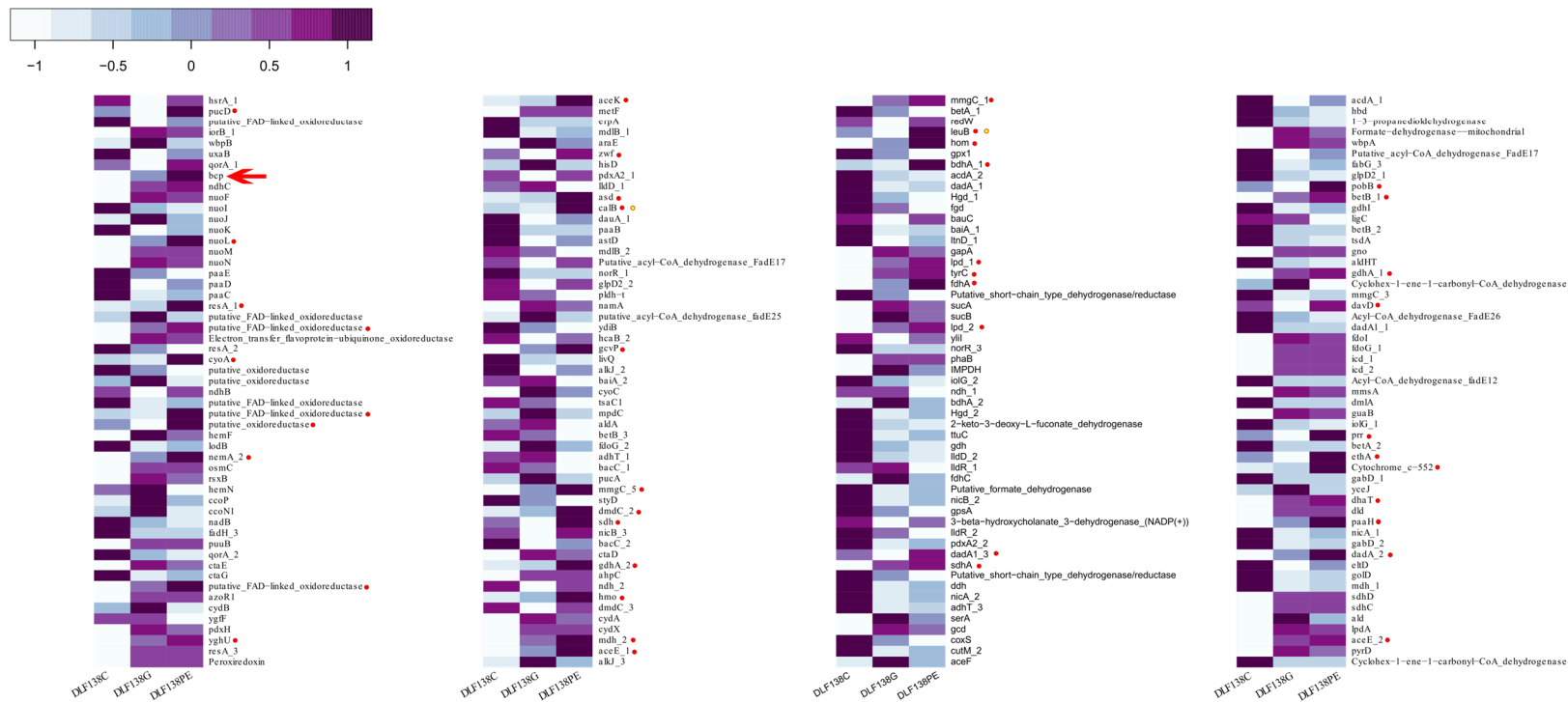


Figura 3.1. Heatmap da expressão de genes que codificam oxidorredutases em *Delftia* sp. O gradiente de cores representa os valores de logFC das análises de expressão diferencial. DLF138C: cultivo da *Delftia* sp. sem fonte de carbono; DLF138G: cultivo com glicose; e DLF138PE: cultivo com PE. Seta em vermelho está sinalizando a enzima uma peroxidase (gene bcp). Os pontos em vermelho estão marcando as oxidorredutases mais expressas no cultivo com PE e os pontos amarelo com borda em vermelho estão marcando as primeiras enzimas escolhidas para o estudo.

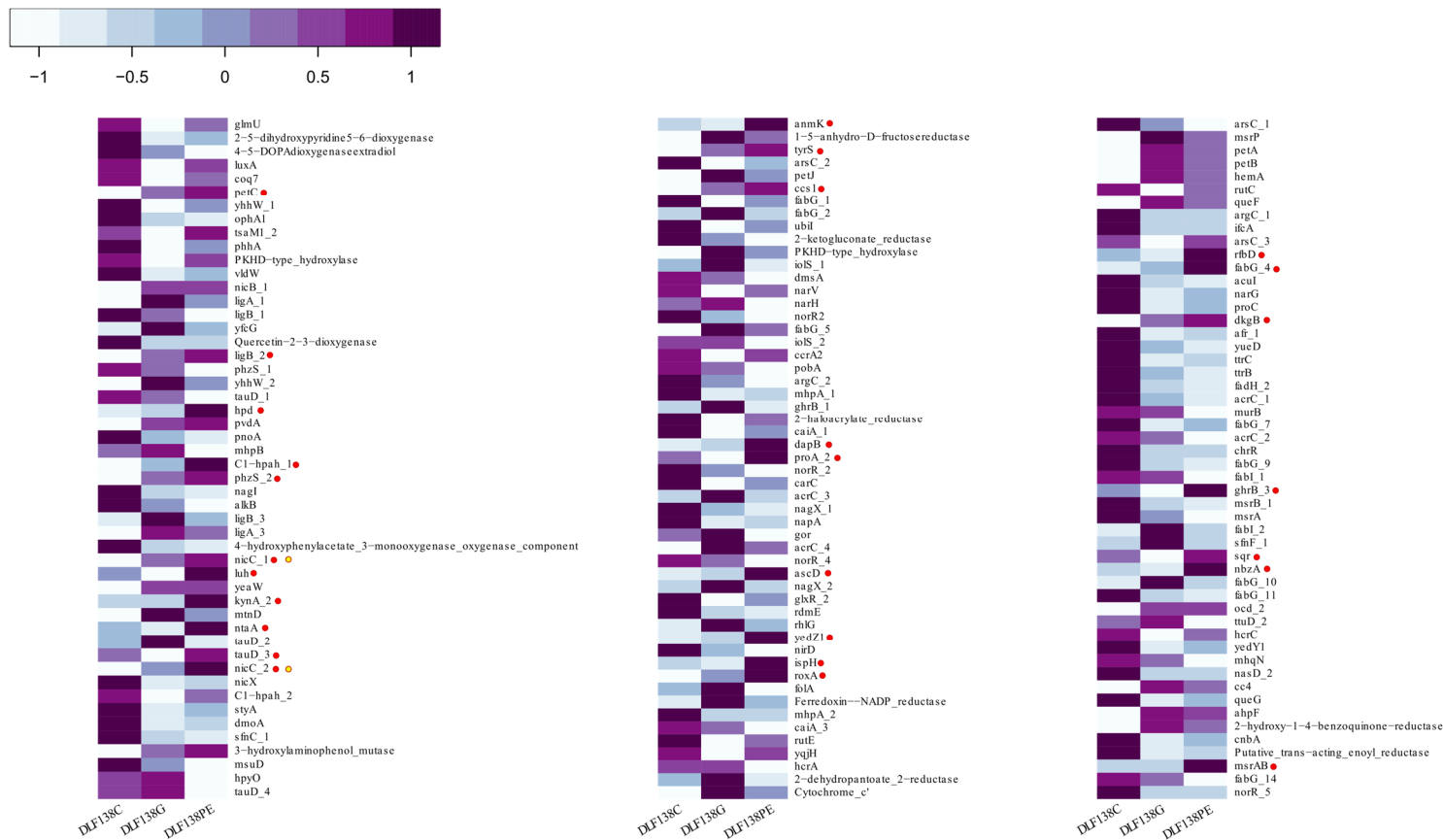


Figura 3.2. Continuação do Heatmap expressão de genes que codificam oxidorrredutases em *Delftia* sp. O gradiente de cores representa os valores de logFC das análises de expressão diferencial. DLF138C: cultivo da *Delftia* sp. sem fonte de carbono; DLF138G: cultivo com glicose; e DLF138PE: cultivo com PE. Os pontos em vermelho estão marcando as oxidorrredutases mais expressas no cultivo com PE e os pontos amarelo com borda em vermelho estão marcando as primeiras enzimas escolhidas para o estudo.

3.4.2. Propriedades físico-químicas deduzidas a partir da sequência da proteína bcp_00857

Enzima peroxirredoxina, bcp_00857, apresenta uma composição de 161 aminoácidos e possui massa molecular de 17,952 kDa, ponto isoelétrico (pI) teórico de 8,97, coeficiente de extinção molar de 0,638 e estimativa de meia vida (para *E. coli*, in vivo) de > 10 horas (dados obtidos do ProtParam).

3.4.3. Alinhamento da bcp_00857 com outras peroxirredoxina e o dendrograma de similaridade

A busca por sequências homólogas a proteína bcp_00857 utilizando a ferramenta Blastp (NCBI) contra o banco de dados do PDB (*Protein Data Bank*) mostrou que as cinco proteínas mais semelhantes com estruturas cristalográficas resolvidas foram: alquil hidroperóxido redutase (AhpC) (código do pdb: 5ENU) da *Burkholderia ambifaria*, BCP (código do pdb: 5IPH) da *Xanthomonas campestris* ATCC 33913, BCP (código do pdb: 3GKK) da *X. campestris*, BCP (código do pdb: 5IIZ) da *X. campestris* 756C e BCP (código do pdb: 5IOX) da *X. campestris* ATCC 33913, com identidade de 60,39 %, 52,94 %, 52,55 %, 52,55 % e 52,55 %, respectivamente.

O alinhamento realizado entre a enzima bcp_00857 (bcp|00857| na Figura 3.3) e as cinco peroxirredoxinas mais semelhantes a ela, mostrou várias regiões conservadas entre todas as sequências (realce em vermelho, com aminoácidos em letras brancas, Figura 3.3) e vários resíduos conservados na maioria das sequências. Além disso, todas apresentam a região do sítio ativo conservada PxxxTxxC_p (aminoácidos marcados com bolinhas azuis na Figura 3.3). A segunda cisteína (na posição 99) e a arginina (na posição 120) também estão sinalizadas com bolinhas amarelas na Figura 3.3.

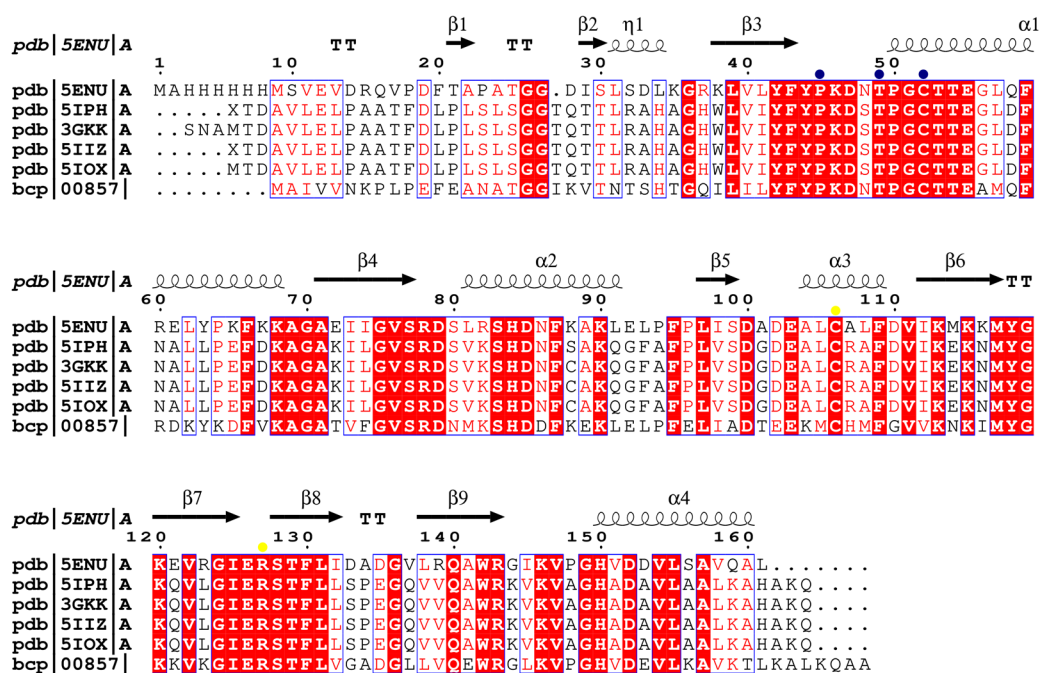


Figura 3.3. Alinhamento da bcp_00857 com seqüências do PDB que obtiveram os melhores *hits* no Blastp. Os aminoácidos do sítio ativo estão marcados por bolinhas azuis: P (Prolina), T (Treonina) e C (Cisteína). O aminoácido R (Arginina), que também faz parte da catalise enzimática, e a segunda C (Cisteína) estão marcados por bolinhas amarelas. Realce em vermelho, com aminoácidos em letras brancas, trata-se dos resíduos conservados em todas as seqüências. Realce com aminoácidos com letras em vermelho e contorno azul são resíduos conservados na maioria das seqüências. α : α -hélice, β : folha- β , e T: *giros*- β , η : 310-hélice.

No dendrograma de similaridade, utilizando a seqüência de aminoácidos da bcp_00857 e seqüências de vários subtipos de peroxirredoxinas, a enzima bcp_00857 se agrupou no mesmo clado que outras enzimas da subfamília da BCP (Figura 3.4).

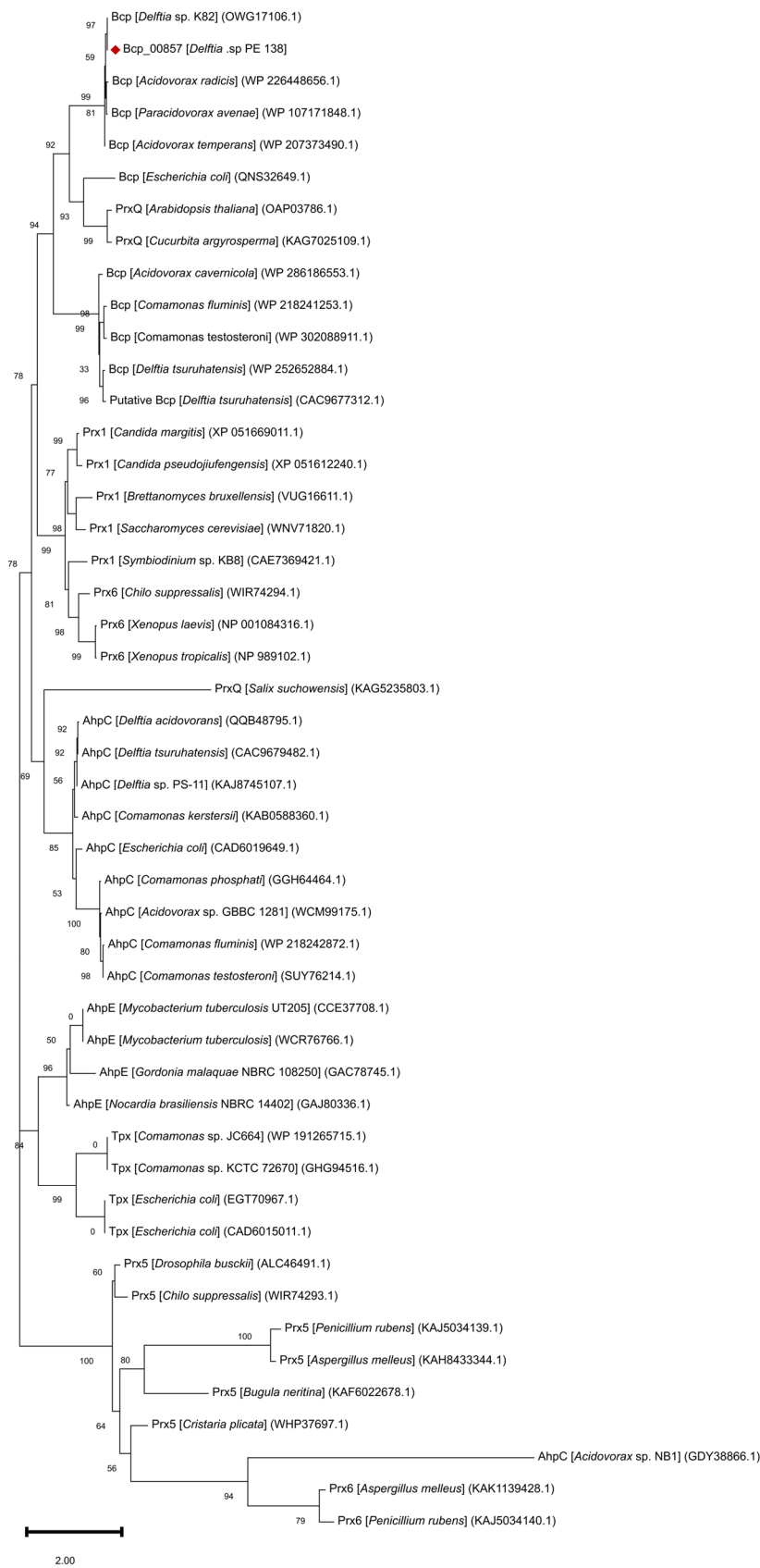


Figura 3.4. Dendrograma de similaridade das sequências das subfamílias das peroxirredoxinas (Prx1/AhpC, Prx6, Prx5, Tpx, BCP/PrxQ e AhpE). No dendrograma as subfamílias estão divididas em clados separados. A proteína bcp_00857 está presente no clado das BCPs. ♦: Destaque para proteína bcp_00857.

3.4.4. Modelo tridimensional da bcp_00857

O modelo da estrutura tridimensional predita pelo AlphaFold para a bcp_00587, gerou uma estrutura formada por 9 folha- β e 4 α -hélice (Figura 3.5a). Na figura 3.5b foi destacado os aminoácidos que fazem parte do sítio ativo nas posições 38 Pro (Prolina), 42 Thr (Treonina), 45 Cys (Cisteína) e 120 Arg (Arginina).

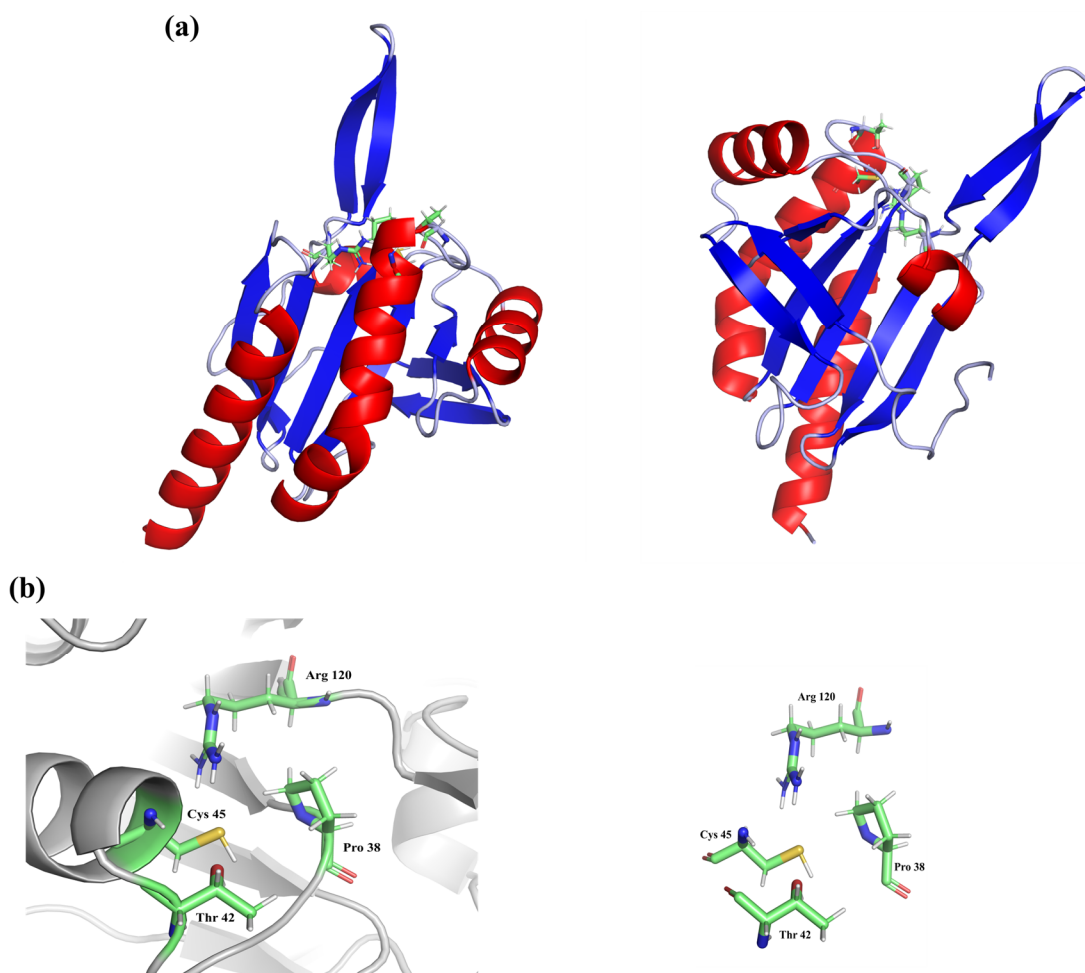


Figura 3.5. Estrutura tridimensional predita pelo AlphaFold para a proteína bcp_00857. (a) A estrutura tridimensional com as folhas- β em azul, α -hélices em vermelho e os loops em cinza. (b) Os aminoácidos do sítio catalítico em destaque: Pro 38 (Prolina), Thr 42 (Treonina), Cys 45 (Cisteína) e Arg 120 (Arginina).

A avaliação estereoquímica do modelo realizada através do gráfico de Ramachandran apresentou 92,1 % dos resíduos em regiões favoráveis e 0 % em regiões desfavoráveis (Figura 3.6). A pontuação QMEAN score global do modelo foi de 0,93. O alinhamento entre o modelo 3D da bcp_00857 e a estrutura tridimensional da alquil hidroperóxido redutase (AhpC) (código do PDB 5ENU) apresentou um RMSD (*root-mean-square distance*) de 0,350 (Figura 3.7).

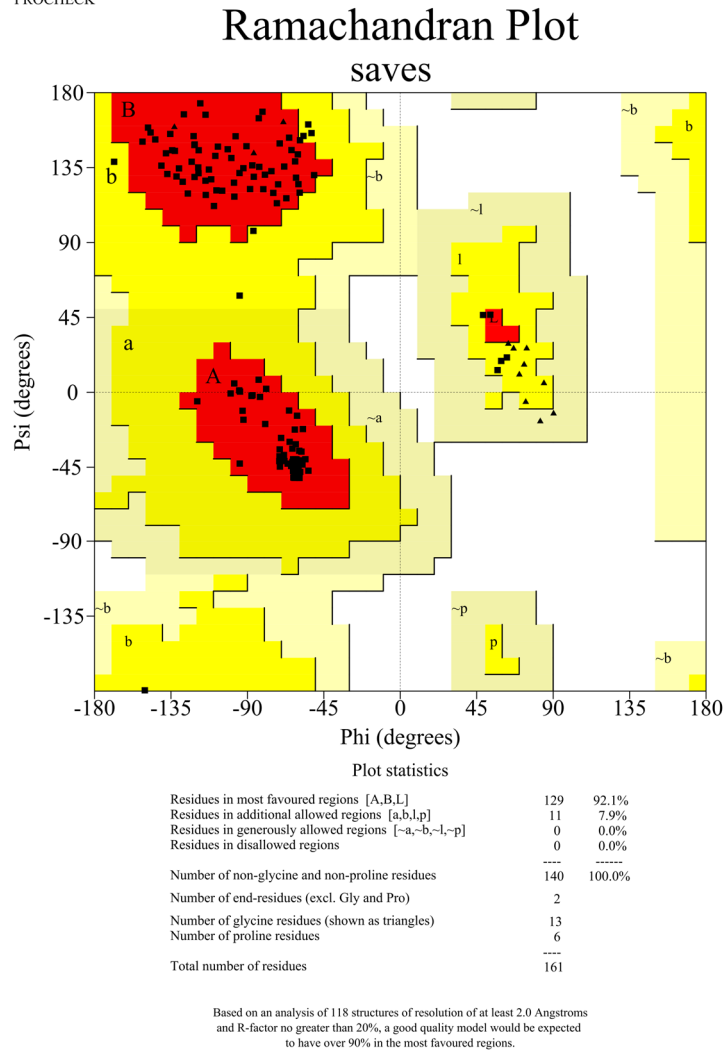


Figura 3.6. Gráfico de Ramachandran da bcp_00857. O gráfico mostra que 92,1% dos resíduos de aminoácidos estão em regiões favoráveis e 0% em regiões desfavoráveis.

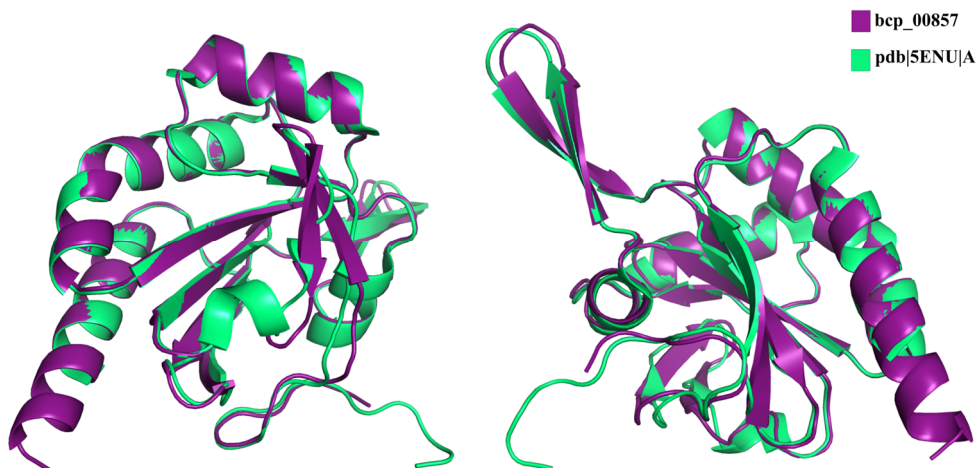


Figura 3.7. Ilustração do alinhamento do modelo tridimensional da bcp_00857 com a estrutura cristalográfica de AhpC (código pdb: 5ENU) depositada no banco de dados do PDB. Alinhamento realizado no PyMOL. Modelo da bcp_00857 em roxo; Estrutura cristalográfica AhpC (pdb|5ENU|A) em verde.

3.4.5. Expressão da *bcp_00857* em *E. coli* BL21(DE3) e teste de solubilidade

Para obtenção da proteína e para fins de comparação, foram realizados cultivos utilizando meio LB com IPTG 0,1 mM para indução e meio autoindutor em duas temperaturas, 37 °C e 30 °C, a 200 rpm. Após a lise celular e separação da fração solúvel (no sobrenadante) ou insolúvel (no *pellet*), foi observado que a expressão da proteína utilizando IPTG, nas duas temperaturas, provocou a formação de corpos de inclusão (presente na parte insolúvel) e não houve uma expressão significativa na parte solúvel.

Uma melhor expressão da proteína *bcp_00857* foi observada quando a cepa transformada era cultivada em meio autoindutor a 30 °C, em comparação com o cultivo a 37 °C que provocava a formação de corpos de inclusão. Após a indução, foi realizado o teste de solubilidade, para detectar se a proteína está presente na fração solúvel (no sobrenadante) ou insolúvel (no *pellet*), e constatou-se que a proteína *bcp_00857*, com massa molecular de aproximadamente 17,9 kDa, está em maior concentração na fração solúvel (Figura 3.8).

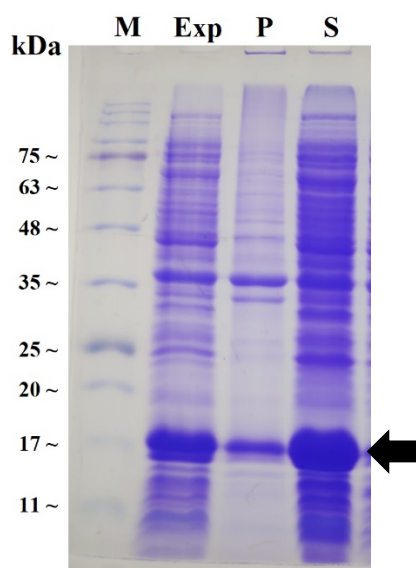


Figura 3.8. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (15 %) da expressão, da fração insolúvel (*pellet*) e solúvel (sobrenadante) da produção da *bcp_00857*. Na imagem, a proteína (seta preta) de ~17,9 kDa presente majoritariamente na fração S (solúvel). M: marcador; Exp: alíquota da expressão da proteína; P: fração insolúvel (*pellet*); S: fração solúvel (sobrenadante). A seta em preto está indicando a região que se encontra a proteína *bcp_00857* de ~17,9kDa no gel. Gel corado com Coomassie R-350.

3.4.6. Purificação da proteína *bcp_00857*

Na primeira etapa da purificação da *bcp_00857*, foi realizada a cromatografia de afinidade por Histag, conforme descrito anteriormente no tópico 3.3.8, e foram realizadas as eluições com o tampão A com diferentes concentrações de imidazol. Na Figura 3.9,

observa-se que utilizando uma concentração 300 mM de imidazol a proteína é parcialmente purificada (poço 4 na Figura 3.9). Além disso, uma banda fraca na mesma posição da proteína bcp_00857 aparece na eluição com tampão A com 500 mM de imidazol (poço 5 na Figura 3.9).

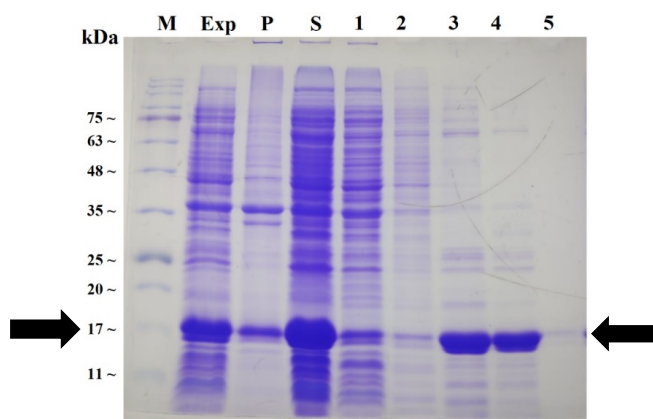


Figura 3.9. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (15 %) da purificação da proteína bcp_00857 por cromatografia de afinidade por Histag. Gel corado com Coomassie. Os números de 2 a 5 representam as diferentes concentrações de imidazol. M: marcador; Exp: alíquota da expressão da proteína; P: fração insolúvel (pellet); S: fração solúvel (sobrenadante); 1: *flow through*. Eluição com tampão A com diferentes concentrações de imidazol: 2: 20 mM; 3: 100 mM; 4: 300 mM; 5: 500 mM. A seta em preto está indicando a região que se encontra a proteína bcp_00857 de ~17,9kDa no gel. Gel corado com Coomassie R-350.

Após a diálise e concentração da amostra, realizou-se a purificação da proteína por cromatografia de exclusão molecular. O perfil cromatográfico dessa purificação, utilizando a coluna Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 High Resoluion (Cytiva) (Figura 3.10), apresentou apenas um pico de eluição na região de 160 a 200 mL. Para assegurar que o pico observado no perfil cromatográfico era da proteína, essa amostra foi concentrada com Amicon (cut-off de 3 kDa), em seguida uma alíquota foi aplicada no gel de SDS-PAGE 15 % e o gel foi corado com nitrato de prata (Oakley; Kirsch; Morris, 1980) (Figura 3.11b).

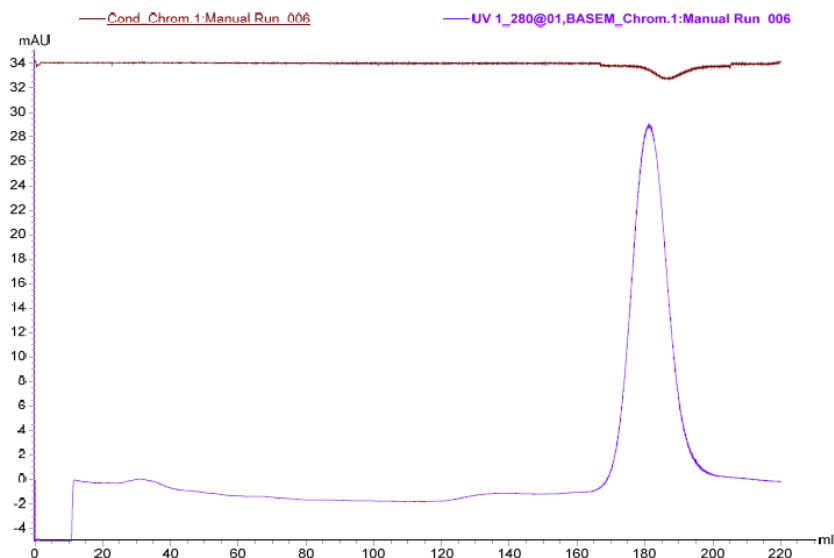


Figura 3.10. Perfil cromatográfico da purificação da bcp_00857 por cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 High Resoluion (Cytiva). O perfil cromatográfico da purificação apresenta somente um pico na região de 160 a 200 mL.

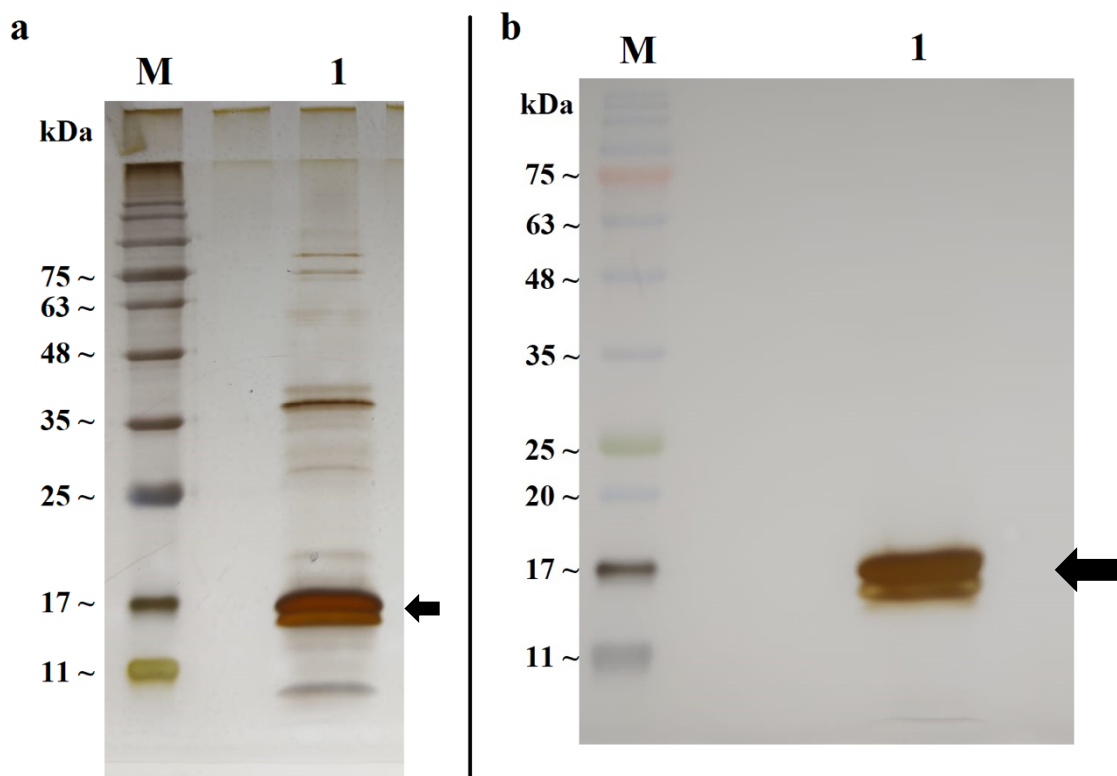


Figura 3.11. Análise de eletroforese em SDS-PAGE (15 %) da purificação da proteína bcp_00857. a) Purificação da proteína por cromatografia de afinidade por Histag, na imagem o número 1 representa a eluição da proteína com o tampão A com 300 mM de imidazol. b) Purificação da proteína por cromatografia de exclusão molecular, onde o número 1 representa o pico do perfil cromatográfico na região de 160 a 200 mL. M: marcador. As setas em preto indicam a região que se encontra a proteína bcp_00857 de ~17,9kDa no gel. Gel corado com nitrato de prata.

A fim de se obter uma maior quantidade de proteína para as análises seguintes de caracterização enzimática, um cultivo 1,5 L da cepa transformada com meio autoindutor a 30 °C e agitação de 200 rpm foi realizado. Os processos de purificação foram os mesmos realizados para um cultivo menor apresentados anteriormente. O perfil cromatográfico desse novo cultivo, após a purificação da proteína por cromatografia de exclusão molecular, também apresentou apenas um pico de eluição na região de 140 a 240 mL (Figura 3.12b).

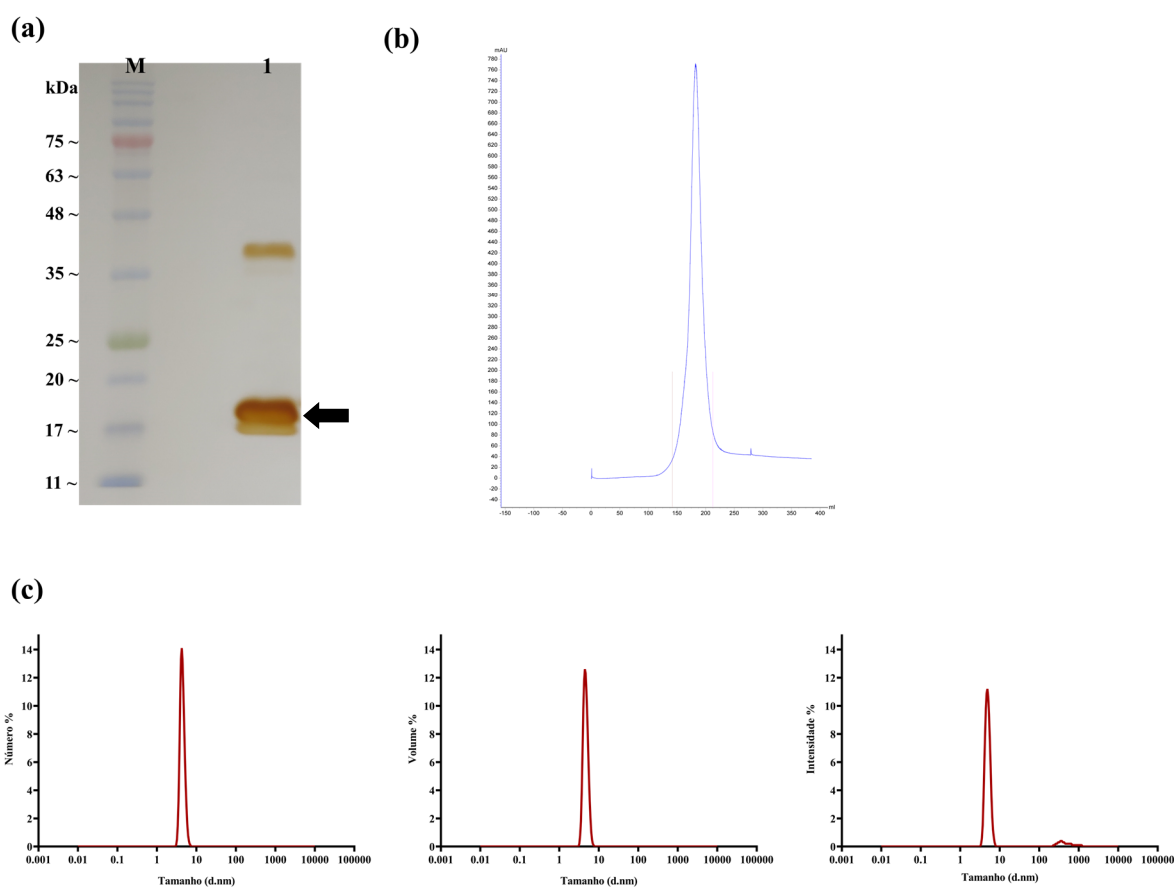


Figura 3.12. Purificação e DLS da proteína. (a) Gel SDS-PAGE da Purificação da *bcp_00857*. a) O número 1 representa o pico do perfil cromatográfico na região de 140 a 240 mL. M: marcador. As setas em preto indicam a região que se encontra a proteína no gel; (b) Purificação da *bcp_00857* por cromatografia de exclusão molecular. O perfil cromatográfico da purificação apresenta somente um pico na região de 140 a 240 mL; (c) Análise por DLS

Apesar de apresentar apenas um pico no perfil cromatográfico, indicando a purificação da proteína, o perfil proteico no gel corado com prata apresentava duas bandas, uma próxima de 17 kDa, entre 17 e 20 kDa, e outra banda próxima de 35 kDa, entre 35 e 48 kDa (Figura 3.12a), o que poderia ser a presença de outra proteína ou a da *bcp_00857* como dímero. Para assegurar que só havia a presença da proteína *bcp_00857*,

foi realizada a análise de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light scattering* – DLS).

A análise de DLS é utilizada para análises de partículas em suspensão, detectar agregados em soluções macromoleculares, para determinar o tamanho de proteínas, ácidos nucleicos e complexos ou para monitorar a ligação de ligantes (Lorber *et al.*, 2012; Stetefeld; McKenna; Patel, 2016). A técnica de DLS gera três gráficos referentes ao tamanho (volume) da molécula, a intensidade da luz espalhada e ao número de partículas. Nos gráficos referente ao Número (%) e Volume (%) na figura 3.12c, foi observado apenas um pico entre 1 – 10 d.nm.

Já no gráfico de intensidade na figura 3.12c, um pico de aproximadamente 11 % de intensidade foi observado na região de 1 – 10 d.nm e um pico de intensidade < 0,5 % foi observado na região 100 – 1000 d.nm. Devido a porcentagem da intensidade ser muito baixa (< 0,5%) e não corresponder com a intensidade da banda de aproximadamente ~35 kDa que foi observada no gel corado com prata, supõem-se que esse pico seja referente aos sais contidos no tampão onde estava presente a proteína. A segunda banda, de ~35 kDa, é a proteína que se dimerizou ou se agregou devido a sua alta concentração.

3.4.7. Atividade enzimática da proteína bcp_00857

Avaliação da atividade enzimática peroxidase foi realizada por meio do Ensaio FTC. A atividade é avaliada conforme a capacidade da enzima em remover o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), maior remoção (em %) de peróxido maior a atividade.

Para determinar a influência da concentração da enzima na atividade enzimática, foi realizado um experimento com diferentes concentrações de proteína, mantendo a concentração de H₂O₂ fixa em 100 µM. A variação da concentração de enzima foi de 1 a 5 µM. A atividade enzimática com uma concentração de enzima de 1 µM foi de 44,7 % de remoção de H₂O₂. A partir de 2 µM de proteína, a curva de atividade fica linear, com a atividade variando entre 94 e 97 % de remoção de H₂O₂ entre as concentrações 2 a 5 µM, exceto na concentração de proteína de 4 µM que foi de 88 % (Figura 3.13). Esse experimento permitiu a definição da concentração mínima da enzima de 2 µM da enzima a ser utilizada nos ensaios seguintes, concentração de proteína que reduz aproximadamente 100 % do H₂O₂ da reação.

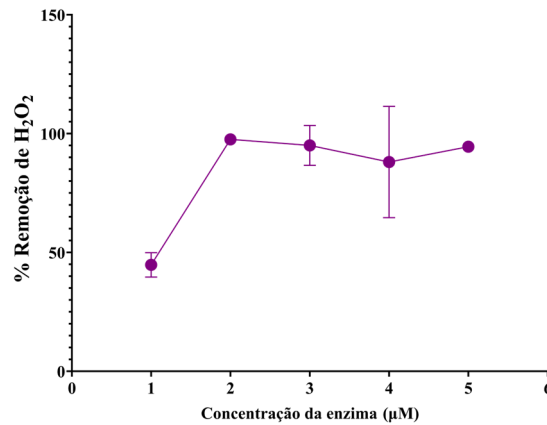


Figura 3.13. Curva do efeito da variação da concentração da proteína bcp_00857 na atividade enzimática. A partir de uma concentração de proteína de 2 µM aproximadamente 100 % de H₂O₂ é removido. Barras representam o desvio padrão.

3.4.7.1. Efeito do potencial hidrogeniônico (pH) na atividade da enzima

A fim de se avaliar a diferença de atividade da enzima em diferentes pHs, seis tampões foram utilizados na análise variando o pH de 3 a 9. A proteína bcp_00857 apresentou apenas um ponto de pH ótimo, com maior atividade, em pH 7 nos três tampões que apresentavam essa faixa, sendo a melhor atividade no tampão tris-HCl com 99,2 % de remoção de H₂O₂, seguido dos tampões MI com 85,3 % de remoção de H₂O₂ e tampão fosfato 91,7 % de remoção. Em geral, a proteína não apresentou atividade em pHs ácidos, exceto em pH 6 no tampão acetato com uma remoção de H₂O₂ de 40,6 % (Figura 3.14).

Em relação ao pH básico, apesar da enzima apresenta atividade em pH 8 e 9, foi observada uma diminuição da atividade nessas faixas em comparação com pH 7 (Figura 3.14). Observou-se, que a melhor atividade nos pH 8 e pH 9 foi em tampão glicina. Em pH 8, a maior atividade foi nos tampões Tris-HCl e Glicina, com remoção de H₂O₂ de 82,1 % e 82,3 %, respectivamente. Em pH 9, a atividade nos três tampões variou de 70 – 74 % (70,2 % em tampão fosfato; 72 % em tampão tris-HCl; 74,6 % em tampão glicina).

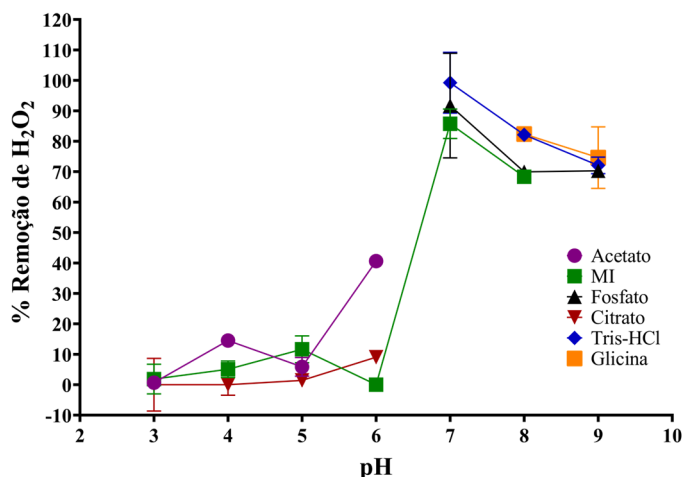


Figura 3.14. Efeito do pH na atividade da bcp_00857. A enzima obteve maior atividade em pH 7. Tampão Acetato em roxo; Tampão McIlvaine (MI) em verde; Tampão Fosfato em preto; Tampão Citrato em vinho; Tampão Tris-HCl em azul; e Tampão Glicina em laranja. Barras representam o desvio padrão

3.4.7.2. Efeito da temperatura na atividade da enzima e termoestabilidade da enzima nas temperaturas 30 °C e 45 °C

Após a definição do pH ótimo, referente a maior atividade da proteína, foi avaliado o efeito da temperatura na atividade enzimática. A proteína apresentou atividade até 65 °C, sendo a atividade superior a 86 % nas temperaturas entre 0 - 45 °C, com diminuição da atividade para 31 % a partir de 50 °C. As atividades superiores a 98 % foram entre 10 e 40 °C (Figura 3.15a).

A fim de analisar a estabilidade da enzima em diferentes temperaturas, a proteína foi incubada a 30 °C por 7 dias com avaliação da atividade diariamente e incubada a 45 °C com análises entre 10 – 10 minutos (Figura 3.15). Em 30 °C, a atividade enzimática começa a diminuir a partir do terceiro dia, de 98 % nos primeiros dois dias para 83 % no terceiro dia. Atividade ao final dos sete dias foi de 64,9 % de remoção de H₂O₂ (Figura 3.15b). Em 45 °C, a partir de 20 minutos de reação foi observada uma diminuição da atividade. A partir de 30 minutos, a enzima apresentou uma atividade < 27 % (Figura 3.15c).

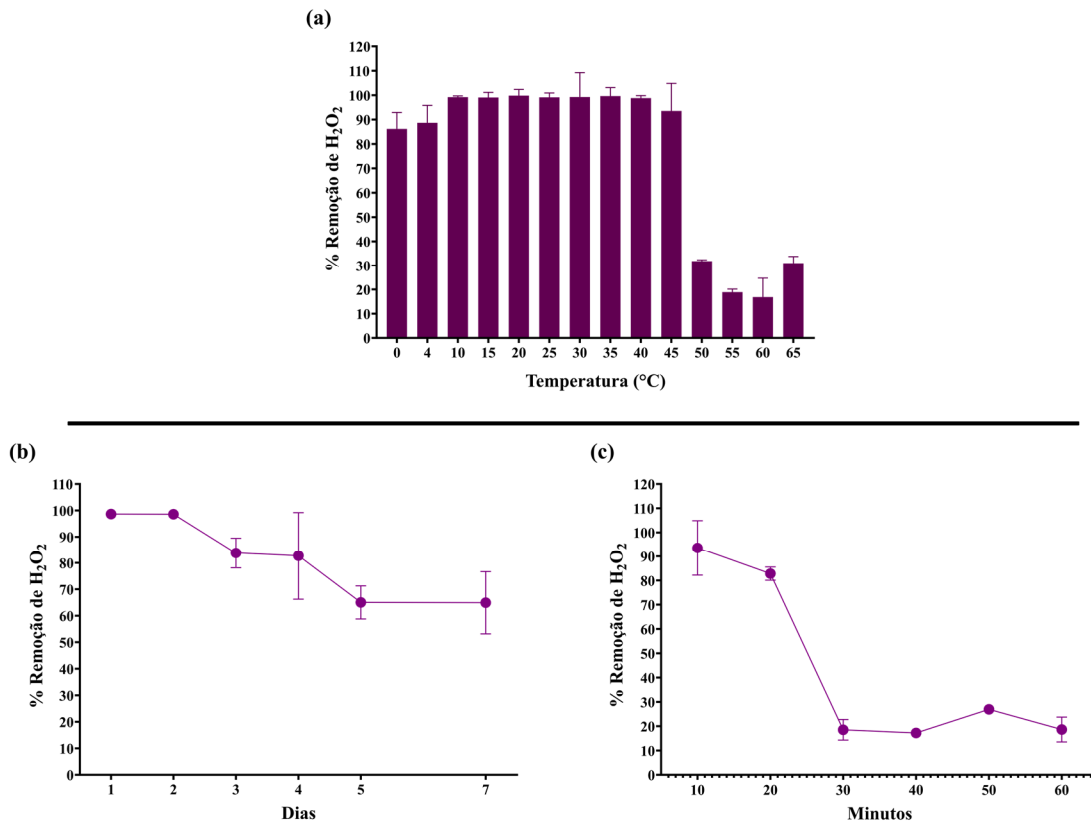


Figura 3.15. Efeito da temperatura na atividade enzimática. (a) Remoção do H₂O₂ em diferentes temperaturas, variando de 0, 4°C e 10 – 65°C (diferença de 5°C). A proteína apresentou as maiores atividades entre 10 - 40°C; (b) Termoestabilidade em 30 °C; (c) Termoestabilidade em 45°C.

3.4.7.3. Atividade da enzima em diferentes concentrações de substrato H₂O₂.

Foi realizada uma análise da atividade da proteína em diferentes concentrações de H₂O₂ (Figura 3.16). Para esse ensaio foi utilizado uma concentração de proteína de 1 μM e uma variação da concentração de substrato de 20 a 160 μM (variando dessa forma em oito pontos). Na figura 3.16a, pode ser observado a diminuição progressiva da curva de remoção do peróxido de hidrogênio. Os pontos que obtiveram maior remoção de H₂O₂ foi entre 20 - 60 μM de concentração de H₂O₂ com a completa remoção de H₂O₂ (remoção de 100 %) e a partir desse ponto é observada a queda da atividade, chegando a uma remoção de peróxido de apenas 15 % quando a concentração de H₂O₂ estava em 160 μM (figura 3.16a).

Foi construída a curva de formação do complexo tiocianato férrico (ou ferritiocianato) (Figura 3.16b), obtida a partir da concentração de H₂O₂ remanescente. Esse complexo é formado a partir da reação de oxidação do ferro (Fe⁺²) presente na solução de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ pelo H₂O₂ remanescente, que não foi reduzido pela proteína (Khalifa; Hadwan, 2020). É possível observar um aumento progressivo da formação do

complexo a partir de 80 μM de concentração de substrato até o último ponto, 160 μM de H_2O_2 , obtendo uma variação da concentração do complexo de 5,25 a 116, 89 μM .

Como a curva de atividade não alcançou um platô não foi possível a construção do gráfico de Michaelis-Menten, para obtenção dos parâmetros cinéticos - K_m (constante de Michaelis-Menten), $V_{\text{máx}}$ (velocidade de reação máxima), K_{cat} (número de renovação - *turnover-number*).

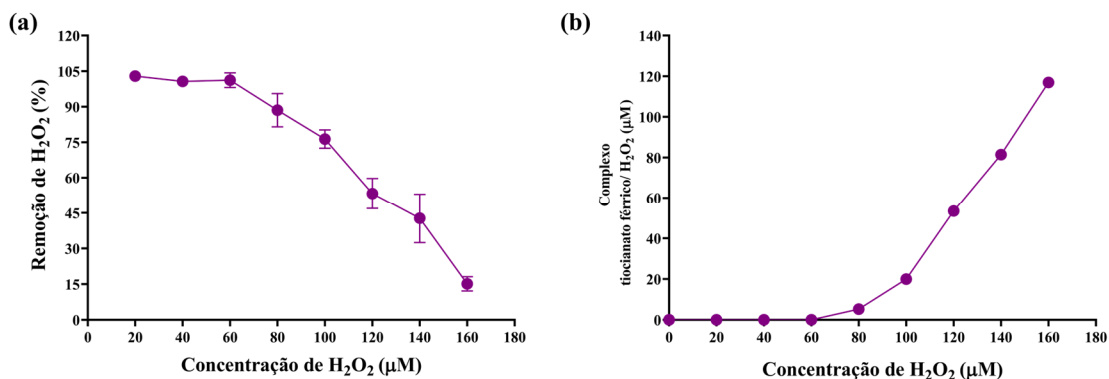


Figura 3.16. Atividade de 1 μM de bcp_00857 em diferentes concentrações de substrato H_2O_2 , variando em 20 a 160 μM . (a) Curva da remoção de peróxido de hidrogênio; (b) Curva da formação do complexo tiocianato férrico (ferritiocianato).

3.4.8. Caracterização biofísica da bcp_00857 - Análise da estrutura secundária da bcp_00857 por Dicroísmo Circular (DC)

3.4.8.1. Efeito do pH e do tratamento com DTT e H_2O_2 na estrutura secundária da proteína

A técnica de dicroísmo circular (DC) foi utilizada para análise do efeito do pH, temperatura e ação de agentes oxidante e redutor na estrutura secundária da proteína. O efeito do pH na estrutura secundária foi analisado por dicroísmo circular na região de 197 – 260 nm, a uma temperatura fixa de 25°C em três diferentes pHs (4, 7 e 9) e com e sem tratamento por DTT ou H_2O_2 . A proteína sem tratamento apresenta um espectro dicróico com banda positiva próximo a 197 nm e bandas negativas entre 208 - 222 nm, que corresponde a proteínas que apresentam estruturas do tipo α -hélice (Figura 3.17). O efeito do pH observado na figura 3.17, mostra que não há variação do perfil estrutural da proteína sem tratamento nos diferentes pHs. No pH 7, a proteína apresenta 8,3 % de estruturas em α -hélice, 22,1 % de estruturas em folhas- β , 14,1 % de β -turn e 57,6 de estruturas desordenadas (Tabela 3.3).

Sem tratamento

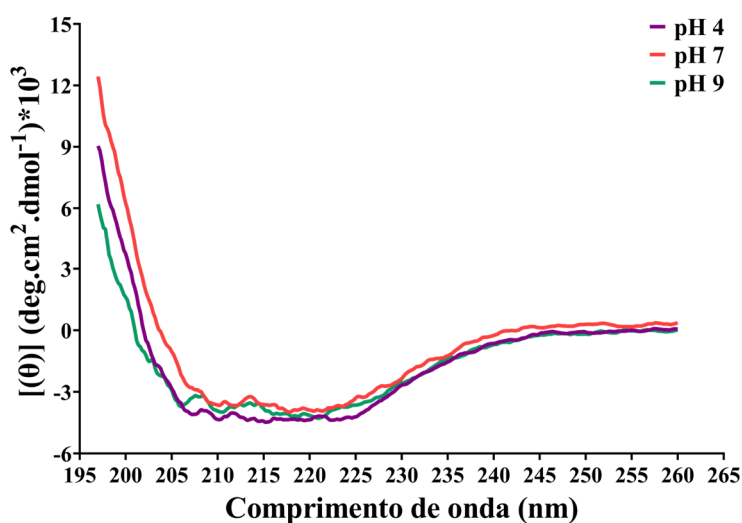
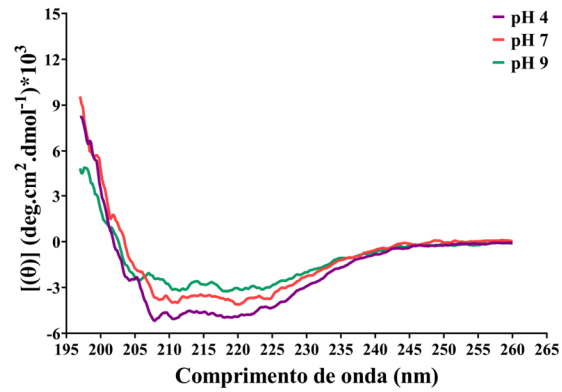


Figura 3.17. Efeito do pH 4, 7 e 9 na estrutura secundária da bcp_00857 analisada por dicroísmo circular.

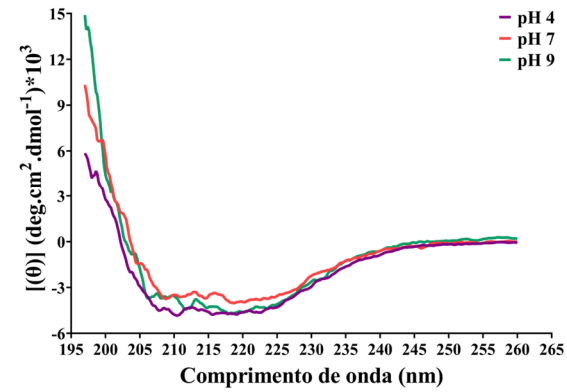
A fim de analisar a proteína em estado oxidado e reduzido, foram realizadas análises da proteína com tratamento em DTT (estado reduzido) e H_2O_2 (estado oxidado), em 0 e 20 minutos. No tratamento com DTT (Figura 3.18a e b), proteína em todos os pHs apresenta uma perda de sinal dos espectros dicróicos na região 197 – 200 nm. Em pH 9, há um aumento de sinal na região 210 – 230 nm e um diminuição de estruturas α -hélice (Figura 3.18a e Tabela 3.3). Em todos os pHs no tratamento de DTT em 20 minutos, a proteína apresentou um perfil de espectros dicróicos similar ao da proteína sem tratamento, porém com um aumento de estruturas folhas- β e α -hélice, a última exceto em pH 9 (Figura 3.18b).

O tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi o que mais modificou a estrutura da proteína comparando com o estado sem tratamento (Figura 3.18c e d). com diminuição do sinal dicróico na região próximo a 197 nm, diminuição de estruturas α -hélice e um aumento de estruturas folhas- β (Tabela 3.3). Em pH 9 com tratamento de H_2O_2 20 minutos, há um aumento de sinal na região 210 – 230 nm (valores acima de -3 (θ)), refletindo no aumento do percentual de estruturas desordenadas (Tabela 3.3) e há uma perda no sinal dicróico na região próximo a 197 nm, indicando perda de estrutura do tipo α -hélice.

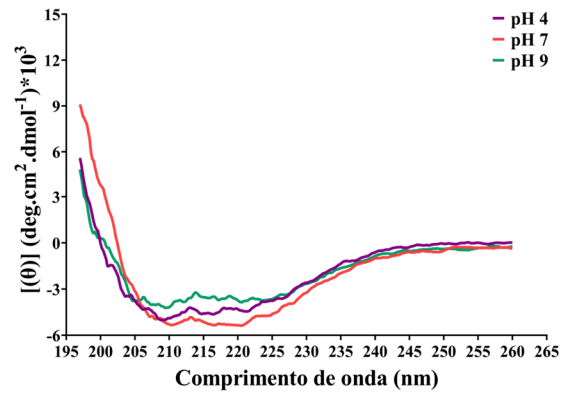
(a) DTT (0 min)



(b) DTT (20 min)



(c) H₂O₂ (0 min)



(d) H₂O₂ (20 min)

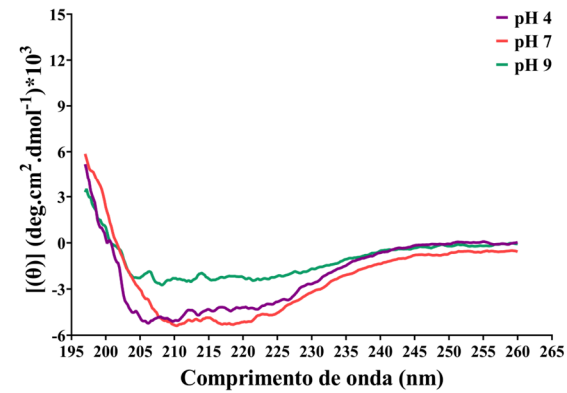


Figura 3.18. Efeito do pH 4, 7 e 9, e tratamentos com DTT e H₂O₂ na estrutura secundária da bcp_00857 analisada por dicroísmo circular. Proteína com tratamento com DTT por: (b) 0 minutos; e (c) 20 minutos. Proteína com tratamento com H₂O₂ por: (d) 0 minutos; e (e) 20 minutos.

Tabela 3.3. Percentual de estruturas secundárias da bcp_00857 sob o efeito dos pHs 4,0, 7,0, e 9,0 e efeito do tratamento com H₂O₂ e DTT estimado a partir de medidas de dicroísmo circular e calculadas por meio do servidor BeStSel.

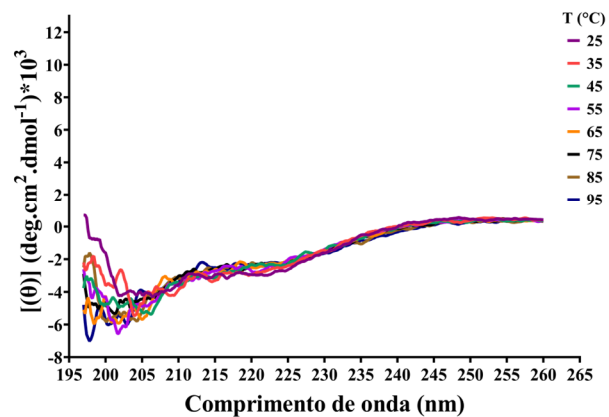
pH	Tratamento	α -Hélice	Folha- β	β -turn	Estruturas desordenadas
4	-	10,6	28,1	11,9	49,4
7	-	7,2	21,1	14,1	57,6
9	-	8,3	34,7	12,8	44,3
4	H ₂ O ₂ (0 minutos)	7,9	33,8	14,1	44,1
7	H ₂ O ₂ (0 minutos)	6,3	30,9	12,7	50
9	H ₂ O ₂ (0 minutos)	4	32,8	15,5	47,7
4	H ₂ O ₂ (20 minutos)	4,6	30,3	15,4	49,7
7	H ₂ O ₂ (20 minutos)	4,9	31,4	12,6	51,2
9	H ₂ O ₂ (20 minutos)	2,7	31,7	14,9	50,7
4	DTT (0 minutos)	13,9	30,4	10,7	45
7	DTT (0 minutos)	14,6	32,2	12,4	40,9
9	DTT (0 minutos)	5	36,8	14,6	43,6
4	DTT (20 minutos)	9,8	32,7	13,7	43,9
7	DTT (20 minutos)	13,6	29,9	11,9	44,9
9	DTT (20 minutos)	4,5	34,5	15,1	45,8

3.4.8.2. Efeito da temperatura e do tratamento com DTT e H₂O₂ na estrutura secundária da proteína

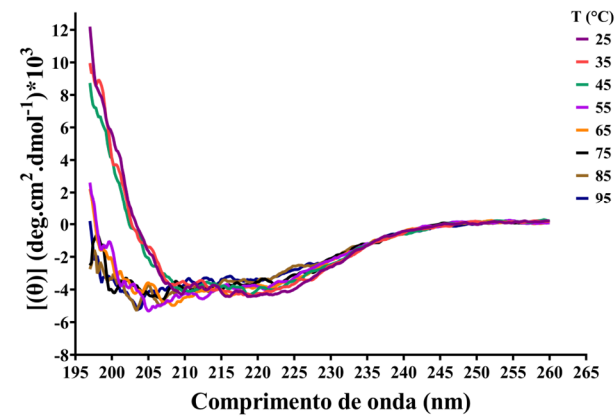
O efeito de diferentes temperaturas foi analisado por dicroísmo circular com espectros na região de 197 – 260 nm, variando as temperaturas entre 25 – 95 °C, em pH 4 e pH 7 e nos tratamentos com DTT e com H₂O₂ (Figura 3.19). As análises foram realizadas com uma diferença de 2-3 semanas em relação a análise do tópico anterior (tópico 3.4.8.1), por isso já foi possível observar uma perda de estrutura na temperatura em 25 °C, principalmente em pH 4, pois as proteínas foram mantidas nesse pH até a análise.

Na Tabela 3.4, é possível observar que em pH 4, no tratamento com DTT e com H₂O₂, com o aumento da temperatura há uma diminuição da estrutura α -hélice e um aumento da estrutura folhas- β e desordenada. Em relação ao tratamento com DTT em pH 4, há uma perda de sinal dos espectros dicróicos na região 197 – 200 nm em todas as temperaturas (Figura 3.19a).

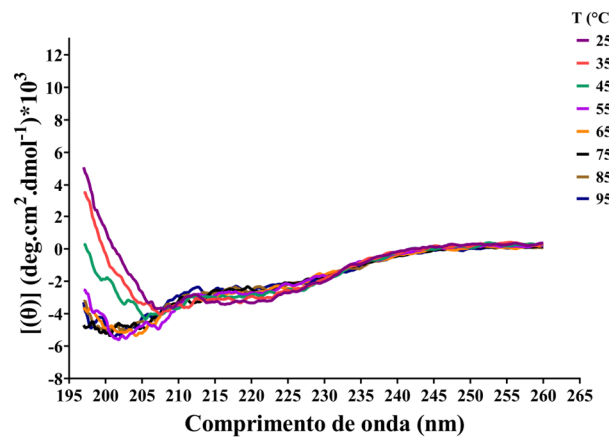
(a) DTT (pH 4)



(b) DTT (pH 7)



(c) H₂O₂ (pH 4)



(d) H₂O₂ (pH 7)

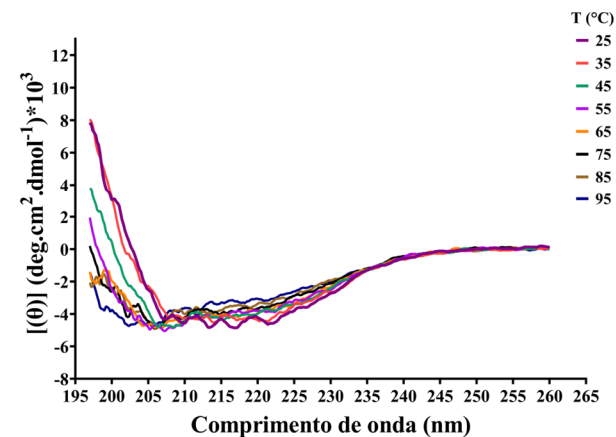


Figura 3.19. Efeito da temperatura nas estruturas secundárias da bcp_0857 avaliados por dicroísmo circular. Espectros dicroícos coletados entre 25 - 95 °C com: tratamento com DTT por 20 minutos em pH: (a) pH 4, e (b) pH 7; tratamento com H₂O₂ por 20 minutos em: pH (c) pH 4, e (d) pH 7.

No tratamento com DTT em pH 7, a estrutura se mostrou estável até 45 °C com perfil, com um deslocamento da curva para valores mais negativos na região 197 – 205 nm nas temperaturas acima de 45 °C (Figura 3.19b). No tratamento com H₂O₂ em pH 7, nas temperaturas de 25 e 35 °C, o perfil estrutural foi similar (Figura 3.19d). Nos dois tratamentos em pH 7, o aumento da temperatura ocasionou em uma redução da elipticidade molar na região 197 – 205 nm (Figura 3.19b e d) e uma perda de estrutura α -hélice e um ganho de estrutura folhas- β e desordenadas (Tabela 3.4), devido à perda de sinal dicróico em 218 nm e deslocamento da banda para a região entre 200 e 205 nm.

Tabela 3.4. Percentual de estruturas secundárias da bcp_00857 sob efeito da variação de temperatura entre 25 – 95 °C e efeito do tratamento com H₂O₂ e DTT (por 20 minutos) estimado a partir de medidas de dicroísmo circular e calculadas por meio do servidor BeStSel. T °C: Temperatura em °C.

	T °C	α - Hélice	Folha- β	β -turn	Estruturas desordenadas
pH 4 (DTT)	25	3,37	22,67	15,98	57,98
	35	3,71	27,62	21,91	46,76
	45	2,71	26,48	19,61	51,2
	55	1,95	20,69	17,32	60,04
	65	0,21	21,98	18,27	59,53
	75	1,51	24,9	19,55	54,04
	85	0,43	23,95	20,86	54,77
	95	0,66	25,56	19,06	54,73
	T °C	α - Hélice	Folha- β	β -turn	Outras
pH 7 (DTT)	25	9,7	30,09	13,35	46,87
	35	7,56	19,75	15,65	57,04
	45	11,55	24,68	12,77	51,01
	55	7,98	29,41	14,83	47,77
	65	6,91	24,72	14,93	53,44
	75	3,78	30,61	20,93	44,68
	85	6,76	20,07	16,23	56,93
	95	3,49	27,85	15,85	52,8

	T °C	α - Hélice	Folha- β	β -turn	Outras
pH 4 (H ₂ O ₂)	25	3,37	25,35	18,48	52,81
	35	5,78	26,83	16,45	50,93
	45	3,11	30,16	18,18	48,56
	55	5,48	29,4	16,4	48,72
	65	0,71	33,82	18,01	47,47
	75	2,92	29,89	18,93	48,26
	85	0,73	27,92	18,76	52,59
	95	3,12	30,13	17,08	49,67
	T °C	α - Hélice	Folha- β	β -turn	Outras
pH 7 (H ₂ O ₂)	25	2,97	32,92	17,19	46,93
	35	11,01	34,01	10,75	44,23
	45	3,96	32,32	14,03	49,69
	55	8,96	29,11	15,31	46,62
	65	3,97	32,74	15,65	47,63
	75	1,52	25,76	17,24	55,48
	85	5,03	28,59	16,61	49,77
	95	6	27,54	15,87	50,59

A curva de desnaturação térmica de 25 a 95 °C mostrou que a proteína sem tratamento em pH 4 se manteve estável sem alteração no sinal dicróico e mesmo em altas temperaturas não houve aumento do sinal, resultante da desnaturação da proteína (Figura 3.20). Em pH 7, a curva de desnaturação apresentou uma gradual redução do sinal (com valores mais próximos a zero) a partir de 52 °C, devido ao deslocamento da banda dicróica para região de estrutura desordenada.

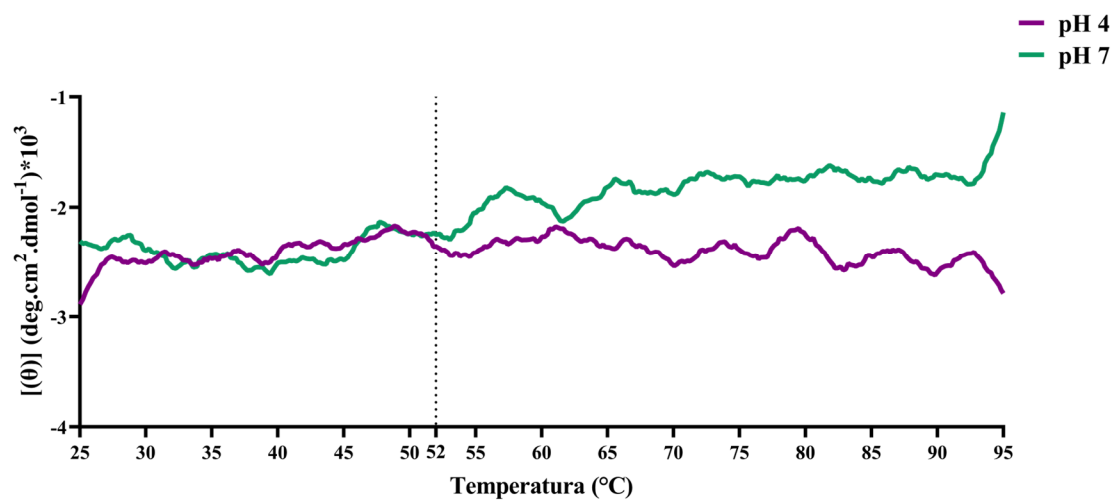


Figura 3.20. Efeito da temperatura na estabilidade estrutural da bcp_00857. Curvas de desnaturação térmica da proteína monitoradas em 208 nm para os pH 4 e 7 com variação da temperatura entre 25 a 95 $^\circ\text{C}$. A curva foi suavizada com o programa Prism.

3.5. Discussão

As peroxirredoxinas (Prx) são enzimas com atividade peroxidase e apresentam uma estrutura secundária altamente conservada (Karplus; Hall, 2007). Essas regiões conservadas foram observadas tanto no alinhamento da bcp_00857 com outras enzimas com estruturas 3D depositadas no banco de dados do PDB, como na análise por similaridade do Blastp com uma identidade > 50 % de sequência entre a bcp_00857 e as outras cinco peroxirredoxinas mais similares. Além da identidade superior a 50 % entre a bcp_00857 e a AhpC (código do PDB 5ENU), o alinhamento entre as estruturas 3D dessas proteínas apresentou um RMSD de 0,350. O RMSD é um cálculo muito utilizado para comparação quantitativa de estruturas tridimensionais, com valores igual a zero para estruturas idênticas e à medida que as duas estruturas se diferem, o valor de RMSD aumenta (Carugo; Pongor, 2001).

O modelo da estrutura tridimensional da bcp_00857, formada por 9 folha- β e 4 α -hélice, mostrou uma conformação similar a descrita na literatura para enzimas dessa família que apresentam como estrutura central 7 folhas- β e 5 α -hélices (Karplus; Hall, 2007). A confiabilidade do modelo foi avaliada com gráfico de Ramachandran e a análise QMEAN. O gráfico de Ramachandran foi utilizado para validação devido ser uma das técnicas mais utilizadas para validar modelos estruturais de proteínas, ele representa os valores permitidos para ângulos de torção phi (Φ) e psi (Ψ) nos aminoácidos (Laskowski; Macarthur; Thornton, 2006). Como segunda forma de validação foi utilizado o QMEAN (*Qualitative Model Energy ANalysis*), uma função de pontuação composta que realiza estimativas de qualidade absoluta globais (toda a estrutura) e locais (por resíduo) com base no modelo, com valores que variam de 0 a 1, “1” representando os modelos com maior confiabilidade (Benkert; Biasini; Schwede, 2011). A validação do modelo estrutural da proteína bcp_00857 utilizando o gráfico de Ramachandran e a análise QMEAN mostraram bons resultados e uma boa acurácia do modelo 3D.

No presente trabalho, a proteína bcp_00857 foi produzida em sistema de expressão de *E. coli* com o plasmídeo pET-24a(+), utilizando dois métodos de indução da expressão, IPTG e o meio autoindutor com lactose. O melhor método para expressão foi o cultivo da cepa transformada em meio autoindutor a 30 °C, já que o cultivo com meio autoindutor a 37 °C e a indução por IPTG apresentaram formação de corpos de inclusão. A formação de corpos de inclusão ocorre quando há uma alta expressão da proteína recombinante em *E. coli*, fazendo com que a proteína esteja encapsulada no corpo de

inclusão que precisa ser solubilizado para obtenção da proteína na sua forma ativa (Singh; Panda, 2005).

A produção da proteína em corpos de inclusão pode ser uma problemática devido à dificuldade da recuperação da proteína após a indução. Para recuperar a proteína são utilizados agentes desnaturantes caotrópicos em altas concentrações, como a uréia, que irão solubilizar os corpos de inclusão e desnaturar a proteína, facilitando a sua recuperação. Assim, após a desnaturação, é necessário renaturar a proteína para obter a mesma em sua forma estruturada ativa (Singh; Panda, 2005). O processo de desnaturação e renaturação da proteína, além de aumentar os passos para obtenção da proteína, a renaturação pode levar a um enovelamento com perda de estrutura secundária, além de gerar um rendimento baixo de recuperação de proteína variando entre 15 - 25 % da proteína total (Singh; Panda, 2005). Diante disso, o método de indução com meio autoindutor a 30 °C, com obtenção da proteína na fração solúvel e sem a necessidade de desnaturação, se mostrou a escolha mais eficiente para produção da proteína bcp_00857.

A análise da atividade enzimática da bcp_00857 em diferentes pHs mostrou ausência de atividade em pH ácido e maior atividade em pH 7 (~ 99% de remoção de H₂O₂). Em pH básico, pH 8 e 9, a proteína ainda apresenta atividade apesar de reduzida se comparada ao pH 7. Outras peroxiredoxinas, como a ClaBCP da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* e proteína CsPrx, uma peroxiredoxina 2-Cys atípica, da planta *Citrus sinensis*, também não mostraram atividade em pH ácido (Gupta *et al.*, 2022d, 2022c). Porém, as duas enzimas, apresentaram atividade em pH básico (pH 8 a 11), com remoção de H₂O₂ ~100 % (entre pH 8 e 11) (Gupta *et al.*, 2022a, 2022c). Uma grande diferença de atividade em diferentes tampões para o mesmo pH só foi observada em pH 6, onde a proteína bcp_00857 obteve atividade no tampão acetato (pH 6) com uma remoção de H₂O₂ de 40,6 %.

A atividade enzimática da bcp_00857 se mostrou estável dentro da faixa de temperatura entre 0 - 45 °C, com atividade superior a 86 %, e apresentou atividade até 65 °C, apesar de reduzida. A estabilidade entre 10 – 40 °C também foi observada nas peroxiredoxinas ClaBCP da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* e na proteína CsPrx, uma peroxiredoxina 2-Cys atípica, da planta *Citrus sinensis* (Gupta *et al.*, 2022d, 2022c). Entretanto, diferente da bcp_00857, ClaBCP e CsPrx em temperaturas mais baixas (0 e 5 °C), apresentaram atividade abaixo de 40 % e 80 %, respectivamente (Gupta *et al.*, 2022b, 2022c). Além de apresentar uma grande faixa de atividade em diferentes

temperaturas, a proteína bcp_00857 se mostrou estável por 7 dias quando incubada a 30 °C, com redução da atividade para 64,9 % ao final do 7 dia.

A técnica de dicroísmo circular (DC) foi utilizada a fim de analisar a interferência do pH, da temperatura e da ação de agentes oxidante e redutor na estrutura secundária da proteína. O dicroísmo circular (DC) é um método bastante utilizado na avaliação de estrutura secundária de proteínas, na estabilidade conformacional e nos estudos de interação de proteínas (Kelly; Jess; Price, 2005).

De acordo com os resultados visualizados nos gráficos do DC, a diferença de pH não mostrou uma grande interferência na estrutura da proteína, diferentemente dos tratamentos de 20 minutos com DTT e H₂O₂. O tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 20 minutos foi o que mostrou uma maior diferença na estrutura da proteína, com perda de estrutura α -hélice da proteína em todos os pHs, ganho de estrutura folhas- β em pH 7. Essa mudança da estrutura devido a ação do H₂O₂ se dá provavelmente devido a oxidação da enzima e a mudança conformacional que a proteína sofre para que haja a sua ação catalítica, que ocorre quando a enzima entra em contato com substratos peróxidos (Karplus; Hall, 2007).

A diferença estrutural devido a diferenciação do pH foi observada nas análises de DC em diferentes temperaturas na presença de DTT e H₂O₂, onde pode ser visualizado uma perda de estruturas α -hélice até nas temperaturas mais baixas (25 e 35 °C), o que não acontece em pH 7 nas mesmas condições. A proteína foi mantida por três semanas em pH 4 até a realização do experimento de DC em diferentes temperaturas mostrando que um tempo prolongado em pH ácido modificou a estrutura da proteína e explica a falta de atividade em pHs ácidos.

Temperatura alta, acima de 50 °C, foi a variável que mais influenciou a estrutura da proteína. Com o aumento da temperatura (acima de 45 °C) nos dois tratamentos (DTT e H₂O₂) há uma diminuição de estruturas α -hélice e aumento de estruturas desordenadas. Essa mudança na estrutura explica a diminuição da atividade observada a partir 50 °C. A variação de temperatura também se mostrou uma das principais causas de mudança estrutural na proteína 2-Cys atípica, da planta *Citrus sinensis*, com o aumento de estruturas desordenadas a temperaturas mais elevadas (> 55 °C) (Gupta *et al.*, 2022c).

3.6. Conclusão

O presente trabalho mostrou a caracterização da proteína peroxirredoxina bcp_00857, selecionada para o estudo devido a sua alta expressão no cultivo da *Delftia* sp. PE 138 com polietileno como única fonte de carbono. No que diz respeito a atividade específica da enzima, a redução do H₂O₂, a peroxirredoxina bcp_00857 se mostrou eficiente e com resultados similares a literatura. A enzima apresentou estabilidade após 7 dias de incubação a 30 °C e atividade em uma grande faixa de temperatura. A produção por expressão heteróloga e a purificação da proteína bcp_00857 por meio da cromatografia de afinidade por Histag e cromatografia de exclusão molecular foram eficientes.

Os resultados mostraram que a sequência de aminoácidos da bcp_00857 é similar a outras peroxirredoxinas e possui várias regiões conservadas. A construção do modelo da estrutura tridimensional se mostrou confiável com ótimos valores de validação. As análises de DC mostraram que a temperatura acima de 50 °C e a ação de H₂O₂, são as duas variáveis que mais influenciam nas estruturas secundárias da proteína.

A peroxirredoxina é uma proteína que promove proteção contra oxidação celular e estresse oxidativo (Cao; Lindsay, 2017). Com os resultados obtidos nesse estudo, foi confirmado que a peroxirredoxina bcp_00857 reduz do H₂O₂ eficientemente, provavelmente atuando nos processos de proteção celular e estresse oxidativo. Experimentos futuros são necessários para analisar a ação dessa enzima no polietileno e outros plásticos.

4 – Perspectivas

- Avaliar o efeito da enzima peroxidase bcp_00857 no perfil químico do PE e outros plásticos (e.g PET, PU, PP e PVC);
- Avaliar por PCR em tempo real a expressão das enzimas oxidoreduzases que se mostraram com expressão aumentada no cultivo com PE;
- Realizar a proteômica do sobrenadante dos microrganismos *Comamonas* sp., *Delftia* sp. e *Stenotrophomonas* sp. para identificar quais enzimas atuam na linha de frente da degradação de PE;
- Clonar o gene codificador das enzimas oxidoreduzases, que apresentaram expressão aumentada no cultivo de PE, em vetores de expressão.
- Caracterizar as enzimas que se mostram mais expressas no cultivo com PE e avaliar o efeito dessas no perfil químico do PE.

5 – Conclusão geral

A grande produção de plásticos aliada a um descarte inadequado e uma reciclagem não eficiente, tornou-se um dos problemas que mais impactam o ambiente. As estratégias de reciclagem utilizadas atualmente não conseguem abranger todos os tipos de plásticos e nem reduzir o volume de resíduos de forma a diminuir os prejuízos ao meio ambiente. Em decorrência disso, ilhas de plásticos se formam nos oceanos, cidades são contaminadas por plásticos e microplásticos e animais ingerem resíduos de plásticos, que muitas vezes os levam a morte. Além disso, fragmentos de microplásticos já foram reportados até em órgãos do corpo humano. Diante disso, o estudo da biodegradação dos plásticos se faz necessário. A descoberta de novos organismos com potencial metabólico para degradação e o desenvolvimento de novas tecnologias são fundamentais para que o gerenciamento dos plásticos descartados seja realizado de uma forma mais sustentável, mais rápida e eficiente, já que a degradação abiótica dos plásticos pode demorar mais de 100 anos.

O trabalho apresentado buscou expandir o conhecimento sobre as bactérias *Delftia* sp. PE 138 e *Comamonas* sp. PE 63 isoladas por Peixoto (2018), a partir de resíduos plásticos com visível degradação. No presente trabalho foram apresentados a caracterização de uma possível nova espécie, a *Comamonas* sp. PE 63, e a caracterização da proteína peroxirredoxina selecionada da *Delftia* sp. PE 138. Utilizando múltiplas técnicas, como análises do genoma, predição fenotípica e análise do perfil de ácidos graxos para caracterizar taxonomicamente a *Comamonas* sp. PE 63 foi possível ampliar os conhecimentos sobre essa bactéria e identificá-la como uma nova espécie do gênero *Comamonas*. A partir dos dados de expressão diferencial de genes, a proteína peroxirredoxina bcp_00857, que se mostrou mais expressa no cultivo com PE, foi selecionada para os estudos de caracterização. A produção por expressão heteróloga e a purificação da proteína bcp_00857 foram eficientes e com isso foi possível caracterizar a proteína em relação a temperatura e pH ótimos, 30 °C e pH 7 respectivamente. Os resultados da análise da interferência do pH, temperatura e estados oxidado e reduzido na estrutura secundária da proteína realizada pela técnica de DC mostram que temperatura e a ação de H₂O₂ são as duas variáveis que mais influenciam nas estruturas secundárias da proteína.

Com isso, os resultados obtidos nesse trabalho auxiliarão no direcionamento de novas pesquisas no estudo de gestão de resíduos plásticos, visto que uma bactéria não

descrita anteriormente e com potencial para degradação de plásticos foi caracterizada, bem como uma enzima com possível influência na biodegradação de polietileno.

6 – Referências bibliográficas

AFGAN, E. *et al.* The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W3–W10, 2016.

AKUTSU, Y.; NAKAJIMA-KAMBE, T.; NOMURA, N. **Purification and Properties of a Polyester Polyurethane-Degrading Enzyme from Comamonas acidovorans TB-35APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. [S. l.: s. n.], 1998. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/aem>. .

ALI, S. S. *et al.* Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 780, p. 146590, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969721016582>.

ANDRADY, A. L.; NEAL, M. A. Applications and societal benefits of plastics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 364, n. 1526, p. 1977–1984, 2009. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2008.0304>.

ARKIN, A. P. *et al.* KBase: The United States Department of Energy Systems Biology Knowledgebase. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 566–569, 2018.

ARP, H. P. H. *et al.* Weathering Plastics as a Planetary Boundary Threat: Exposure, Fate, and Hazards. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 55, n. 11, p. 7246–7255, 2021. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.1c01512>.

ARULPRAKASAM, K. R.; DHARUMADURAI, D. Genome mining of biosynthetic gene clusters intended for secondary metabolites conservation in actinobacteria. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 161, p. 105252, 2021.

AZEVEDO-SANTOS, V. M. *et al.* Plastic pollution: A focus on freshwater biodiversity. **Ambio**, [s. l.], v. 50, n. 7, p. 1313–1324, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s13280-020-01496-5>.

BATUT, B. *et al.* Community-Driven Data Analysis Training for Biology. **Cell Systems**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 752-758.e1, 2018.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu170>.

BUSHNELL, B.; ROOD, J.; SINGER, E. BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1–15, 2017.

CAO, Z.; LINDSAY, J. G. The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. *In*: SUBCELLULAR BIOCHEMISTRY. [S. l.]: Springer New York, 2017. v. 83, p. 127–147. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-46503-6_5.

CARUGO, O.; PONGOR, S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. **Protein Science**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1470–1473, 2001.

CHAI, L. *et al.* Depolymerization and decolorization of kraft lignin by bacterium *Comamonas* sp. B-9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 1907–1912, 2014. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5166-5>.

CHAUMEIL, P.-A. *et al.* GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 38, n. 23, p. 5315–5316, 2022.

CHIPIROM, K. *et al.* *Comamonas terrae* sp. nov., an arsenite-oxidizing bacterium isolated from agricultural soil in Thailand. **The Journal of General and Applied Microbiology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 245–251, 2012. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jgam/58/3/58_245/_article.

CHUN, J. *et al.* Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.002516>.

COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A. E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 587–589, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu661>.

CORRETTO, E. *et al.* Complete genome sequence of the heavy metal resistant bacterium *Agromyces aureus* AR33T and comparison with related Actinobacteria. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 2, 2017.

DANECEK, P. *et al.* Twelve years of SAMtools and BCFtools. **GigaScience**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 1–4, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/giab008/6137722>.

DAS-GUPTA, K. D. Polyethylene: Structure, Morphology, Molecular Motion and Dielectric Property Behavior. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, [s. l.], p. 5–15, 1994.

DE VOS, P. *et al.* *Comamonas Davis* and *Park* 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and *Comamonas terrigena* Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 443–453, 1985. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-35-4-443>.

DELANO, W. L. PyMOL: An Open-Source Molecular Graphics Tool. **CCP4 Newsl. 875 Protein Crystallogr**, [s. l.], v. 40, n. 1, 2002.

DE-SOUZA, M. T.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. **TECNICAS BASICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR**. 2 eded. Brasília: Universidade de Brasília, 2016.

DEY, A. S. *et al.* Biodegradation of Unpretreated Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., Isolated From Waste Dumpsite and Drilling Fluid. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

DIERKES, R. F. *et al.* An Ultra-Sensitive *Comamonas thiooxidans* Biosensor for the Rapid Detection of Enzymatic Polyethylene Terephthalate (PET) Degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 89, n. 1, 2023. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.01603-22>.

DOYLE, M. **Visualization of RNA-Seq results with heatmap2 (Galaxy Training Materials)**. [S. l.], 2023.

DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. Peroxiredoxins in Bacterial Antioxidant Defense. *In*: [S. l.: s. n.], 2007. p. 143–193. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6051-9_7.

EHARA, K. *et al.* Polyethylene degradation by manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 180–183, 2000. Disponível em: <https://jwoodscience.springeropen.com/articles/10.1007/BF00777369>.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *In*: [S. l.: s. n.], 1997. p. 396–404.

EWING, B. *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. **Genome Research**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

FELSENSTEIN, J. CONFIDENCE LIMITS ON PHYLOGENIES: AN APPROACH USING THE BOOTSTRAP. **Evolution**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

GAO, R.; LIU, R.; SUN, C. A marine fungus *Alternaria alternata* FB1 efficiently degrades polyethylene. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 431, p. 128617, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389422004058>.

GASTEIGER, E. *et al.* Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *In*: THE PROTEOMICS PROTOCOLS HANDBOOK. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2017. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1700782>.

GRAVOUIL, K. *et al.* Transcriptomics and Lipidomics of the Environmental Strain *Rhodococcus ruber* Point out Consumption Pathways and Potential Metabolic Bottlenecks for Polyethylene Degradation. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. 9, p. 5172–5181, 2017.

GUPTA, D. N. *et al.* Biochemical characterization and structure-based in silico screening of potent inhibitor molecules against the 1 cys peroxiredoxin of bacterioferritin comigratory protein family from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], 2022a.

GUPTA, D. N. *et al.* Biochemical characterization and structure-based in silico screening of potent inhibitor molecules against the 1 cys peroxiredoxin of bacterioferritin

comigratory protein family from *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], 2022b.

GUPTA, D. N. *et al.* Characterization of a cytoplasmic 2-Cys peroxiredoxin from *Citrus sinensis* and its potential role in protection from oxidative damage and wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 209, p. 1088–1099, 2022c.

GUPTA, D. N. *et al.* In-silico screening and identification of potential inhibitors against 2Cys peroxiredoxin of *Candidatus Liberibacter asiaticus*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 40, n. 19, p. 8725–8739, 2022d.

YOON, M. G.; JEON, H. J.; KIM, M. N. Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, [s. l.], v. 03, n. 04, p. 1–8, 2012. Disponível em: <https://www.omicsonline.org/biodegradation-of-polyethylene-by-a-soil-bacterium-and-alkb-cloned-recombinant-cell-2155-6199.1000145.php?aid=5697>.

HA, S.-M. *et al.* Application of the Whole Genome-Based Bacterial Identification System, TrueBac ID, Using Clinical Isolates That Were Not Identified With Three Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Systems. **Annals of Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 530–536, 2019.

HADFIELD, J. *et al.* Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 292–293, 2018.

HALL, T. BioEdit: An important software for molecular biology Software Review. **GERF Bulletin of Biosciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 60–61, 2011. Disponível em: https://www.gerfbb.com/images/upload/article/pdf/1387127438_Alzohairy_et_al_2011.pdf.

HATAYAMA, K. *Comamonas humi* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 64, n. Pt_12, p. 3976–3982, 2014. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.067439-0>.

HOFMANN, B.; HECHT, H.-J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, [s. l.], v. 383, n. 3–4, 2002. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/BC.2002.040/html>.

HUERTA-CEPAS, J. *et al.* Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 2115–2122, 2017.

HUGH, R. *Comamonas terrigena* comb. nov. with proposal of a neotype and request for an Opinion. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 33–36, 1962. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/0096266X-12-2-33>.

HUSAIN, Q.; ULLAH, M. F. **Biocatalysis: Enzymatic basics and applications**. [S. l.]: Springer International Publishing, 2019.

IYOSHI, Y.; TSUTSUMI, Y.; NISHIDA, T. Polyethylene degradation by lignin-degrading fungi and manganese peroxidase. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 222–229, 1998. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF00521967>. Acesso em: 11 jan. 2023.

JADHAV, U. U. *et al.* Purification and characterization of veratryl alcohol oxidase from *Comamonas* sp. UVS and its role in decolorization of textile dyes. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 369–376, 2009.

JEON, H. J.; KIM, M. N. Comparison of the functional characterization between alkane monooxygenases for low-molecular-weight polyethylene biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 114, p. 202–208, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.06.012>.

JEON, H. J.; KIM, M. N. Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from *Pseudomonas aeruginosa* E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 103, p. 141–146, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830515001535>.

JIANG, B. *et al.* Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Comamonas* sp. JB. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 176, n. 6, p. 1700–1708, 2015.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, [s. l.], v. 596, n. 7873, p. 583–589, 2021.

KANEHISA, M. *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 36, n. Database, p. D480–D484, 2007.

KANG, W. *et al.* *Comamonas piscis* sp. nov., isolated from the intestine of a Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 780–785, 2016. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000790>.

KARPLUS, P. A.; HALL, A. Structural Survey of the Peroxiredoxins. *In*: **SUBCELLULAR BIOCHEMISTRY**. [S. l.: s. n.], 2007. v. 44, p. 41–60. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6051-9_3.

KAWAI, F. *et al.* A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 24, p. 10053–10064, 2014.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. **How to study proteins by circular dichroism**. [S. l.: s. n.], 2005.

KHALIFA, H. H.; HADWAN, M. H. Simple Method for the Assessment of Peroxiredoxin Activity in Biological Samples. **Chemical Data Collections**, [s. l.], v. 27, 2020.

KIM, D. *et al.* Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 37, n. 8, p. 907–915, 2019. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41587-019-0201-4>.

KIM, K. *et al.* The isolation and purification of a specific “protector” protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 263, n. 10, p. 4704–4711, 1988.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KNOOPS, B.; LOUMAYE, E.; EECKEN, V. V. D. Evolution of the Peroxiredoxins. *In*: [S. l.: s. n.], 2007. p. 27–40. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4020-6051-9_2.

KURTZ, S. *et al.* Versatile and open software for comparing large genomes. **Genome Biology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. R12, 2004.

KWON, G. *et al.* **A review of plastic pollution and their treatment technology: A circular economy platform by thermochemical pathway**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2023.

LAMB, J. B. *et al.* Plastic waste associated with disease on coral reefs. **Science**, [s. l.], v. 359, n. 6374, p. 460–462, 2018. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aar3320>.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nmeth.1923>.

LARKIN, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. **International Tables for Crystallography**, [s. l.], v. F, n. ch. 25.2, p. 722–725, 2006.

LEE, W.-H.; AZIZAN, M. N. M.; SUDESH, K. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 129–134, 2004.

LIU, H. Viral Protein–Nucleic Acid Interaction: South (North)-Western Blot. *In*: **METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY**. [S. l.]: Humana Press, 2008. v. 451, p. 405–420. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-102-4_28.

LIU, R. *et al.* Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 15, p. e97–e97, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv412>.

LIU, B.; POP, M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 37, n. Database, p. D443–D447, 2009.

LORBER, B. *et al.* Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 372–

382, 2012. Disponível em:
<https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.20644>.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 193, p. 265–275, 1951.

LU, H. *et al.* Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. **Nature**, [s. l.], v. 604, n. 7907, p. 662–667, 2022. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/s41586-022-04599-z>.

LUCAS, N. *et al.* Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. [s. l.], v. 73, p. 429–442, 2008.

MACLEOD, M. *et al.* The global threat from plastic pollution. **Science**, [s. l.], v. 373, n. 6550, p. 61–65, 2021. Disponível em:
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abg5433>.

MARANHÃO, A. Q. Capítulo X - Transformação Bacteriana. *In*: DE-SOUZ, M. T.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. (org.). **TECNICAS BASICAS EM BIOLOGIA MOLECULAR**. 2 eded. Brasília: EDU - UNB, 2016. p. 215–230.

MEIER-KOLTHOFF, J. P. *et al.* TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. D1, p. D801–D807, 2022.

MICSONAI, A. *et al.* BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 50, n. W1, p. W90–W98, 2022.

MUMTAZ, T. *et al.* Synthesis, characterization, and structural properties of intracellular copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by comamonas sp. EB 172 from renewable resource. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 329–340, 2010.

NARAYAN, K. D.; PANDEY, S. K.; DAS, S. K. Characterization of Comamonas thiooxidans sp. nov., and Comparison of Thiosulfate Oxidation with Comamonas testosteroni and Comamonas composti. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 248–253, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-010-9602-9>.

NELSON, K. J. *et al.* Analysis of the peroxiredoxin family: Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 947–964, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.22936>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6. ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2014.

NI, B. *et al.* Assimilation of aromatic compounds by Comamonas testosteroni: Characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 97, n. 13, p. 6031–6041, 2013.

OAKLEY, B. R.; KIRSCH, D. R.; MORRIS, A. R. **A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels** ANALYTICAL BIOCHEMISTRY. [S. l.: s. n.], 1980.

PARK, K.-H. *et al.* *Comamonas suwonensis* sp. nov., isolated from stream water in the Republic of Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 4, 2021.

PARK, E.-H.; KIM, Y.-S.; CHA, C.-J. *Comamonas fluminis* sp. nov., isolated from the Han River, Republic of Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 3, 2022. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.005287>.

PARKS, D. H. *et al.* CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. **Genome Research**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 1043–1055, 2015. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.186072.114>.

TWALA, P. P. *et al.* Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. **AIMS Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 330–349, 2020.

PATTERSON, S. D.; AEBERSOLD, R. H. **Proteomics: The first decade and beyond**. [S. l.: s. n.], 2003.

PEIXOTO, J. **ESTUDO DO METABOLISMO DE POLIETILENO: DESVENDANDO AS ESTRATÉGIAS METABÓLICAS MICROBIANAS ENVOLVIDAS NA BIODEGRADAÇÃO DE PLÁSTICOS**. 2018. 202 f. - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, [s. l.], 2018.

PEIXOTO, J. **Prospecção de microorganismos com potencial para biodegradação de polietileno**. 2013. 123 f. - Universidade de Brasília, [s. l.], 2013.

PEIXOTO, J. *et al.* The role of nitrogen metabolism on polyethylene biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 432, n. January, p. 128682, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128682>.

PEIXOTO, J.; SILVA, L. P.; KRÜGER, R. H. Brazilian Cerrado soil reveals an untapped microbial potential for untreated polyethylene biodegradation. **Journal of Hazardous Materials**, [s. l.], 2017.

PENG, Y. *et al.* IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1420–1428, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bts174>.

PERTEA, M. *et al.* StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 290–295, 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nbt.3122>.

PERTEA, M. *et al.* Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1650–1667, 2016.

PLASTIC EUROPE. **Polyolefins**. [S. l.], 2023.

- PLASTICS EUROPE. **Plastics - the Facts 2022**. [S. l.: s. n.], 2022.
- PLASTICS EUROPE. **Plastics - the fast Facts 2023**. [S. l.: s. n.], 2023.
- PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.
- PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 14, p. 1823–1829, 2012.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>**. [S. l.: s. n.], 2019.
- REDDY, C. A. *et al.* (org.). **Methods for General and Molecular Microbiology**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2007.
- RICHTER, M. *et al.* JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 929–931, 2016.
- ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. W1, p. W320–W324, 2014.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- RONG, Z. *et al.* Degradation of low-density polyethylene by the bacterium *Rhodococcus* sp. C-2 isolated from seawater. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 907, p. 167993, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969723066202>.
- RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. [S. l.: s. n.], 2021.
- RU, J.; HUO, Y.; YANG, Y. Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00442/full>.
- SAITO, Y.; DOI, Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 99–104, 1994.
- SANLUIS-VERDES, A. *et al.* Wax worm saliva and the enzymes therein are the key to polyethylene degradation by *Galleria mellonella*. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 5568, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-33127-w>.
- SANTACRUZ-JUÁREZ, E. *et al.* Fungal enzymes for the degradation of polyethylene: Molecular docking simulation and biodegradation pathway proposal. **Journal of**

Hazardous Materials, [s. l.], v. 411, n. December 2020, p. 125118, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389421000820>.

SANTO, M.; WEITSMAN, R.; SIVAN, A. The role of the copper-binding enzyme – laccase – in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s. l.], v. 84, p. 204–210, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830512000637>.

SASSER, M. **Technical Note # 101 Identification of Bacterial by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters (GC-FAME)**. Newark, DE: [s. n.], 1990.

SCHRÖDINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System**. [S. l.: s. n.], 2015.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu153>.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SLY, L. I.; WEN, A.; FEGAN, M. Delftia. *In*: **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATICS OF ARCHAEA AND BACTERIA**. [S. l.]: Wiley, 2015. p. 1–7.

SNIPEN, L.; USSERY, D. W. Standard operating procedure for computing pangenome trees. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 135–141, 2010.

SOITO, L. *et al.* PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 39, n. suppl_1, p. D332–D337, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq1060>.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2007.

SPEIGHT, J. G. Monomers, polymers, and plastics. *In*: **HANDBOOK OF INDUSTRIAL HYDROCARBON PROCESSES**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 597–649. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012809923000014X>.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S. A.; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 409–427, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-016-0218-6>.

SUN, L.-N. *et al.* *Comamonas jiangduensis* sp. nov., a biosurfactant-producing bacterium isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. Pt_6, p. 2168–2173, 2013. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.045716-0>.

SUN, J. *et al.* OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. W1, p. W397–W403, 2023.

TAMAOKA, J.; HA, D.-M.; KOMAGATA, K. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an Emended Description of the Genus *Comamonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 52–59, 1987. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-37-1-52>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021.

TAO, X. *et al.* Polyethylene Degradation by a Rhodococcous Strain Isolated from Naturally Weathered Plastic Waste Enrichment. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 57, n. 37, p. 13901–13911, 2023. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.3c03778>.

TATUSOV, R. L. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 33–36, 2000.

TATUSOV, R. L. *et al.* **The COG database: an updated version includes eukaryotes**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/4/41>.

THOMPSON, R. C. *et al.* Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. [s. l.], n. 2009, p. 2153–2166, 2010.

TINDALL, B. J. *et al.* Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 249–266, 2010.

TINDALL, B. J. *et al.* Phenotypic Characterization and the Principles of Comparative Systematics. *In: METHODS FOR GENERAL AND MOLECULAR MICROBIOLOGY*. Washington, DC, USA: ASM Press, 2014. p. 330–393.

TOGAWA, R. C. *et al.* The use of the PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. *In:* , 2006, Aguas de Lindoia - SP - Brasil. **Anais [...]**. Aguas de Lindoia - SP - Brasil: XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2006.

UDAONDO, Z.; DUQUE, E.; RAMOS, J. The pangenome of the genus *Clostridium*. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 2588–2603, 2017.

VARGA, B. *et al.* Enzymatic treatment and subsequent toxicity of organic micropollutants using oxidoreductases - A review. **Journal of Cleaner Production**, [s. l.], v. 221, p. 306–322, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652619305244>.

WANG, N.; HUO, Y. X. **Using genome and transcriptome analysis to elucidate biosynthetic pathways**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

WAUTERS, G. *et al.* Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description

of *Comamonas terrigena*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 859–862, 2003. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02450-0>.

WEIMANN, A. *et al.* From Genomes to Phenotypes: Traitair, the Microbial Trait Analyzer. **mSystems**, [s. l.], v. 1, n. 6, 2016a.

WEIMANN, A. *et al.* From Genomes to Phenotypes: Traitair, the Microbial Trait Analyzer. **mSystems**, [s. l.], v. 1, n. 6, 2016b.

WEISS, M. *et al.* Permanent draft genome sequence of *Comamonas testosteroni* KF-1. **Standards in Genomic Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 239–254, 2013.

WEN, A. *et al.* Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka *et al.* 1987) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 567–576, 1999. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-49-2-567>.

WICKHAM, H. **ggplot2**. [S. l.: s. n.], 2009.

WILKES, R. A.; ARISTILDE, L. Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 582–593, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article/123/3/582/6714101>.

WILLEMS, A.; DE VOS, P. *Comamonas*. In: THE PROKARYOTES. New York, NY: Springer New York, 2006. p. 723–736. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/0-387-30745-1_31.

WINGETT, S. W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. **F1000Research**, [s. l.], v. 7, n. 0, p. 1338, 2018. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/7-1338/v1>.

WU, M.; SCOTT, A. J. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 1033–1034, 2012.

WU, Y.; ZAIDEN, N.; CAO, B. The core- and pan-genomic analyses of the genus *Comamonas*: From environmental adaptation to potential virulence. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. DEC, 2018a.

WU, Y.; ZAIDEN, N.; CAO, B. The core- and pan-genomic analyses of the genus *Comamonas*: From environmental adaptation to potential virulence. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. DEC, 2018b.

XIE, F. *et al.* *Comamonas phosphati* nov., sp. nov., isolated from a phosphate mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, p. 456–461, 2016.

XU, J. *et al.* A Quantum Mechanism Study of the C-C Bond Cleavage to Predict the Bio-Catalytic Polyethylene Degradation. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. March,

p. 1–7, 2019. Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00489/full>.

XU, Q. *et al.* *Acidovorax antarcticus* sp. nov., isolated from a soil sample of Collins Glacier front, Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 71, n. 3, 2019.

XU, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. **Industrial Biotechnology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 38–50, 2005. Disponível em:
<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2005.1.38>.

YIN, T.; COOK, D.; LAWRENCE, M. ggbio: an R package for extending the grammar of graphics for genomic data. **Genome Biology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. R77, 2012.

YOSHIDA, S. *et al.* A bacterium that degrades and assimilates poly(ethyleneterephthalate). **Research**, [s. l.], v. 351, n. 6278, p. 5, 2016. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/sci/351/6278/1196.full.pdf>.

YU, X.-Y. *et al.* *Comamonas zonglianii* sp. nov., isolated from phenol-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 61, n. 2, p. 255–258, 2011. Disponível em:
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.019612-0>.

ZAKARIA, M. R. *et al.* Improved Properties of Poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyvalerate) Produced by *Comamonas* sp. EB172 Utilizing Volatile Fatty Acids by Regulating the Nitrogen Source. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2013, 2013.

ZAKARIA, M. R. *et al.* Polyhydroxyalkanoate production from anaerobically treated palm oil mill effluent by new bacterial strain *Comamonas* sp. EB172. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 767–774, 2010.

ZAMPOLLI, J. *et al.* Transcriptomic analysis of *Rhodococcus opacus* R7 grown on polyethylene by RNA-seq. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 60, n. December 2021, p. 107991, 2022. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975022000878>.

ZHANG, N.; DING, M.; YUAN, Y. Current Advances in Biodegradation of Polyolefins. **Microorganisms**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 1537, 2022. Disponível em:
<https://www.mdpi.com/2076-2607/10/8/1537>.

ZHU, D. *et al.* Genomics and biochemistry investigation on the metabolic pathway of milled wood and alkali lignin-derived aromatic metabolites of *Comamonas serinivorans* SP-35. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 338, 2018. Disponível em:
<https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-018-1341-3>.

ZHU, B.; WANG, D.; WEI, N. Enzyme discovery and engineering for sustainable plastic recycling. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 22–37, 2022. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779921000408>.

7 – Apêndice

7.1. Apêndice A

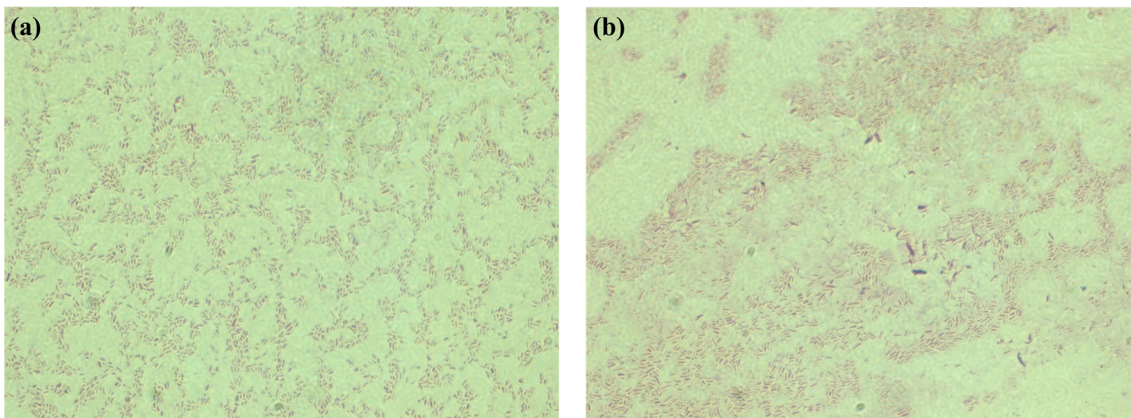


Figura S2.1. Fotomicrografias após coloração de Gram visualizadas no microscópio de luz. (a) Linhagem PE 63; (B) Linhagem ATCC 11996.

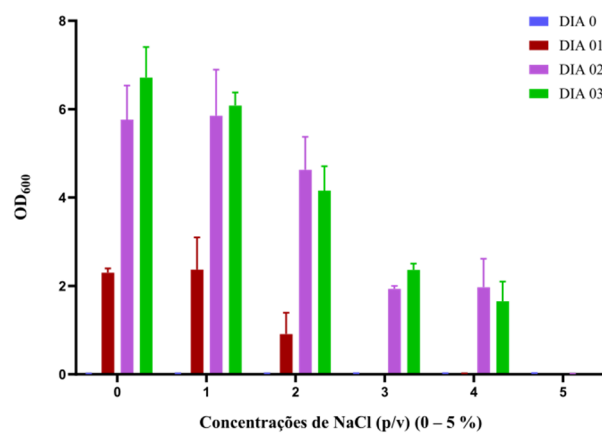


Figura S2.2. Gráfico do crescimento da linhagem PE 63 em diferentes concentrações de NaCl (entre 0 – 5 %).

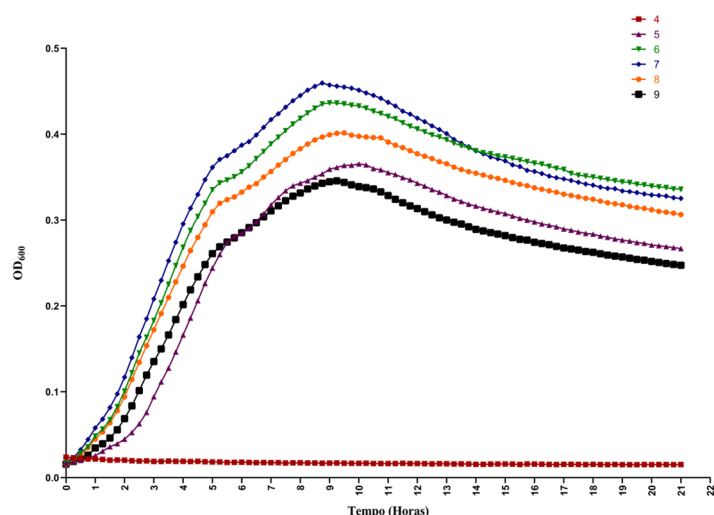


Figura S2.3. Gráfico do crescimento da linhagem PE 63 em diferentes pHs (4 a 9). O meio líquido NB foi ajustado com HCl ou NaOH para obtenção de diferentes pHs (pH entre 4 e 9). A densidade celular foi monitorada em intervalos de 30 – 30 minutos por 21 horas no espectrofotômetro SpectraMax M3 com *software* SoftMax Pro 6.0.

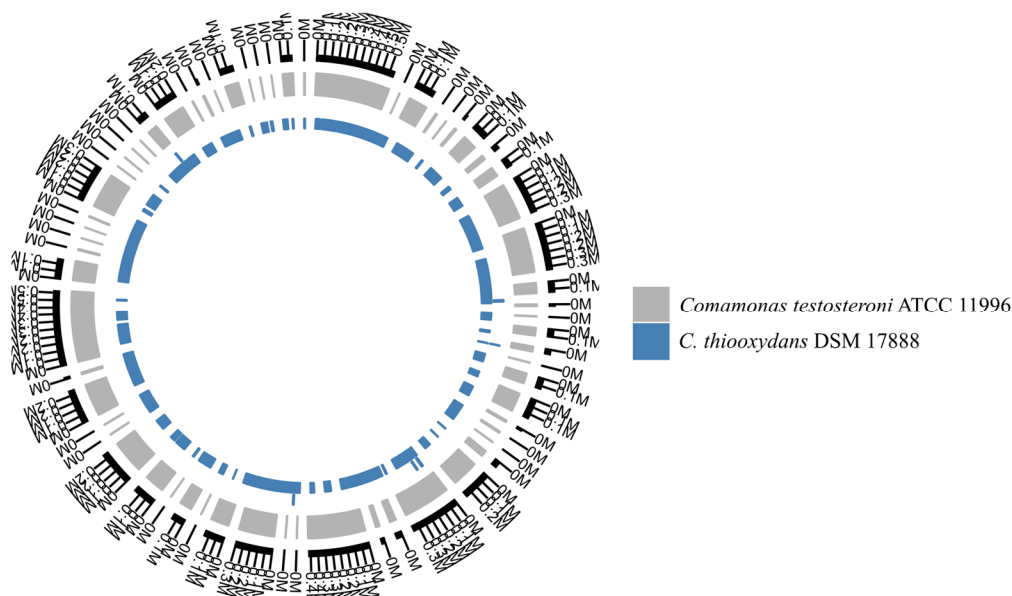


Figura S2.4. Visualização circular do alinhamento dos genomas da *C. testosteroni* ATCC 11996 (em cinza) e *C. thiooxydans* DSM 17888 (em azul). O alinhamento e a ilustração foram gerados usando o PlotNucmer. Apenas os blocos de alinhamento do genoma com pelo menos 1000 nucleotídeos e 90% de identidade são mostrados. A banda externa é a escala de tamanho dos *contigs*.

Sequência de gene da bcp_00857

>HFGMBDPB_00857 Peroxirredoxina Bcp

```
ATGGCGATCGTTGTCAACAAACCCCTTCCCGAATTTGAAGCCAACGCTACCG
GCGGGATCAAGGTGACCAACACCTCCCACACGGGCCAGATTCTGATCCTGTA
TTTCTACCCCAAGGACAATACGCCTGGCTGCACCACCGAAGCCATGCAGTTC
CGCGACAAGTACAAGGACTTCGTGAAAGCTGGCGCCACCGTGTTTGGCGTC
TCGCGCGACAACATGAAGTCGCACGACGACTTCAAGGAAAAGCTGGAAC TG
CCGTTTCGAGCTGATCGCCGATACGGAAGAGAAGATGTGCCACATGTTTCGGCG
TGGTCAAGAACAAGATCATGTACGGCAAGAAGGTGAAAGGCATCGAGCGCT
CCACCTTCCTGGTCGGAGCCGATGGCCTGCTGGTGCAGGAATGGCGCGGCCT
GAAGGTTCCCGGCCACGTTGACGAGGTGCTCAAGGCTGTCAAGACCCTGAA
GGCATTGAAGCAGGCTGCCTGA
```

Sequência de aminoácidos da bcp_00857

>HFGMBDPB_00857 Peroxiredoxin Bcp

```
MAIVVNKPLPEFEANATGGIKVTNTSHTGQILILYFYPKDNTPGCTTEAMQFRDK
YKDFVKAGATVFGVSRDNMKSHDDFKEKLELPELIADTEEKMCHMFGVVKN
KIMYGKKVKGIERSTFLVGADGLLVQEWRGLKVPGHVDEVLKAVKTLKALKQ
AA
```

7.3. Apêndice B

Artigo publicado em periódico:

Frederico, T. D., Peixoto, J., de Sousa, J. F., Vizzotto, C. S., Steindorff, A. S., Pinto, O. H. B., & Krüger, R. H. (2021). Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain PE591, a Polyethylene-Degrading Bacterium Isolated from Savanna Soil. *Microbiology Resource Announcements*, 10(32), 19–21. <https://doi.org/10.1128/mra.00490-21>



GENOME SEQUENCES



Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain PE591, a Polyethylene-Degrading Bacterium Isolated from Savanna Soil

Tayná Diniz Frederico,^a Julianna Peixoto,^a Jéssica Fernandes de Sousa,^a Carla Simone Vizzotto,^{a,b} Andrei Stecca Steindorff,^c Otávio Henrique Bezerra Pinto,^a Ricardo Henrique Krüger^a

^aEnzymology Laboratory, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil

^bDepartment of Civil and Environmental Engineering, University of Brasília, Brasília, Brazil

^cU.S. Department of Energy Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, USA

Tayná Diniz Frederico and Julianna Peixoto contributed equally to this work. Author order was determined by equal contribution on the DNA sequencing efforts and final data analysis.

ABSTRACT We report the genome sequence of a polyethylene-degrading bacterial strain identified as *Stenotrophomonas maltophilia* strain PE591, which was isolated from plastic debris found in savanna soil. The genome was assembled in 16 scaffolds with a length of 4,751,236 bp, a GC content of 66.5%, and 4,432 predicted genes.

Stenotrophomonas maltophilia strain PE591 was isolated from plastic debris found in the soil of the Brazilian Cerrado biome (1). The strain showed both metabolic activity and cellular viability after incubation with unpretreated polyethylene (PE) (molecular weight, 191,000) films as the sole carbon source for periods of up to 90 days (1). Moreover, *S. maltophilia* PE591 was capable of inducing significant physicochemical changes in PE after a 90-day incubation, revealing its great potential for plastic biodegradation processes (1). The *Stenotrophomonas* genus currently comprises 20 species, and its first species, *S. maltophilia*, was described in 1993 (2–4). *S. maltophilia* is a Gram-negative, obligate aerobic, rod-shaped, and motile bacterium that is considered to be an important human pathogen (5). *Stenotrophomonas* species are ubiquitous microorganisms that colonize multiple natural (e.g., soils and plants) and clinical environments (6, 7). In addition, *Stenotrophomonas* spp. may have resistance to different metals and antibiotics; therefore, they qualify as promising microorganisms for bioremediation applications (6).

S. maltophilia strain PE591 was grown in 5 ml of nutrient broth medium (Difco, Holland) and incubated for 24 h at 28°C with agitation (150 × g). Subsequently, cells were harvested by centrifugation at 5,500 × g for 5 min at 4°C. Bacterial DNA was purified using the GenElute bacterial genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, USA). A sequencing library was created using the MiSeq reagent kit (Illumina, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions, the MiSeq system user guide, revision L (part number 15027617; Illumina), was used in the sequencing protocol, and genome sequencing was performed with the Illumina MiSeq system (2 × 300-bp paired-end reads) (Macrogen, Seoul, South Korea). The resultant reads were subjected to quality analysis using FastQC software v. 0.11.3 (8). Sequence reads were *de novo* assembled following the A5-miseq pipeline, which includes Trimmomatic v. 0.35 to trim low-quality sequences (Phred scores of <20) and IDBA-UD v. 1.1.1 to assemble contigs (9–11). The package Stats from BBmap v. 38.76 was used to generate assembly statistics (12). The genome was annotated with Prokka v. 1.14.6 using the UniProt database (13). The completeness and contamination of genomic data were estimated by CheckM v. 1.0.13 (14). Coverage was assessed with SAMtools v. 1.9, Bowtie2 v. 2.3.4.1, and the package Pileup from BBmap v. 38.76 (12, 15, 16). Default parameters were used for all software unless otherwise noted. Finally, the

Citation Frederico TD, Peixoto J, de Sousa JF, Vizzotto CS, Steindorff AS, Pinto OHB, Krüger RH. 2021. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain PE591, a polyethylene-degrading bacterium isolated from savanna soil. *Microbiol Resour Announc* 10:e00490-21. <https://doi.org/10.1128/MRA.00490-21>.

Editor Frank J. Stewart, Montana State University

Copyright © 2021 Frederico et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Ricardo Henrique Krüger, kruger@unb.br.

Received 19 May 2021

Accepted 9 July 2021

Published 12 August 2021

Volume 10 Issue 32 e00490-21

mra.asm.org 1

Downloaded from <https://journals.asm.org/journal/mra> on 08 February 2023 by 2804.0159.89e9.2d00.2c2b.b467.8381.3f55.

Colaboração em artigos:

Pinto, O. H. B., Bornemann, T. L. V., Oliveira, R. S., Frederico, T. D., Quirino, B. F., Probst, A. J., de Freitas, M. A. M., Thompson, F. L., & Kruger, R. H. (2022). Plume Layer Influences the Amazon Reef Sponge Microbiome Primary Producers. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.867234>



Plume Layer Influences the Amazon Reef Sponge Microbiome Primary Producers

Otávio H. B. Pinto¹, Till L. V. Bornemann², Rafael S. Oliveira¹, Tayna D. Frederico¹, Betania F. Quirino³, Alexander J. Probst^{2,4}, Mayanne A. M. de Freitas⁵, Fabiano L. Thompson⁵ and Ricardo H. Kruger^{1*}

¹Laboratory of Enzymology, Institute of Biological Sciences, Department of Cell Biology, University of Brasília, Brasília, Brazil, ²Aquatic Microbial Ecology, Environmental Microbiology and Biotechnology, Department of Chemistry, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, ³Genetics and Biotechnology Laboratory, Embrapa-Agroenergy, Brasília, Brazil, ⁴Centre of Water and Environmental Research (ZWU), University of Duisburg-Essen, Essen, Germany, ⁵Department of Genetics, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Sébastien Duperron,
Muséum National d'Histoire Naturelle,
France

Reviewed by:

Cara Fiore,
Appalachian State University,
United States
Marie-Charlotte Cheutin,
Université de Montpellier,
CNRS, France

*Correspondence:

Ricardo H. Kruger
kruger@unb.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Marine Science

Received: 31 January 2022

Accepted: 13 April 2022

Published: 19 May 2022

Citation:

Pinto OHB, Bornemann TLV,
Oliveira RS, Frederico TD,
Quirino BF, Probst AJ,
de Freitas MAM, Thompson FL
and Kruger RH (2022) Plume Layer
Influences the Amazon Reef Sponge
Microbiome Primary Producers.
Front. Mar. Sci. 9:867234.
doi: 10.3389/fmars.2022.867234

Symbiotic relationships between corals and photosynthetic microorganisms sustain coral reef existence. However, the Great Amazon Reef System (GARS) stays under a plume layer that attenuates the entry of light, and instead of corals, sponges are the major reef epifauna, for which little is known about the function of the associated microbiome. Here, we used genome-resolved metagenomics to investigate how the sponge microbiome supports its host and overcomes the reduced light availability, recovering 205 MAGs from *Agelas* and *Geodia* sponges with completeness >70% and contamination <10%. Beta diversity estimates based on the 16S rRNA genes indicated the microbiomes of Amazon and Caribbean sponges to be distinct ($P < 0.01$), with heterotrophic lifestyles being prevalent in Amazon sponge microbiomes ($P < 0.05$). Nevertheless, genes indicating the carbon fixation pathways 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate cycle, 3-Hydroxypropionate bicycle, Reductive Tricarboxylic Acid Cycle, and Calvin-Benson-Bassham cycle could be recovered in low abundance. The presence of Cyanobacteria, represented by both 16S rRNA analyses and low-quality MAGs indicated light incidence on the reef. The metabolic profile shows that the GARS sponge microbiome had genes for sulfate reduction, sulfur oxidation, nitric oxide reduction, ammonia oxidation, nitrate reduction, nitrite ammonification, nitrite oxidation, and nitrite reduction, indicating that the microbiome might play a role in detoxification of the holobiont. We conclude, that neither the plume-limited photosynthesis of the sponge microbiome nor the primary producers sustain the organic carbon input for the sponges, which likely live off plume-associated organic carbon and their heterotrophic microbiota.

Keywords: Carbon fixation, Host-associated, Metagenome-assembled genomes (MAGs), Sponge microbiome, the Great Amazon Reef System (GARS)

1 **Impact of *Paenibacillus elgii* supernatant on screening bacterial strains with potential**
2 **for biotechnological applications**

3 Cunha-Ferreira, I.C.^{1†}, Vizzotto, C.S.^{2†}, Frederico, T.D.¹, Peixoto, J.¹, Tótola, M.R.³ and
4 Krüger, R.H.^{1*}

5
6 ¹Laboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília (UNB),
7 Brasília, Brazil.

8 ²Laboratory of Environmental Sanitation, Department of Civil and Environmental
9 Engineering, University of Brasília (UNB), Brasília, Brazil.

10 ³Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, Universidade Federal
11 de Viçosa(UFV), Viçosa, Brazil.

12
13 *Corresponding author: kruger@unb.br

14 [†]Equally contributing authors

15
16 **Abstract**

17 The biotechnological industry faces a crucial demand for novel bioactive compounds –
18 particularly antimicrobial agents – to address the rising challenge of bacterial resistance to
19 current available antibiotics. Traditional cultivation strategies for cultivating natural occurring
20 microorganisms often limit the discovery of novel antimicrobial producers. Thus, this study
21 presents a protocol for the targeted selection of bacterial strains using *Paenibacillus elgii*
22 supernatants, which are abundant in signal molecules and antimicrobial peptides. Soil samples
23 were inoculated in these enriched culture media aimed to selectively cultivate bacteria
24 resistant to the supernatant, indicating their potential to produce similar compounds. The
25 bacterial strains isolated through this method were assessed for their antibacterial activity. In
26 addition, the functional annotation of the genome of one of these strains revealed several gene
27 clusters of biotechnological interest. This study remarks the effectiveness of using this
28 approach for the selective cultivation of microorganisms with substantial potential for
29 biotechnological applications.

30
31 **Keywords:** prospecting, supernatant, antibacterial activity

32
33 **1. Introduction**

Participação em eventos científicos:



Frederico Tainá
successfully completed 40 hs course

Introduction to Metagenomics
December 2-6, 2019

Dr Cath Brooksbank
Head of Training, EMBL-EBI

EMBL-EBI GCRF



8 – Anexo

Anexo A

Metodologia complementar:

a) Estoque TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M (pH 8)	100 mL
Completar para 1000 mL com H ₂ O destilada	

b) Protocolo de Lowry

Soluções para o protocolo de Lowry

- 1 % de Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O)
- 2 % de Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado (KNaC₄H₄O₆.4H₂O)
- 2 % de Carbonato de sódio (Na₂CO₃)
- 1M de Hidróxido de sódio (NaOH)
- Solução de Folin: Folin-Ciocalteu diluído na proporção de ½ em água miliq.

Reagente A: 200 µL CuSO₄.5H₂O 1% + 200 µL KNaC₄H₄O₆.4H₂O) 2%, completar para 20 mL com 2 % de Carbonato de sódio.

Adicionar a 120 µL de amostra 80 µL de NaOH 1 M e homogeneizar. Em seguida, adicionar 800 µL de reagente A e 100 µL de solução de Folin e homogeneizar. Incubar em temperatura ambiente por 30 min e analisar a 650nm no espectrofotômetro. O experimento foi realizando no escuro.