



**Universidade de Brasília**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular**

**Dissertação de Mestrado**

**POTENCIAL E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA BIOCONVERSÃO DE  
POLIAMIDA PELA BACTÉRIA *Alcaligenes* sp.**

**MARIANA PORTUGAL MATTIOLI**

**Brasília, DF**

**2025**

MARIANA PORTUGAL MATTIOLI

**POTENCIAL E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA BIOCONVERSÃO DE  
POLIAMIDA PELA BACTÉRIA *Alcaligenes* sp.**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação de  
Biologia Molecular do Departamento  
de Biologia Celular, Instituto de  
Biologia, Universidade de Brasília,  
para a obtenção do título de Mestre  
em Biologia Molecular

**Orientador:**  
Dr. Ricardo Henrique Krüger

**Brasília, DF**  
**2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Mattioli, P. M.**

**Potencial e Aplicações Biotecnológicas da Bioconversão de Poliamida pela Bactéria *Alcaligenes sp.***

Mariana Portugal Mattioli

**Brasília, 2025**

Número de Páginas: 75

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, DF

- I. Palavras chave: *biodegradação, nylon, bioplástico, caprolactama, butanoato.*
- II. Universidade de Brasília. PPG/BioMol
- III. Potencial e aplicações biotecnológicas da bioconversão de poliamida pela bactéria *Alcaligenes sp.*

*Tomei a liberdade de fazer desta dedicatória os meus agradecimentos. Neste pequeno espaço, gostaria de expressar minha imensa gratidão a todos que caminharam comigo nesta jornada: aos que sempre estiveram presentes, aos que me acompanharam desde o início, aos que apareceram ao longo do caminho e aos que ficaram, mesmo que por um breve período*

*Sem vocês não seria possível.  
Muito obrigada.*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b><i>Introdução Geral</i></b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b><i>Justificativa</i></b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b><i>Objetivos</i></b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b><i>Revisão de Literatura</i></b>	<b>21</b>
<b>4.1</b>	<b>A crise global do plástico e o papel da poliamida</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>Degradação e biodegradação de poliamida</b>	<b>22</b>
<b>4.3</b>	<b>Produção de Polihidroxialcanoatos e bioconversão de poliamida</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>O Potencial biotecnológico do gênero <i>Alcaligenes</i></b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b><i>Materiais e Métodos</i></b>	<b>30</b>
<b>5.1</b>	<b>Isolamento e cultivo da bactéria <i>Alcaligenes</i> sp. PE 187</b>	<b>30</b>
5.1.1	Isolamento de <i>Alcaligenes</i> sp. PE 187	30
5.1.2	Condições gerais de cultivo	31
<b>5.2</b>	<b>Caracterização morfológica da <i>Alcaligenes</i> sp. PE 187</b>	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA</b>	<b>32</b>
<b>5.4</b>	<b>Análises Genômicas</b>	<b>33</b>
5.4.1	Sequenciamento, montagem e anotação do Genoma	33
5.4.2	Classificação taxonômica da linhagem com base na hibridização digital de DNA e identidade média de nucleotídeos	35
5.4.3	Análise filogenômica	35
5.4.4	Caracterização fenotípica in silico	36
5.4.5	Análise comparativa de pangenoma	37
5.4.6	Predição de genes homólogos associados à degradação de poliamida e produção de PHAs	37
5.4.7	Anotação funcional e predição de vias metabólicas associadas a degradação de PA e produção de polihidroxialcanoatos	38
<b>5.5</b>	<b>Avaliação do potencial de biodegradação da poliamida por <i>Alcaligenes</i> sp. PE 187</b>	<b>38</b>
5.5.1	Determinação das condições ótimas de pH e temperatura	38
5.5.2	Limpeza das vidrarias	40
5.5.3	Desinfecção dos filmes de poliamida	40

5.5.4	Cultivo em meio mínimo mineral com filmes de poliamida	41
5.5.5	Viabilidade e adesão bacteriana aos filmes de PA	41
5.5.6	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	42
<b>6</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>43</b>
<b>6.1</b>	<b>Isolamento e caracterização da <i>Alcaligenes</i> sp. PE 187</b>	<b>43</b>
<b>6.2</b>	<b>Análises Genômicas</b>	<b>46</b>
6.2.1	Qualidade e montagem do genoma	46
6.2.2	Análise filogenômica da <i>Alcaligenes</i> sp. PE 187	48
6.2.3	Análise do Pangenoma	50
6.2.4	Caracterização Fenotípica in Silico	53
6.2.5	Predição de genes homólogos associados à degradação de poliamida e síntese de polihidroxialcanoatos	56
6.2.6	Anotação Funcional e Predição de Vias Metabólicas	59
<b>6.3</b>	<b>Avaliação do potencial de biodegradação da PA por <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187</b>	<b>63</b>
6.3.1	Cultivo de <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187 em meio mínimo mineral contendo filmes de poliamida	68
<b>7</b>	<b>Conclusão e perspectivas</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Colônias de *Alcaligenes* sp. PE 187 cultivadas em meio NA (esquerda) e brilho iridescente das colônias sob iluminação direta (direita)..... 43
- Figura 2.** Micrografia obtida por MEV de *Alcaligenes* sp. PE 187, evidenciando células com morfologia bacilar, extremidades arredondadas e dimensões aproximadas de 0,5–1,0  $\mu\text{m}$  de largura por 1,0–3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento. .... 44
- Figura 3.** Cladograma de similaridade baseado na sequência do gene 16S rRNA da *Alcaligenes* sp. PE 187 em contraste a outras estirpes do gênero *Alcaligenes*. A relação evolutiva foi inferida pelo método de máxima verossimilhança (ML) com 1000 repetições de *bootstrap*..... 45
- Figura 4.** Mapa genômico circular de *A. faecalis* PE 187. Os anéis externos representam as CDS distribuídas nas fitas positiva e negativa do DNA, seguidos pela distribuição dos genes de tRNA, rRNA e tmRNA. O gráfico de variação do conteúdo GC (anéis pretos) e do viés de GC Skew (anéis verdes e roxos) auxilia na identificação de regiões relacionadas à replicação e organização genômica. .... 47
- Figura 5.** Cladograma de similaridade baseado na análise filogenômica de *Alcaligenes faecalis* PE 187 e linhagens correlatas. O cladograma foi construído utilizando genes conservados entre as cepas analisadas. Os valores de *bootstrap* indicam o suporte estatístico para cada agrupamento. A cepa PE 187 se agrupa em um clado bem definido junto a outras linhagens de referência de *A. faecalis*, enquanto espécies proximamente relacionadas, como *A. pakistanensis* e *A. endophyticus*, formam agrupamentos distintos. O gênero *Escherichia* foi utilizado como grupo externo para o enraizamento da árvore..... 49
- Figura 6.** Distribuição do pangenoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 e outras duas linhagens. Os gráficos de pizza representam a proporção de *persistent genes* ou *core genes* (azul), *shell genes* (laranja) e *cloud genes* (verde), evidenciando a estabilidade genômica da linhagem PE 187 em comparação com as demais..... 51
- Figura 7.** Matriz de presença e ausência de genes no pangenoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 e linhagens correlatas. A matriz hierárquica exibe a distribuição dos genes em core, shell e cloud genomes, demonstrando a similaridade genômica entre as linhagens analisadas ..... 52

<b>Figura 8.</b> Mapa de predição fenotípica in silico de <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187. A matriz de calor exibe as diferenças entre os modelos Phypat e Phypat+PGL, permitindo a visualização de fenótipos compartilhados e variações entre linhagens correlatas.....	55
<b>Figura 9</b> Reconstrução da via de degradação da caprolactama identificada em <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187. As enzimas destacadas em verde (EC) correspondem a funções enzimáticas completamente identificadas no genoma. As enzimas em vermelho indicam funções parcialmente identificadas, enquanto aquelas em branco representam etapas da via não identificadas no genoma da cepa. ....	61
<b>Figura 10.</b> Reconstrução da via metabólica do butanoato em <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187. Em verde estão indicadas as funções enzimáticas completas identificadas no genoma da linhagem estudada; em azul, as funções enzimáticas incompletas e em branco as funções enzimáticas não identificadas. As rotas metabólicas destacadas mostram a conversão de intermediários, como acetil-CoA e acetoacetil-CoA, envolvidos diretamente na biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHAs).....	63
<b>Figura 11.</b> Taxa de crescimento específica média de <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187 em diferentes condições experimentais. ....	64
<b>Figura 12.</b> Tempo de duplicação de <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187 em diferentes condições experimentais. ....	65
<b>Figura 13.</b> Coeficiente de variação da taxa de crescimento específica de <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187 em diferentes condições experimentais. Valores elevados de CV% indicam maior dispersão dos dados entre as replicatas, enquanto valores mais baixos sugerem maior reproduzibilidade dos experimentos. ....	66
<b>Figura 14.</b> Dispersão de Temperatura vs. Taxa de Crescimento Específica ( $\mu$ ) para <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187. Cada ponto representa uma combinação específica de temperatura e pH testada. A cor dos círculos indica o pH da condição experimental, de acordo com a barra de cores lateral (5.0 a 8.0). O tamanho dos círculos é proporcional ao tempo de duplicação (td), sendo círculos maiores associados a tempos de duplicação mais longos. Os maiores valores de $\mu$ foram observados em temperaturas próximas de 30°C e pH 8, enquanto as menores	

taxas de crescimento estão concentradas em temperaturas mais baixas (26°C).  
..... 67

**Figura 15.** Viabilidade celular de *Alcaligenes* sp. após 90 dias de cultivo em MMM contendo um filme de poliamida como única fonte de carbono. As micrografias de fluorescência das células coradas com os fluoróforos SYTO9® e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD baclight bacterial viability kit, Invitrogen, USA) representam as células vivas em verde (+) e as mortas em vermelho(-). ..... 68

**Figura 16.** Viabilidade celular de *Alcaligenes* sp. após 30 dias de cultivo em MMM com lâmina de vidro. As micrografias de fluorescência das células coradas com os fluoróforos SYTO9® e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD baclight bacterial viability kit, Invitrogen, USA) representam as células vivas em verde (+) e as mortas em vermelho(-). ..... 69

**Figura 17.** Espectro de infravermelho (ATR-FTIR) dos filmes de poliamida incubados por 90 dias com *Alcaligenes* sp. (azul, verde e magenta) em contraste ao filme controle não-tratado (vermelho). Os três espectros dos filmes tratados apresentam os resultados para cada uma das triplicatas biológicas analisadas.70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Reagentes constituintes do meio de cultura mínimo mineral (MMM) e suas concentrações. ....	41
<b>Tabela 2:</b> Genes homólogos identificados no genoma de <i>Alcaligenes faecalis</i> PE 187 relacionados à degradação de poliamida (nylA, nylB) e biossíntese de polihidroxialcanoatos (phaA, phaB, phaC, phaR, phaZ), com respectivos valores de E-value, Bit Score e função prevista. Referências bibliográficas que embasam as funções previstas estão indicadas entre parênteses. ....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>6-ACA</b>	6-aminocaproato
<b>HCA</b>	-Ácido 6-hidroxicapróico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATR-FTIR</b>	Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared
<b>BAM</b>	Binary Alignment/Map format
<b>BUSCO</b>	Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs
<b>CLO</b>	caprolactona
<b>CLA</b>	caprolactama
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>dddH</b>	digital DNA-DNA Hybridization
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos trifosfatados
<b>DSMZ</b>	Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FastQC</b>	Fast Quality Control
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GBDP</b>	Genome BLAST Distance Phylogeny
<b>GC</b>	Guanina e Citosina
<b>GGDC</b>	Genome-to-Genome Distance Calculator
<b>HiFi</b>	High Fidelity Reads
<b>HMMER</b>	Hidden Markov Model
<b>HSPs</b>	High-scoring pairs
<b>JTT</b>	Jones-Taylor-Thornton
<b>K2P</b>	Kimura 2-parameter
<b>MAFFT</b>	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform
<b>Mbp</b>	Mega pares de bases
<b>MEGA</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
<b>ML</b>	Máxima verossimilhança
<b>NylA</b>	6-aminohexanoato-cíclico-dímero hidrolase
<b>NylB</b>	6-aminohexanoato linear-oligômero hidrolase
<b>NylC</b>	6-aminohexanoato-hidrolase
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>PA</b>	Poliamida

<b>PA6</b>	Poliamida 6
<b>PA66</b>	Poliamida 66
<b>PacBio</b>	Pacific Biosciences
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>Pfam</b>	Protein Families Database
<b>PHAs</b>	Polihidroxialcanoatos
<b>PGL</b>	Phylogenetic Gain/Loss
<b>PPA</b>	Poliftalamidas
<b>QUAST</b>	Quality Assessment Tool for Genome Assemblies
<b>rRNA</b>	RNA Ribossomal
<b>SAM</b>	Sequence Alignment/Map format
<b>TBE</b>	Tampão Tris-Borato-EDTA (Tris-Borate-EDTA Buffer)
<b>TYGS</b>	Type (Strain) Genome Server

## RESUMO

A poliamida (PA) é um polímero sintético amplamente utilizado em diversos setores industriais devido à sua resistência térmica e mecânica. No entanto, sua baixa biodegradabilidade e dificuldade de reciclagem fazem com que seu descarte, usualmente inadequado, contribua significativamente para a crise ambiental dos plásticos. Diante desse cenário, a biodegradação de PA por microrganismos surge como uma alternativa promissora para a remediação ambiental. Este estudo investiga, através de análise genômica e experimental, o potencial biotecnológico de *Alcaligenes* sp. PE 187 na degradação da PA e, através apenas de análise genômica, o potencial para conversão de seus subprodutos em polihidroxialcanoatos (PHAs), biopolímeros de interesse industrial.

A estirpe bacteriana utilizada nesse estudo foi isolada por Peixoto (2013) a partir de resíduos plásticos coletados em solos do Cerrado brasileiro e caracterizada como *Alcaligenes* sp. PE 187. O sequenciamento e a análise genômica foram realizados para identificar genes envolvidos na degradação da PA e na biossíntese de PHAs. Adicionalmente, o microrganismo foi cultivado em meio mínimo mineral contendo PA como única fonte de carbono para avaliar a adesão microbiana e a viabilidade celular após 90 dias de cultivo. As modificações químicas nos filmes de PA utilizados nas culturas foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR) para verificar possíveis modificações químicas associadas à biodegradação.

A análise genômica revelou que o genoma completo da *Alcaligenes* sp. PE 187 possui 3.798 genes codificadores de proteínas, e um repertório metabólico possivelmente associado à degradação de poliamida. Foram identificados genes relacionados a funções enzimáticas completas e parciais da via metabólica da caprolactama, principal via a degradação de PA. Também foram identificados genes homólogos ao 6-aminohexanoato-cíclico-dímero hidrolase (*nylA*) e 6-aminohexanoato linear-oligômero hidrolase (*nylB*), relacionados a degradação inicial do polímero de poliamida à oligômeros e monômeros.

Os resultados dos ensaios experimentais corroboraram os achados genômicos e indicam a capacidade de *Alcaligenes* sp. PE 187 de biodegradar a poliamida e colonizar a superfície desta, apresentando viabilidade celular mesmo

após 90 dias de cultivo. A análise por ATR-FTIR indicou degradação parcial do polímero, com redução de bandas características das ligações amida e surgimento de novos grupos funcionais, como nitrilas e isocianatos. Em relação ao potencial para biossíntese de PHAs, foram identificados genes homólogos relacionados ao *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaZ* e *phaR*. Esses achados sugerem que a bactéria pode converter subprodutos da degradação da PA em biopolímeros sustentáveis.

Os resultados obtidos demonstram o potencial biotecnológico dessa estirpe na biodegradação da PA e na bioconversão de seus derivados em PHAs, possibilitando futuras aplicações na remediação ambiental e na produção de bioplásticos sustentáveis. Estudos futuros podem explorar a expressão e caracterização de enzimas envolvidas na degradação da PA, a otimização das condições ambientais para aprimorar a biodegradação e a engenharia metabólica para maximizar a produção de PHAs.

**Palavras-chave:** *biodegradação, nylon, bioplástico, caprolactama, butanoato, poliamida.*

## ABSTRACT

Polyamide (PA) is a synthetic polymer widely used in various industrial sectors due to its thermal and mechanical properties. However, its low degradability and recycling challenges make its improper disposal a significant contributor to the plastic environmental crisis. Given this scenario, the biodegradation of PA emerges as a promising alternative for environmental remediation. This study investigates the biotechnological potential of *Alcaligenes* sp. PE 187 in PA biodegradation and the conversion of its byproducts into polyhydroxyalkanoates (PHAs), biodegradable biopolymers of industrial interest.

The bacterial strain used in this study was isolated from plastic waste collected from soils of the Brazilian Cerrado and identified as *Alcaligenes* sp. PE 187. Genome sequencing and analysis were performed to identify genes involved in PA degradation and PHA biosynthesis. Additionally, the microorganism was cultivated in a minimal mineral medium containing PA as the sole carbon source to evaluate microbial adhesion and cell viability after 90 days of incubation. Chemical modifications in the PA films exposed to the cultures were analyzed by infrared spectroscopy (ATR-FTIR) to investigate the potential chemical changes associated with biodegradation.

Genomic analysis revealed that the complete genome of *Alcaligenes* sp. contains 3,798 protein-coding genes, as well as a metabolic repertoire associated with polyamide degradation, including caprolactam degradation pathways and homologous genes to *6-aminohexanoate-cyclic-dimer hydrolase (nylA)* and *6-aminohexanoate-linear-oligomer hydrolase (nylB)*. Genes related to PHA biosynthesis were also identified, suggesting the ability of this bacterial strain in converting PA into sustainable biopolymers. Experimental assays corroborated the genomic findings, indicating the ability of *Alcaligenes* sp. PE 187 to biodegrade PA and colonize its surface, maintaining cell viability even after 90 days of cultivation. ATR-FTIR analysis indicated partial polymer degradation, showing a reduction in amide bond absorption bands and the emergence of new functional groups such as nitriles and isocyanates.

The results demonstrate the biotechnological potential of *Alcaligenes* sp. PE 187 in PA biodegradation and its bioconversion into PHAs, enabling future applications in environmental remediation and sustainable bioplastic production.

**Keywords:** *Biodegradation, nylon, bioplastic, caprolactam, butyrate, polyamide.*

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A poluição causada pelo descarte inadequado de plásticos sintéticos representa um dos principais desafios ambientais da atualidade. Entre os polímeros amplamente utilizados, a poliamida (PA), conhecida comercialmente como nylon, destaca-se devido à sua alta resistência mecânica e térmica, sendo aplicada em diversos setores industriais, como automotivo, têxtil e embalagens técnicas (McKenn, 2016). Entretanto, sua durabilidade também dificulta sua degradação natural, contribuindo para sua acumulação no meio ambiente. Apenas cerca de 20% da PA produzida globalmente é reciclada, sendo que a maior parte acaba descartada em aterros ou dispersa na natureza (Zheng *et al.*, 2024).

Os métodos convencionais de reciclagem mecânica e química da poliamida enfrentam desafios como custos elevados, perda de propriedades mecânicas e produção de resíduos tóxicos (Yap *et al.*, 2024; Zheng *et al.*, 2024). Diante dessas limitações, estratégias biotecnológicas surgem como alternativas promissoras para a degradação e reutilização sustentável desse polímero. A biodegradação microbiana, mediada por enzimas especializadas, tem sido estudada como uma solução inovadora para o processamento de PA. Entre as enzimas envolvidas, destacam-se NylA, NylB e endohidrolase do oligômero de 6-aminohexanoato (NylC), identificadas em microrganismos capazes de degradar poliamida, como bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Flavobacterium* (Negoro, 2021). Essas enzimas atuam de forma sinérgica e estão relacionadas, respectivamente, à clivagem de ciclodímeros de 6-aminohexanoato, à quebra de ligações internas de oligômeros lineares e à remoção de resíduos monoméricos das extremidades desses oligômeros (Negoro, 2000).

Além da degradação da PA, uma abordagem inovadora consiste na sua bioconversão em biopolímeros sustentáveis, como os polihidroxialcanoatos (PHAs). Os PHAs são poliésteres microbianos biodegradáveis, cuja biossíntese ocorre através de vias metabólicas específicas, permitindo que microrganismos utilizem resíduos plásticos como fonte de carbono para a sua produção (Winnacker, 2019).

Embora a conversão direta da PA em PHAs não tenha sido descrita em *Alcaligenes*, estirpes deste gênero já foram descritas pela sua capacidade de produzir biopolímeros e estudos recentes sugerem seu potencial para degradar PA. Isso as posiciona como potenciais bactérias capazes de expressar o aparato metabólico necessário para a bioconversão de PA em PHA (Oulidi *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2023).

Neste contexto, este estudo investiga, através de análise genômica e experimental, o potencial biotecnológico de *Alcaligenes* sp. PE 187 na degradação da PA e, através apenas de análise genômica, o potencial para conversão de seus subprodutos em PHAs, biopolímeros de interesse industrial. Para isso, foram realizadas análises morfológicas, genômicas e experimentais para caracterizar o potencial metabólico dessa estirpe. A identificação de genes relacionados à degradação de PA e à biossíntese de PHAs, aliada à avaliação experimental da biodegradação desse polímero sintético, poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de reciclagem biológica, promovendo a valorização de resíduos plásticos por meio de sua conversão em biopolímeros de alto valor agregado.

## 2 JUSTIFICATIVA

A crescente produção e descarte inadequado de plásticos sintéticos representam um desafio ambiental significativo, principalmente devido à sua persistência no meio ambiente e baixa taxa de reciclagem (McKeenn, 2016; Zheng *et al.*, 2024). A poliamida (PA), amplamente utilizada nas indústrias automotiva, têxtil e de embalagens, é um dos polímeros mais resistentes à degradação, acumulando-se nos ecossistemas e contribuindo para a crise global dos resíduos plásticos (Zheng *et al.*, 2024)). Os métodos convencionais de reciclagem mecânica e química apresentam limitações econômicas e ambientais, reforçando a necessidade de soluções sustentáveis para a degradação desse material (Yap *et al.*, 2024).

Diante desse cenário, a biodegradação da poliamida por microrganismos surge como uma alternativa promissora para a mitigação do impacto ambiental causado pela má gestão desses resíduos (Carniel *et al.*, 2024). No entanto, os mecanismos biológicos envolvidos na degradação da poliamida ainda são pouco compreendidos, apresentando um número limitado de microrganismos descritos como potenciais biodegradadores desse polímero (Saito *et al.*, 2024; Sasanami *et al.*, 2022). O gênero *Alcaligenes*, conhecido por sua versatilidade metabólica e capacidade de bioconversão de compostos orgânicos complexos, apresenta características que podem viabilizar a degradação da poliamida e a conversão de seus derivados em biopolímeros de interesse industrial, como os PHAs (Yajima *et al.*, 2020).

Assim, torna-se fundamental a expansão do conhecimento sobre os mecanismos moleculares e metabólicos envolvidos na degradação da PA, bem como a busca por alternativas biotecnológicas para a conversão de resíduos plásticos em produtos de alto valor agregado. A caracterização genômica e funcional da estirpe *Alcaligenes sp.* PE 187 permitirá a identificação de genes e vias metabólicas associadas a esse processo, fornecendo informações essenciais para o desenvolvimento de estratégias inovadoras de biorremediação e produção sustentável de biopolímeros.

Além disso, a avaliação experimental da adesão bacteriana e das alterações químicas nos filmes de PA fornecerá evidências da efetividade desse microrganismo no tratamento biotecnológico de resíduos plásticos. Dessa forma,

este estudo tem potencial de contribuir para o avanço do conhecimento científico na área da biodegradação de plásticos e de fundamentar futuras aplicações industriais voltadas para a economia circular e a redução do impacto ambiental causado pelo descarte de poliamidas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem o objetivo de investigar e caracterizar o potencial biotecnológico da bactéria *Alcaligenes* sp. PE 187 na bioconversão da poliamida, a fim de compreender os mecanismos envolvidos na degradação do polímero e na produção de biopolímeros de interesse industrial.

#### 3.2 Objetivos específicos

- i. Analisar e caracterizar o genoma da estirpe bacteriana *Alcaligenes* sp. PE 187;
- ii. Identificar genes e vias metabólicas associadas à degradação da poliamida e à conversão de seus derivados em biopolímeros.
- iii. Determinar as condições ótimas de pH e temperatura para o crescimento de *Alcaligenes* sp. PE 187;
- iv. Avaliar a viabilidade celular de *Alcaligenes* sp. PE 187 em meio mínimo contendo poliamida ao longo de 90 dias de cultivo.
- v. Investigar a adesão bacteriana aos filmes de poliamida e a correlação desta com a degradação do polímero.
- vi. Avaliar a modificação química induzida por *Alcaligenes* sp. PE 187 nos filmes de poliamida.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 A crise global do plástico e o papel da poliamida

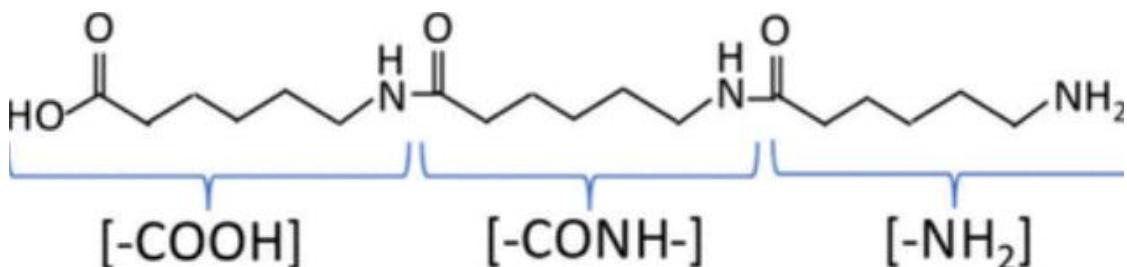
Os polímeros sintéticos (i.e. plásticos) são polímeros derivados de fontes petroquímicas, indispensáveis na sociedade moderna e amplamente utilizados devido à sua versatilidade, resistência e durabilidade. Entre eles, a poliamida (PA), conhecida comercialmente como *nylon*, destaca-se por sua alta resistência mecânica e térmica, sendo essencial nos setores automotivo, têxtil e de embalagens técnicas. Seu desenvolvimento data do início do século XX, com a revolução dos polímeros industriais (McKeenn, 2016). Atualmente, a PA está entre os principais plásticos produzidos globalmente, ao lado do polietileno (PE), polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET), policloreto de vinila (PVC) e poliestireno (PS), cada um com aplicações específicas (Witt *et al.*, 2025).

A poliamida é um material valorizado por suas propriedades mecânicas e térmicas, com produção global estimada em 8 milhões de toneladas em 2024 (Statistica, 2025). Porém, quando se trata de reciclagem, reaproveitamento e descarte esse polímero representa um verdadeiro desafio. Devido às suas características físico-químicas, os métodos convencionais de reciclagem mecânica e química são limitados devido às perdas de propriedades promovidas no material, altos custos e produção de compostos tóxicos (Yap *et al.*, 2024). Além disso, é comum que as formulações comerciais incluam aditivos e reforços estruturais à sua composição o que torna o processo de reciclagem ainda mais complexo. Como consequência, grande parte desse material é descartada em aterros sanitários, incinerada ou dispersa no meio ambiente, onde se mantém por longos períodos (McKeen, 2016). Em contraste a polímeros como o PE e o PP, que podem sofrer degradação por foto-oxidação e outros processos abióticos, a PA mantém sua integridade estrutural por décadas ou até séculos, especialmente em condições anaeróbicas, como as encontradas em aterros sanitários (Zheng *et al.*, 2024)

Nesse contexto, a busca por soluções sustentáveis para a degradação da PA torna-se urgente. Avanços recentes exploram métodos biotecnológicos, como a biodegradação mediada por microrganismos e enzimas especializadas, que oferecem alternativas promissoras para reduzir o impacto ambiental da poliamida e de outros polímeros sintéticos.

## 4.2 Degradação e biodegradação de poliamida

A PA é um polímero sintético caracterizado pela presença de ligações amida (-CONH-) ao longo de sua cadeia molecular, formadas pela reação entre grupos carboxila (-COOH) e amina (-NH<sub>2</sub>) (Figura 1). Essas ligações conferem alta estabilidade térmica e resistência mecânica ao material (Zheng *et al.*, 2024). A PA é classificada como um polímero semicristalino, contendo tanto regiões cristalinas, onde suas cadeias estão ordenadas, quanto regiões amorfas, caracterizadas por desorganização molecular. Sua alta cristalinidade reduz a mobilidade das cadeias poliméricas, tornando sua degradação desafiadora (Felder *et al.*, 2020). Além disso, as fortes interações intermoleculares, mediadas por pontes de hidrogênio entre os grupos amida, reforçam sua estabilidade estrutural e dificultam sua decomposição em ambientes naturais (Li *et al.*, 2022).

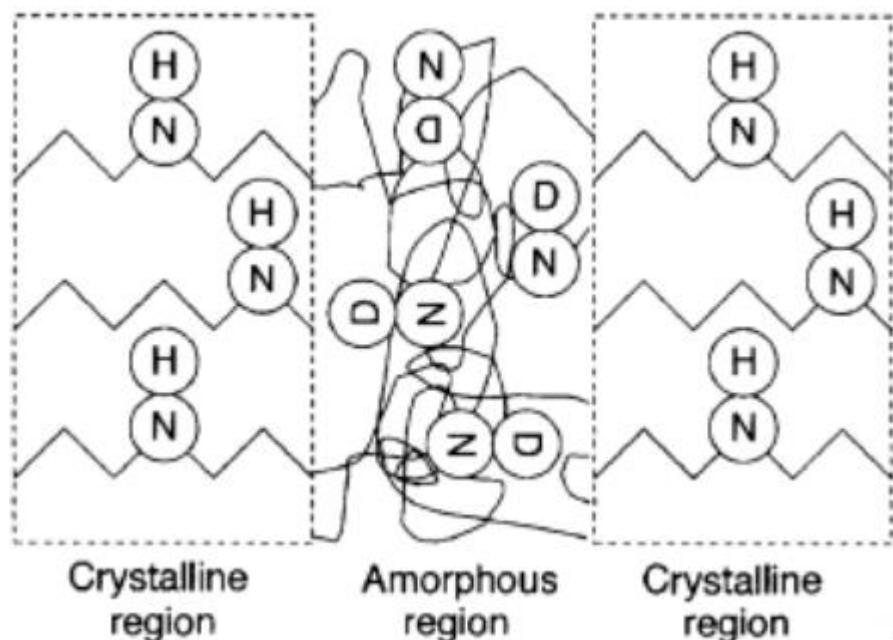


**Figura 1** Representação estrutural da unidade repetitiva da poliamida (PA), evidenciando os principais grupos funcionais: carboxila (-COOH), amida (-CONH-) e amina (-NH<sub>2</sub>). As ligações amida, formadas pela condensação entre grupos -COOH e -NH<sub>2</sub>, são responsáveis pela alta estabilidade térmica, resistência mecânica e dificuldade de degradação do polímero (Zheng *et al.*, 2024).

As poliamidas podem ser alifáticas, semiaromáticas ou aromáticas. Essas diferenças estruturais influenciam diretamente seu comportamento frente à degradação. As alifáticas, como PA6 e PA66, possuem segmentos de hidrocarbonetos lineares intercalados com grupos amida, conferindo-lhes alta cristalinidade e elevada formação de pontes de hidrogênio. As poliamidas, de modo geral, são classificadas como polímeros semicristalinos, ou seja, apresentam tanto regiões cristalinas quanto regiões amorfas ao longo de sua estrutura (Figura 2). As regiões cristalinas, compostas por cadeias poliméricas altamente ordenadas e compactadas, conferem ao material maior resistência mecânica, rigidez e baixa permeabilidade. Por outro lado, as regiões amorfas,

caracterizadas por desorganização molecular, são mais acessíveis à penetração de agentes químicos e enzimáticos, tornando-se os principais alvos iniciais nos processos de degradação. Assim, a proporção entre essas regiões afeta diretamente a suscetibilidade da PA à biodegradação (Felder *et al.*, 2020).

Apesar disso, as poliamidas alifáticas são relativamente mais suscetíveis à hidrólise, o que facilita sua degradação em ambientes úmidos. Em contraste, as poliamidas semiaromáticas e aromáticas, como as poliftalamidas (PPA), contêm anéis benzênicos em sua estrutura, o que reduz sua polaridade e solubilidade, tornando-as ainda mais resistentes à degradação química e biológica. Estudos indicam que as poliamidas alifáticas possuem maior flexibilidade estrutural e acessibilidade enzimática, favorecendo sua biodegradação, enquanto as aromáticas apresentam cadeias mais rígidas e elevada resistência à quebra por processos biológicos (Carniel *et al.*, 2024).



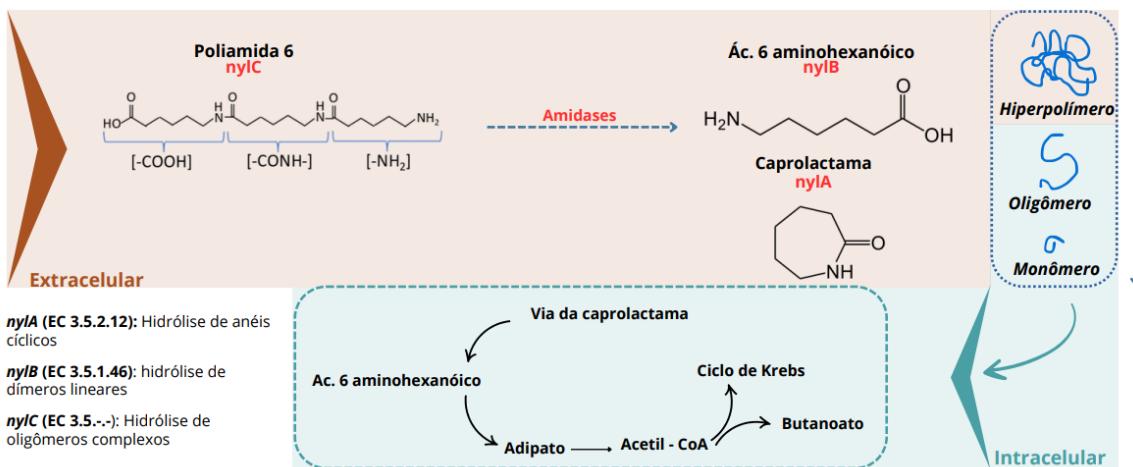
**Figura 2.** Representação esquemática da organização estrutural de um polímero semicristalino, como a poliamida. As regiões cristalinas apresentam cadeias poliméricas ordenadas e compactadas, favorecendo interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio. Já as regiões amorfas são desorganizadas e apresentam maior mobilidade molecular, sendo mais suscetíveis à penetração de água, enzimas ou agentes químicos, o que as torna os principais alvos iniciais nos processos de degradação.

Os métodos convencionais de degradação da PA incluem processos térmicos, químicos e mecânicos, cada um com limitações específicas. A degradação térmica ocorre em temperaturas superiores a 400°C, o que leva à quebra das ligações amida e à formação de compostos voláteis, como aminas e

monômeros, além de exigir alto consumo energético e liberar compostos tóxicos, como óxidos de nitrogênio e amônia (Kurima *et al.*, 2022). A degradação química, via hidrólise ácida ou alcalina, converte a PA em monômeros reutilizáveis, no entanto, o uso de reagentes agressivos restringe sua aplicação em larga escala devido à toxicidade dos resíduos gerados. (Brette *et al.*, 2023). A degradação mecânica fragmenta a PA em partículas menores sem modificar sua estrutura química, o que amplia a contaminação ambiental por microplásticos (Cobongela, 2021). Diante dessas limitações, a busca por estratégias sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento da biodegradação como alternativa promissora de gestão desses resíduos.

O processo de biodegradação das poliamidas (PA) pode ser dividido em duas etapas principais: (i) degradação inicial do polímero e (ii) assimilação dos produtos resultantes por vias metabólicas microbianas específicas. Na primeira etapa, a PA sofre hidrólise química ou enzimática, resultando na clivagem das ligações amida e na formação de oligômeros menores e monômeros. Esse processo pode ser intensificado por condições ambientais favoráveis, como altas temperaturas, umidade elevada e a presença de outros polímeros biodegradáveis que promovem microambientes mais reativos (Dou *et al.*, 2020).

No caso específico da PA6, cuja unidade monomérica é a caprolactama (CLA), estudos demonstraram a ação de enzimas bacterianas especializadas, como a NylA, uma hidrolase que rompe os oligômeros cílicos da PA; a NylB, uma amidase responsável por converter esses fragmentos em 6-aminocaproato (6-ACA); e a NylC, uma endopeptidase que promove a degradação final dos oligômeros lineares. Os produtos gerados, como o 6-ACA, podem então ser direcionados para rotas metabólicas intracelulares, sendo utilizados como fonte de carbono e nitrogênio (Figura 3). A capacidade de metabolizar a caprolactama e seus derivados já foi demonstrada em diversas estirpes bacterianas (Esikova *et al.*, 2023; Dou *et al.*, 2020).



**Figura 3.** Representação esquemática da degradação microbiana da poliamida 6 (PA6). Extracelularmente, a PA6 sofre clivagem enzimática por hidrolases e amidases específicas: NylA atua sobre anéis cílicos (EC 3.5.2.12), NylB sobre dímeros lineares (EC 3.5.1.46) e NylC sobre oligômeros complexos. Essa degradação resulta na formação de monômeros como a caprolactama e o ácido 6-aminocapróico, que podem ser transportados para o ambiente intracelular. No citoplasma, esses compostos são assimilados por vias metabólicas, como a via da caprolactama, sendo convertidos em intermediários do ciclo de Krebs (adipato, acetil-CoA e butanoato), que fornecem energia e precursores biossintéticos à célula.

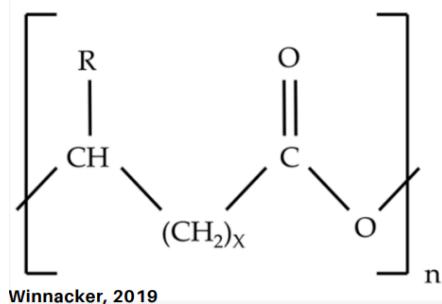
Outra via possível é a da caprolactona (CLO), encontrada na presença de PA que teve sua estrutura modificada ou formulada como um copolímero de poli(caprolactama-co-ε-caprolactona). A CLO é degradada inicialmente por hidrólise enzimática, catalisada por lipases e esterases, que quebram suas ligações éster, convertendo-a em ácido 6-hidroxicapróico (6-HCA). Após a degradação inicial, tanto o 6-ACA, derivado da CLA, quanto o ácido 6-hidroxicapróico, da CLO, entram em processos metabólicos microbianos. O 6-ACA é convertido em ácido gama-aminobutírico (GABA) por ação de desaminases e amidases, enquanto o ácido adípico, derivado da CLO, é transformado em succinato e acetil-CoA. Ambos os compostos entram no ciclo de Krebs, culminando na geração de ATP e metabólitos essenciais para o crescimento celular, o que reforça a eficiência microbiana na reciclagem de poliamida (Sasanami *et al.*, 2022).

Entretanto, apesar do potencial da biodegradação, sua eficiência ainda enfrenta desafios como a alta estabilidade química da PA, a dependência de condições ambientais específicas e a escassez de micro-organismos especializados na sua degradação (Carniel *et al.*, 2024). Para contornar essas limitações, avanços biotecnológicos surgem como alternativas promissoras,

incluindo engenharia metabólica e genética, além desses processos inovadores de bioconversão de plásticos, como a transformação de resíduos plásticos em PHAs, biopolímeros biodegradáveis que representam uma alternativa sustentável aos plásticos convencionais (De Witt *et al.*, 2025; Sohn *et al.*, 2021; Johnston *et al* 2019).

#### **4.3 Produção de Polihidroxialcanoatos e bioconversão de poliamida**

Os PHAs são poliésteres microbianos naturais sintetizados como polímeros de reserva energética e formados pela polimerização de 3-hidroxialcanoatos, compostos que possuem uma estrutura química básica composta por uma cadeia alifática de carbono, um grupo hidroxila (-OH) e um grupo carboxila (-COOH), unidos por ligações éster (Figura 4). A variação estrutural do radical alquila (R) nos monômeros determina propriedades como flexibilidade, cristalinidade e biodegradabilidade. Os PHAs são classificados em três categorias: (i) cadeia curta (SCL-PHA), com 3 a 5 átomos de carbono, como o poli(3-hidroxibutirato) (PHB); (ii) cadeia média (MCL-PHA), com 6 a 14 átomos de carbono como o poli(3-hidroxioctanoato) (PHO); (iii) cadeia longa (LCL-PHA), com mais de 14 átomos de carbono (Reddy *et al.*, 2022). A estrutura molecular dos PHAs influencia diretamente suas propriedades físico-químicas, como ponto de fusão, resistência mecânica e biodegradabilidade. Enquanto os PHAs mais cristalinos, como o PHB, apresentam características semelhantes ao PP, enquanto os menos cristalinos, como o PHO, possuem comportamento mais elástico, semelhante ao de elastômeros. Essa flexibilidade estrutural permite que os PHAs sejam adaptados para diversas aplicações, desde embalagens biodegradáveis até dispositivos médicos, consolidando-se como uma alternativa sustentável aos plásticos convencionais (Winnacker, 2019 ).



**Figura 4.** Estrutura química geral dos polihidroxialcanoatos (PHAs), representando a unidade monomérica básica formada por um radical alquila variável (R), uma cadeia alifática  $(\text{CH}_2)_x$  e um grupo éster. A variação na natureza do radical R e no comprimento da cadeia lateral influencia diretamente as propriedades físico-químicas do polímero, como cristalinidade, flexibilidade e biodegradabilidade (WINNACKER, 2019).

A biossíntese dos PHAs ocorre por diferentes vias metabólicas (Figura 5), conforme a espécie bacteriana e o substrato disponível (Sagong *et al.*, 2018). A via mais comum é a do acetil-CoA, caracterizada pela conversão de acetil-CoA em PHB, como descrito em *Cupriavidus* e *Alcaligenes* (Chen & Jiang, 2018; Cavalheiro *et al.*, 2012; Gaur *et al.*, 2021). A  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos gera intermediários como o 3-hidroxiacil-CoA, utilizados na síntese de MCL-PHA, especialmente por bactérias como *Pseudomonas putida* e *Alcaligenes denitrificans*. Além disso, a via do butanoato, a partir de acetil-CoA e ácido butírico, também leva à formação de (R)-3-hidroxibutiril-CoA e posterior produção de PHB ou PHBV. A via de biossíntese de ácidos graxos, por sua vez, permite a formação de precursores como (R)-3-hidroxibutiril-ACP a partir de substratos como glicose, óleos e ácidos graxos, sendo mais uma rota alternativa para a síntese de PHA. Finalmente, a via do propionato/succinato permite a produção de PHBV (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)), um copolímero com melhores propriedades mecânicas, sintetizado por *Bacillus megaterium* e *Cupriavidus necator* a partir de substratos como ácido propanoico e ácido valeriano (Assis *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2007).

A bioconversão de polímeros sintéticos em PHAs tem sido amplamente estudada como uma alternativa sustentável para a reciclagem de plásticos e a produção de biopolímeros biodegradáveis. Esse processo já foi descrito para materiais como PP e outros hidrocarbonetos derivados do petróleo, de modo que microrganismos como *Cupriavidus necator* e *Pseudomonas putida* utilizam resíduos oxidados desses plásticos como fonte de carbono para a biossíntese de

PHAs (Witt *et al.*, 2025; Sohn *et al.*, 2021; Johnston *et al* 2019). Além disso, foi relatado que algumas bactérias podem converter lignina e compostos aromáticos em PHAs, indicando que polímeros complexos podem ser metabolizados por vias microbianas específicas (Li, 2020).

Embora a bioconversão da PA em PHAs ainda não tenha sido descrita na literatura, a viabilidade dessa pode ser considerada, uma vez que a degradação da PA pode gerar intermediários assimiláveis pelos microrganismos produtores de PHAs. Adicionalmente, estudos mostram que algumas bactérias, como *Alcaligenes faecalis*, conseguem degradar PA6 e metabolizar caprolactama, um monômero da poliamida (Oulidi *et al.*, 2022). Produtos dessa degradação, como 6-aminocaproato e ácido adípico, podem entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e se conectar com vias metabólicas conhecidas para a síntese de PHAs (Ackermann *et al.*, 2021; Oh *et al.*, 2024). Assim, microrganismos capazes tanto de degradar poliamida como de produzir PHAs poderiam, teoricamente, converter resíduos de PA em biopolímeros, o que representa uma importante perspectiva para futuras pesquisas na área da reciclagem biotecnológica e produção sustentável de plásticos biodegradáveis.

#### 4.4 O Potencial biotecnológico do gênero *Alcaligenes*

O gênero *Alcaligenes* pertence à família *Alcaligenaceae*, dentro da classe *Betaproteobacteria*, e inclui bactérias Gram-negativas, aeróbias, móveis por flagelos peritricosos e não-esporulantes. Configuram bactérias ubíquas, que podem ser encontradas em solos, ambientes aquáticos e efluentes industriais. Suas principais espécies são *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes denitrificans* e *Alcaligenes aquatilis*. Além da versatilidade metabólica, caracterizada pela capacidade de degradar compostos tóxicos, metais pesados e hidrocarbonetos, esse gênero também destaca-se pela sua capacidade de produzir PHAs (Kanzariya *et al.*, 2023).

Estudos experimentais demonstraram que *Alcaligenes eutrophus* (atualmente *Cupriavidus necator*) pode produzir PHB quando cultivado em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, sendo a frutose o substrato mais eficiente para essa produção (Aramvash & Aghjeh,ass 2015). Já *Alcaligenes latus* apresentou elevada síntese de PHA quando cultivado em caldo de cana-de-

açúcar em fermentação repetida, evidenciando sua viabilidade industrial (Singhaboot & Kaewkannetra, 2015). Modelos matemáticos de cinética de crescimento aplicados à estirpe *Alcaligenes* sp. NCIM 5085 mostraram que essa bactéria pode utilizar resíduos da indústria açucareira como fonte de carbono para a produção eficiente de PHAs (Kanzariya *et al.*, 2023). Essas evidências reforçam a relevância biotecnológica de *Alcaligenes*, não apenas na produção de biopolímeros, mas também na valorização de resíduos industriais, tornando-o um organismo promissor para a bioconversão sustentável de substratos diversos.

Em paralelo à produção de PHAs, esse gênero também demonstra potencial para a degradação de PA. Estudos experimentais indicam que *Alcaligenes faecalis* é capaz de degradar caprolactama, o que sugere que essa bactéria pode atuar na biorremediação de resíduos industriais e efluentes contaminados com compostos derivados da PA (Oulidi *et al.*, 2022;). Em análises genômicas foram identificados genes envolvidos no metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos, indicando que essa espécie apresenta mecanismos para a degradação de polímeros sintéticos complexos (Singh *et al.*, 2017).

Dessa forma, embora a conversão direta de PA em PHAs por *Alcaligenes* ainda não tenha sido descrita, sua capacidade de produzir PHAs e seu potencial para degradar PA sugerem a presença de um aparato metabólico com potencial para converter polímeros sintéticos em biopolímeros biodegradáveis, conforme descrito no tópico 2.3. Assim, este estudo tem como objetivo investigar e caracterizar as vias metabólicas envolvidas nesses processos na estirpe *Alcaligenes* sp. PE 187, isolada de plásticos descartados em solos do Cerrado por Peixoto (2013), por meio de análises genômicas e da avaliação experimental da sua capacidade de metabolizar PA como única fonte de carbono. A identificação e compreensão dessas vias possibilitarão aplicações biotecnológicas inovadoras na bioconversão de resíduos plásticos, na produção de biopolímeros de alto valor agregado e no desenvolvimento de estratégias sustentáveis para o aproveitamento desses materiais.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Isolamento e cultivo da bactéria *Alcaligenes* sp. PE 187

#### 5.1.1 Isolamento de *Alcaligenes* sp. PE 187

A estirpe bacteriana *Alcaligenes* sp. PE 187, utilizada neste estudo, foi isolada de resíduos plásticos com evidências macroscópicas de degradação coletados em solos do bioma Cerrado. O isolamento foi realizado conforme descrito por Peixoto (2013). Plásticos degradados, encontrados na região da Chapada dos Veadeiros, foram coletados e os microrganismos aderidos foram removidos por lavagem em solução salina estéril (NaCl 0,9%). A suspensão resultante foi inoculada em placas de ágar contendo diferentes meios de cultura (Nutrient Broth (NB), R2A, Czapek-Dox, Middlebrook e Marine Broth) suplementados com 1,5% de ágar (Acumedia, EUA). As culturas foram incubadas a 28°C por 7 dias para isolamento e seleção dos microrganismos colonizadores desses resíduos.

Após a incubação, colônias morfológicamente distintas foram selecionadas e repicadas para obtenção de culturas puras. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit Wizard SV Genomic DNA Purification System Quick Protocol (Promega) com adaptações para a extração de DNA bacteriano. O protocolo incluiu a adição de 200 µL de H<sub>2</sub>O milli-Q e 20 µL de lisozima (20 mg/mL), seguida de incubação a 37°C por 1 hora. Para otimização da lise celular, foram inseridas 0,2 g de glass beads e a mistura foi agitada no Fast Prep (MP Biomedicals) por 40 segundos. A centrifugação foi realizada a 10.000 × g por 1 minuto para remoção de debríos celulares.

O fragmento do DNA, relativo ao gene 16S rRNA, foi amplificado por PCR, seguido de sequenciamento foi pela plataforma Sanger, conduzida pela empresa *Macrogen Inc.* (Coreia do Sul). As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados NCBI/GenBank/RDP para identificação taxonômica. Os gêneros identificados como potenciais degradadores de polímeros sintéticos foram cultivados em meio mínimo suplementado com 1% de óleo mineral como única fonte de carbono. Os isolados que apresentaram crescimento foram cultivados em meio líquido até atingirem a fase estacionária de crescimento. As células foram

então coletadas por centrifugação a 7.000 × g por 5 minutos e ressuspensas em solução de glicerol 15% estéril para o posterior estoque em criotubos a -80°C para conservação a longo prazo.

#### **5.1.2 Condições gerais de cultivo**

O cultivo inicial, assim como todos os posteriores, foi conduzido em meio sólido nutritivo NA (Nutrient Agar, KASVI) preparado conforme as instruções do fabricante, e em meio líquido nutriente (Nutrient Broth, NB), composto por 5 g de peptona e 3 g de extrato de carne por litro (KASVI). A estirpe bacteriana foi inicialmente cultivada em NA por 48 horas a 30°C para a visualização das colônias isoladas e das características fenotípicas antes da preparação dos pré-inóculos. Os pré-inóculos, utilizados nos experimentos, foram preparados de maneira padronizada pela transferência de uma colônia isolada em placas de NA para 5 mL de NB, seguido da incubação a 30°C sob agitação de 180 rpm por 24 horas. A manutenção da estirpe em cultura foi realizada de maneira periódica em meio NA, com incubação por 24 a 48 horas a 30°C em estufa bacteriológica. Para evitar perdas devido a contaminações ou falhas técnicas, foram preparadas três culturas-estoque a cada ciclo de manutenção.

### **5.2 Caracterização morfológica da *Alcaligenes* sp. PE 187**

Para a caracterização morfológica das colônias de *Alcaligenes* sp. PE 187, as culturas foram cultivadas em meio NA e incubadas a 30°C por 48 horas. Após esse período, as colônias foram avaliadas visualmente sob iluminação direta e indireta, considerando critérios como formato, contorno, relevo, textura e coloração. As características observadas foram registradas e documentadas por meio de fotografias, permitindo o acompanhamento detalhado e a realização de comparações futuras.

A análise morfológica das células bacterianas foi conduzida por MEV a partir de culturas preparadas conforme o protocolo de pré-inóculo descrito anteriormente. As células foram recuperadas por centrifugação a 5000 ×g por 10 minutos a 4°C e lavadas três vezes com tampão salino de fosfato 1X (PBS). O processo de fixação celular foi realizado em duas etapas: inicialmente, as células

foram incubadas em solução de Karnovsky, composta por 2% (v/v) paraformaldeído, 2% (v/v) glutaraldeído, 3% (p/v) sacarose e 0,05 M tampão cacodilato. Em seguida, foi aplicada uma solução de tetróxido de ósmio a 1% (p/v) para assegurar a preservação estrutural. Após a fixação, as células foram aderidas a lamínulas tratadas com poli-L-lisina, submetidas a um processo de desidratação gradual com concentrações crescentes de acetona (v/v 50%, 70%, 90% e 100%) e secas em ponto crítico com CO<sub>2</sub>. Para aumentar a condutividade elétrica e melhorar a qualidade da imagem, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro. A visualização das estruturas celulares foi realizada no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-7001F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão).

### 5.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

O DNA genômico foi extraído de culturas puras de *Alcaligenes sp.* PE 187, cultivadas em meio NB a 30°C por 48 horas. O cultivo foi centrifugado a 5000 × g por 5 minutos a 4°C, e o DNA total foi extraído utilizando o *Bacteria DNA Preparation Kit* (CELLCO), conforme as instruções do fabricante. A qualidade e a integridade do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% (v/v) em tampão TBE 0,5X (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).

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers universais 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGAC-3'). A reação de PCR foi preparada em um volume final de 20 µL, contendo 1-2 ng de DNA total, tampão de reação 10X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada primer, 0,2 mM de dNTPs e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação foi conduzida em um termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com elongação final a 72°C por 5 minutos. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 0,8% (v/v) em tampão TBE 0,5X e purificado utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento do gene 16S rRNA foi realizado por meio da plataforma Sanger pela empresa *Macrogen* (Seul, Coreia do Sul), com os mesmos primers

empregados na amplificação. As sequências obtidas foram analisadas no *software FinchTV (v1.4.0) (Geospiza Ink)*, e a qualidade foi avaliada pelo cálculo do *mean Phred score* utilizando-se *Biopython*. Bases de baixa qualidade (*Phred < 30*) foram removidas, e a sequência consenso foi gerada pelo *software Tracy*. A filogenia foi inferida a partir da sequência consenso, utilizando-se método *Maximum Likelihood* (ML) com 1000 repetições de *bootstrap* para estimar a robustez dos agrupamentos. Foram incluídas sequências de referência do gênero *Alcaligenes* e sequências *outgroup* extraídas do banco de dados *GenBank* (NCBI). O alinhamento das sequências foi realizado no *MEGA12* (Tamura et ak., 2021), através do algoritmo *ClustalW* (Larkin et al., 2007), e o cladograma de similaridade foi construído por meio do mesmo *software*, empregando-se o modelo de substituição *Kimura 2-parameter* (K2P).

## 5.4 Análises Genômicas

### 5.4.1 Sequenciamento, montagem e anotação do Genoma

O DNA genômico utilizado para o sequenciamento completo do genoma foi extraído conforme descrito na Seção 5.3. A qualidade e integridade do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TBE 0,5X (0,05 M Trizma base, 0,05 M ácido bórico e 0,001 M EDTA), utilizando o marcador molecular 1 kb DNA *Ladder* (Invitrogen). O sequenciamento foi realizado pela empresa *Macrogen* (Seul, Coreia do Sul) em duas plataformas: *Illumina*, seguindo o protocolo *TruSeq Nano DNA Sample Preparation* ( $2 \times 300$  pb paired-end reads), e *PacBio*, utilizando o protocolo *Sequel IIe*, baseado na tecnologia *HiFi Reads*.

A montagem do genoma seguiu uma abordagem híbrida, combinado os dados de *short* e *long-reads* referentes às plataformas *Illumina* e *PacBio*, respectivamente, conforme o pipeline descrito por Derakhshani et al. (2020). Inicialmente, as *reads* curtas de *Illumina* passaram por controle de qualidade por meio da ferramenta *FastQC* (v.0.11.7) (Andrews, 2010), seguido da remoção de adaptadores e filtragem com *Trimmomatic* (v.0.39) (Bolger et al., 2014). (parâmetros utilizados: ILLUMINACLIP:adapters.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:50). Após essa etapa, as

sequências foram analisadas utilizando-se a ferramenta *FastQC* a fim de garantir adequação às análises subsequentes.

Paralelamente, os dados de *PacBio* foram mapeados contra os contigs gerados a partir das *reads* curtas utilizando *minimap2* v2.1.1 (Li, 2018), com a opção -ax map-pb, adequada para o alinhamento de sequências longas. As *reads* longas foram filtradas utilizando o *software Filtlong* (v.0.2.0), mantendo-se os 90% de maior qualidade, com um limite total de 500 Mbp de dados. Fragmentos menores que 2 kb foram removidos para garantir a qualidade na montagem.

A montagem híbrida foi conduzida em duas etapas principais. Primeiramente, as *reads* curtas de *Illumina* foram montadas de forma preliminar por meio do *software Unicycler* (v.0.4.8) (Wick *et al.*, 2017), gerando um conjunto de *contigs* de alta qualidade. Em seguida, as *reads* longas de *PacBio*, previamente filtradas, foram combinadas aos *contigs* gerados por meio do *Unicycler*. Os resultados foram submetidos à montagem final com *Flye* (v2.9.5) (Kolmogorov *et al.*, 2020). Essa montagem foi então refinada por múltiplas rodadas de polimento utilizando-se o *software Pilon* v1.23 (Walker *et al.*, 2014) em conjunto com as *reads* curtas de *Illumina*. O alinhamento das *reads* curtas contra a montagem foi realizado com *bwa mem* v0.7.17 (Li, 2013), seguido da conversão dos arquivos SAM para BAM por meio do *software Samtools* v1.7 (Danecek *et al.*, 2021).

A identificação e separação dos genomas foram feitas por meio do *software MetaBAT2* (v2.15.3), utilizando um *cutoff* de 1500 pb para contigs, o que resultou na formação de dois *bins* distintos. O *bin2*, correspondente à estirpe *Alcaligenes* sp. PE 187, foi selecionado para as análises posteriores. A qualidade da montagem híbrida foi avaliada por meio dos softwares *CheckM* (v.1.1.3) (Parks *et al.*, 2015) e *QUAST* (v.5.0.2). O *CheckM* foi utilizado para estimar a completude e a contaminação do genoma reconstruído, enquanto o *QUAST* para analisar as métricas como N50, número total e tamanho médio dos contigs e percentual de GC. Adicionalmente, a completude do genoma foi reforçada através de análise pelo na ferramenta *BUSCO* (v.5.8.2) (Mabbi *et al.*, 2021). A anotação genômica foi feita por meio do *software Prokka* (v.1.14.6) disponível no ambiente Galaxy (Afgan *et al.*, 2016; Semmann, 2014), com base no banco de dados *RefSeq*.

#### 5.4.2 Classificação taxonômica da linhagem com base na hibridização digital de DNA e identidade média de nucleotídeos

A classificação taxonômica da linhagem *Alcaligenes* sp. PE 187 foi realizada por hibridização digital de DNA (dDDH) na plataforma TYGS – DSMZ, utilizando-se o método *Genome BLAST Distance Phylogeny* (GBDP), que calcula a distância intergenômica com base em alinhamentos de alta pontuação (high-scoring pairs – HSPs). A estimativa da dDDH foi feita a partir de três fórmulas distintas: (i) d0 (GGDC formula 1), que calcula a proporção do comprimento total dos HSPs em relação ao tamanho do genoma; (ii) d4 (GGDC formula 2), que determina a soma das identidades nos HSPs dividida pelo tamanho total dos HSPs; e (iii) d6 (GGDC formula 3), que calcula a soma das identidades nos HSPs dividida pelo tamanho total do genoma. Como critério para definição em nível de espécie, foi adotado o limiar de  $\geq 70\%$  de dDDH, conforme estabelecido na literatura.

A classificação final foi determinada com base nos valores de dDDH, de modo a se obter a identidade da estirpe bacteriana sequenciada. Além da classificação taxonômica, a relação evolutiva da bactéria foi inferida com maior resolução por meio da análise de genes ortólogos e da reconstrução filogenômica por meio da inferência de máxima verossimilhança, conforme descrito no item 4.5.3.

#### 5.4.3 Análise filogenômica

A análise filogenômica foi realizada a partir da identificação de genes ortólogos entre *Alcaligenes* sp. PE 187 e linhagens de referência. Os ortólogos foram identificados utilizando-se o software *OrthoFinder* v2.3.3 (Emms & Kelly, 2019), que implementa o algoritmo DIAMOND para a comparação de sequências proteicas e agrupamento em famílias ortólogas. Apenas os genes ortólogos compartilhados por todas as linhagens foram selecionadas para inferências posteriores. As sequências foram alinhadas por meio do software *MAFFT* (v7) (Katoh & Standley, 2013) no modo L-INS-i. As sequências de escore de alinhamento foram removidas empregando-se da função automatizada -

*automated* 1 do *software TrimAI* v1.4 (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) e concatenadas para aumentar a acurácia da inferência filogenética.

O cladograma de similaridade foi construído utilizando-se o *software FastTree* v2.1 (Price *et al.*, 2009), por meio do modelo de substituição JTT+GAMMA, que considera heterogeneidade na taxa de evolução entre sítios. O suporte estatístico dos agrupamentos foi avaliado com base nos valores de *bootstrap*, utilizando-se membros do gênero *Escherichia* como *outgroup* para o enraizamento da árvore. A visualização e a edição da topologia foram realizadas por meio do *software MEGA* 11.

#### **5.4.4 Caracterização fenotípica in silico**

A predição fenotípica in silico foi realizada utilizando-se o *software Traitar* (Microbial Trait Analyzer), que inferiu 67 características fenotípicas a partir de sequências genômicas, com foco em metabolismo, motilidade e tolerância a estresses ambientais (Weimann *et al.*, 2016a). Os genomas das bactérias de referência foram obtidos no banco de dados do NCBI e analisados em conjunto com a estirpe *A. faecalis* PE 187. O *Traitar* implementa o *software Prodigal* v2.6.3 para a predição de genes e em seguida realiza a anotação funcional das sequências de aminoácidos utilizando a base de dados Pfam (v. 27.0), por meio de buscas conduzidas automaticamente pelo comando *hmmsearch* do *software HMMER* v3.0, considerando um E-value  $\leq 1e-5$  para a identificação de domínios proteicos relevantes.

A determinação das características fenotípicas ocorreu por meio de dois modelos preditivos complementares: (i) o modelo Phypat, baseado na presença ou ausência de proteínas associadas a fenótipos previamente descritos em 234 espécies bacterianas, e (ii) o modelo Phypat + PGL, que incorpora informações filogenéticas para considerar eventos evolutivos de ganho e perda de proteínas relacionadas a características fenotípicas. Os dados gerados pelo *Traitar* foram visualizados por meio de *heatmap* construído por meio de scripts em R, executados no ambiente RStudio, pelos pacotes *viridis*, *heatmaply*, *ggplot2*, *hrbrthemes* e *plotly* (R Development Core Team, 2019; RStudio Team, 2021; Wickham, 2009).

#### 5.4.5 Análise comparativa de pangenoma

Para a análise do pangenoma, foram selecionados genomas classificados como *Acaligenes faecalis*, obtidos na plataforma *The integrated Microbial Genomes* (IMG). A análise foi conduzida por meio do software *PPanGGOLiN* (Gatreau *et al.*, 2020), que utiliza um modelo probabilístico baseado em um grafo de confiança para classificar os *core genes* ( $\geq 95\%$  das linhagens), *shell genes* (10–95%) e *cloud genes* (<10%), conforme descrito por Blin *et al.* (2021). A variabilidade genômica e a similaridade entre as linhagens foram analisadas por meio de um dendrograma e de uma matriz de presença e ausência de genes, ambos gerados automaticamente pelo *PPanGGOLiN*. Esses dados foram visualizados na forma de um *heatmap*.

#### 5.4.6 Predição de genes homólogos associados à degradação de poliamida e produção de PHAs

A identificação de genes homólogos associados à degradação de poliamida e biossíntese de PHA foi realizada por meio do software HMMER v3.3.2 (Eddy, 2011), utilizando *Modelos Ocultos de Markov* (HMMs). Para a construção de um banco de dados *HMM*, foram coletadas do *NCBI* as sequências dos genes *NylA*, *NylB*, *NylC*, *PhaA*, *PhaB*, *PhaC*, *PhaR* e *PhaZ*, previamente descritos na literatura como genes relacionados à degradação de PA e à biossíntese de PHAs (Thuoc *et al.*, 2020; Duangsri 2023). As sequências foram alinhadas por meio do *MAFFT*, e convertidas ao formato *stockholm* utilizando a ferramenta *esl-reformat* do pacote Easel (HMMER). A ferramenta *HMMBUILD* foi utilizada para a construção de perfis *HMM* a partir dos alinhamentos múltiplos. Os perfis *HMM* gerados foram empregados para a busca e identificação de genes homólogos no genoma anotado de *Alcaligenes* sp. PE 187, utilizando a ferramenta *HMMSEARCH* com limiar de corte de E-value  $\leq 1e-20$  e Bit Score  $\geq 50$  (Viljakainen & Hug, 2021).

#### 5.4.7 Anotação funcional e predição de vias metabólicas associadas a degradação de PA e produção de polihidroxialcanoatos

A anotação funcional do genoma foi realizada utilizando o software *METABOLIC-G* (v4.0) (Zhou, 2022), por meio de comparação com os bancos de dados *KEGG* (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), *dbCAN* (anotação de enzimas degradadoras de carboidratos) e *MEROPS* (proteases e peptidases), garantindo ampla cobertura das funções metabólicas preditas. O genoma de *Alcaligenes* sp. PE 187 foi submetido ao *KEGG Automatic Annotation Server* (KAAS) utilizando o método Bidirectional Best Hit (*BBH*) para visualização das vias metabólicas relacionadas à produção de PHAs (*butoanote metabolism*) e degradação de PA (*caprolactam degradation*).

### **5.5 Avaliação do potencial de biodegradação da poliamida por *Alcaligenes* sp. PE 187**

#### 5.5.1 Determinação das condições ótimas de pH e temperatura

Para determinar as condições ótimas de crescimento de *Alcaligenes* sp. PE 189, foi realizada uma análise de curvas de crescimento bacteriano em microplacas de 96 poços, seguindo um protocolo adaptado descrito por Kurokawa & Ying (2017). O experimento avaliou o crescimento da linhagem sob diferentes condições de temperatura (26°C, 28°C, 30°C, 32°C e 37°C) e pH (5, 6, 7 e 8). Para os cultivos, o meio NB foi ajustado para os respectivos valores de pH utilizando HCl ou NaOH, esterilizado e mantido sob condições assépticas até o momento da inoculação. O pré-inóculo foi preparado conforme descrito no item 3.1.2 e a densidade óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>) foi mensurada em espectrofotômetro (M3, Spectramax). As amostras foram diluídas em meio NB a 0,1 OD<sub>600</sub>, a fim de padronizar os inóculos para os experimentos. Cada poço da microplaca recebeu um volume final de 150 µL, composto por 135 µL de meio NB com pH ajustado e 15 µL do pré-inóculo diluído, correspondente a 10% do volume final. Todas as combinações de pH e temperatura foram testadas em triplicata para garantir a precisão e reproduzibilidade dos dados.

Os ensaios foram conduzidos em um espectrofotômetro SpectraMax M3 (Spectramax) programado para monitorar a OD<sub>600</sub> ao longo de 48 horas, com medições periódicas realizadas a cada 1 hora. Antes de cada leitura, as placas foram agitadas automaticamente por 5 segundos para homogeneização da cultura. Os dados coletados foram armazenados para as análises subsequentes. Os valores brutos de OD<sub>600</sub> foram transformados em seus respectivos logaritmos naturais (ln(OD<sub>600</sub>)) para a inferência da fase exponencial do crescimento bacteriano. Para cada tempo de leitura, foi calculada a média de ln(OD<sub>600</sub>) considerando todas as replicatas associadas à mesma condição experimental. A taxa de crescimento específica ( $\mu$ ) foi determinada com base na variação do logaritmo natural da densidade óptica ao longo do tempo, de acordo com a equação:

$$\mu = \frac{\Delta \ln(OD)}{\Delta t}$$

O valor de  $\mu$  foi calculado individualmente para cada intervalo de tempo e, posteriormente, foi determinada a média de  $\mu$  para cada condição experimental. O desvio padrão ( $\sigma$ ) da taxa de crescimento específica foi calculado a partir da dispersão dos valores de  $\mu$  dentro de cada conjunto experimental. A estabilidade dos dados foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV%), calculado conforme a equação:

$$CV\% = \left( \frac{\sigma}{\mu} \right) \times 100$$

Além disso, foi calculado o tempo de duplicação ( $td$ ), que representa o tempo necessário para a população bacteriana dobrar durante a fase exponencial de crescimento, utilizando a equação:

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Por fim, a condição experimental que apresentou o maior valor de  $\mu$  ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi identificada, bem como as condições que resultaram nos menores valores de CV%, permitindo a determinação dos parâmetros ótimos de crescimento para *Alcaligenes sp. PE 189*.

A análise estatística foi conduzida para avaliar a influência das variáveis temperatura e pH sobre o CV% da linhagem. Inicialmente, a normalidade dos

dados foi testada por meio do teste estatístico de *Shapiro-Wilk*, a fim de determinar a adequação dos dados para testes paramétricos ou não-paramétricos. Tendo em vista que os dados de CV% não apresentaram distribuição normal, optou-se pelo uso do teste de *Kruskal-Wallis* para verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as condições de temperatura e pH. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste post-hoc de *Dunn* com correção de *Bonferroni* foi aplicado para identificar quais temperaturas apresentavam distinções relevantes.

### **5.5.2 Limpeza das vidrarias**

Todas as vidrarias utilizadas nos cultivos restritivos em relação a fontes de carbono foram lavadas com SDS 10% (Sigma Aldrich, EUA) seguidas de 2 lavagens com etanol absoluto e 10 lavagens com H<sub>2</sub>O destilada. O material foi deixado 12 horas em NaOH 0,5 M (Sigma Aldrich) e, consecutivamente, lavado mais 10 vezes com H<sub>2</sub>O bidestilada. Em seguida, as vidrarias foram esterilizadas em autoclave e separadas para uso posterior.

### **5.5.3 Desinfecção dos filmes de poliamida**

Os filmes de PA6 (BASF) submetidos a análises foram padronizados em formato quadrado, de 1cm por 1cm, e desinfetados com SDS 2% (Sigma Aldrich, EUA) por 4 horas seguido de etanol 70% (Sigma Aldrich, EUA) por 4 horas e lavados com água destilada, conforme protocolo bem estabelecido (Orr *et al.*, 2004; Sivan *et al.*, 2006). Esse procedimento permite a completa remoção de células microbianas e moléculas aderidas ou adsorvidas na superfície do material sem que haja modificações físico-químicas e/ou estruturais no polímero. Com isso, impede-se a interferência de debríis celulares nos ensaios, cultivos e análises (e.g. fontes de carbono vestigiais nos cultivos restritivos ou contaminantes em análises espectroscópicas), garantindo maior confiabilidade aos resultados obtidos.

#### 5.5.4 Cultivo em meio mínimo mineral com filmes de poliamida

O isolado *Alcaligenes* sp. PE 187 foi cultivado em frascos de vidro *Erlenmeyer* contendo 150 mL de meio de cultura mínimo mineral (MMM) (Tab. 1) (Pridham *et al.*, 1948) e três filmes de PA6 previamente desinfetados segundo o protocolo acima descrito (item 5.5.3). Para tanto, os microrganismos foram previamente inoculados em 5 mL de meio NA e cultivados a 28°C sob agitação (150 RPM) por 48 horas. Em seguida foram transferidos para novos frascos contendo 150 mL de meio NA fresco, onde foram cultivados por 48 horas aproximadamente. A cultura foi então centrifugada a 5.500 ×g por 5 minutos e o pellet celular foi resgatado, desprezando-se o sobrenadante. As células foram lavadas 3 vezes consecutivas com MMM para a completa remoção de vestígios do meio NA e ressuspensas em 1 mL de solução salina (0,9% NaCl) estéril para o posterior inóculo nos frascos de vidro contendo 150 mL de MMM suplementado com filmes de PA, os quais foram mantidos a 28°C sob agitação de 150 RPM por 90 dias.

**Tabela 1: Reagentes constituintes do meio de cultura mínimo mineral (MMM) e suas concentrações.**

Reagente	Concentração (g/L)
Sulfato de Amônia	2,6400
Fosfato de Potássio monobásico	2,3800
Fosfato de Potássio dibásico	5,6500
Sulfato de Magnésio heptahidratado	1,0000
Sulfato de Cobre (II) pentahidratado	0,0064
Sulfato de Ferro (II) heptahidratado	0,0011
Cloreto de Manganês (II) tetrahidratado	0,0079
Sulfato de Zinco heptahidratado	0,0015

#### 5.5.5 Viabilidade e adesão bacteriana aos filmes de PA

O isolado *Alcaligenes* sp. PE 187 foi cultivado em frascos de vidro *Erlenmeyer* contendo 150 mL de meio de cultura mínimo mineral (MMM) (Tab. 1)

(Pridham *et al.*, 1948) e três filme de PA6 previamente desinfetados segundo o protocolo acima descrito (item 5.5.3). Para tanto, os microrganismos foram previamente inoculados em 5 mL de meio NA e cultivados a 28°C sob agitação (150 RPM) por 48 horas. Em seguida foram transferidos para novos frascos contendo 150 mL de meio NA fresco, onde foram cultivados por 48 horas aproximadamente. A cultura foi então centrifugada a 5.500 ×g por 5 minutos e o pellet celular foi resgatado, desprezando-se o sobrenadante. As células foram lavadas 3 vezes consecutivas com MMM para a completa remoção de vestígios do meio NA e ressuspensas em 1 mL de solução salina (0,9% NaCl) estéril para o posterior inóculo nos frascos de vidro contendo 150 mL de MMM suplementado com filmes de PA, os quais foram mantidos a 28°C sob agitação de 150 RPM por 90 dias.

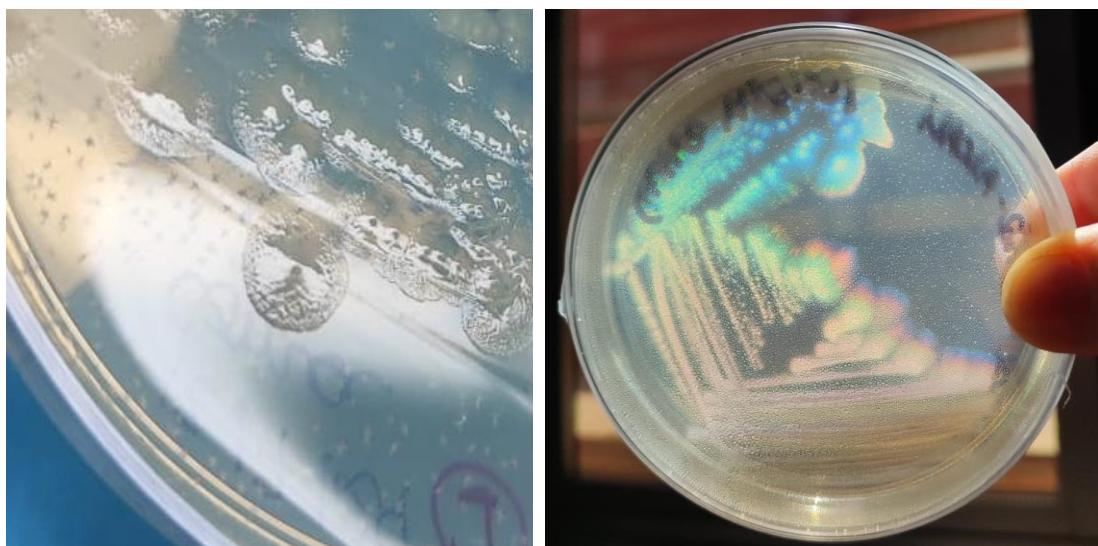
#### 5.5.6 *Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)*

O perfil químico dos filmes de PA previamente desinfetados foi acessado por meio da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier utilizando-se um sensor de reflectância total atenuada (ATR-FTIR), na região dos números de onda entre 400 e 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (infravermelho médio). Para tanto, empregou-se o espectroscópio Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer (Thermo Scientific, EUA), a fim de investigar as modificações químicas sofridas pelos filmes de PA antes e depois dos tratamentos biótico ou abiótico. Em cada filme de PA foram realizadas 10 leituras do espectro em diferentes pontos da amostra. As bandas de absorção dos espectros de IR foram analisadas comparativamente, em busca da formação de novos grupos funcionais (a partir de 1.300  $\text{cm}^{-1}$ ) e de outras modificações químicas induzidas pelos diferentes tratamentos (800 a 1300  $\text{cm}^{-1}$ ). O espectro de IR (do inglês, infrared) de filmes não-tratados foi utilizado como padrão comparativo (controle negativo) durante as análises dos filmes degradados.

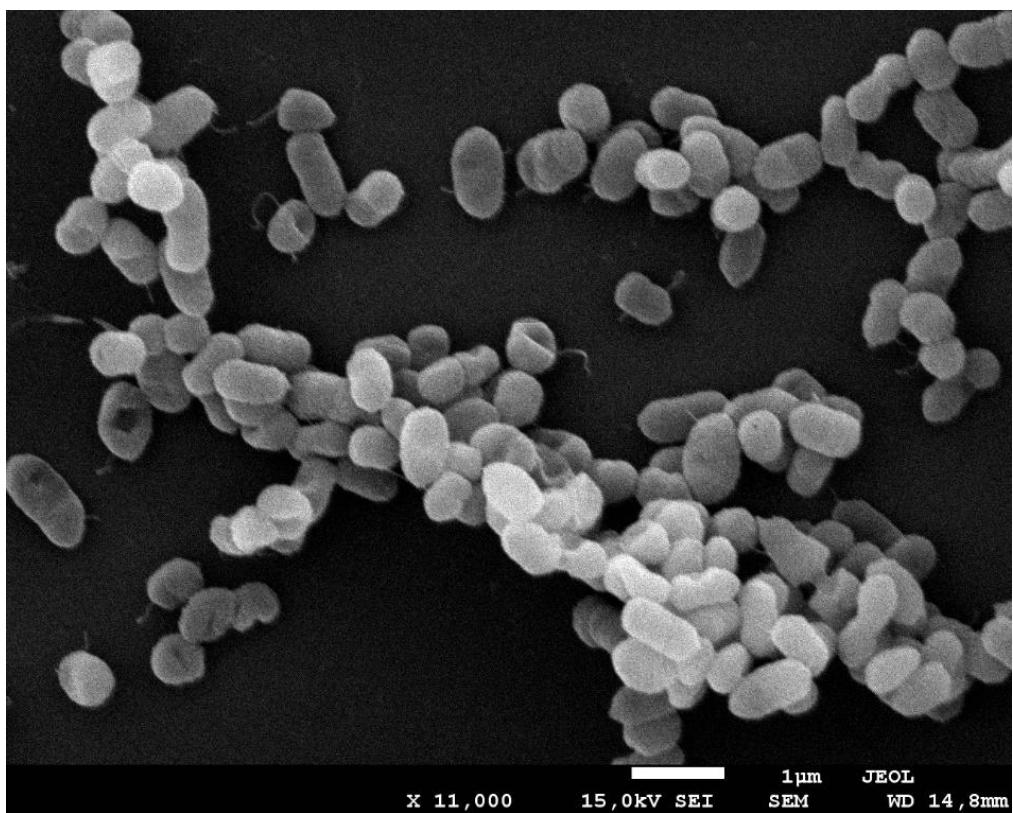
## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Isolamento e caracterização da *Alcaligenes* sp. PE 187

A caracterização morfológica das colônias de *Alcaligenes* sp. PE 187 cultivada em meio NA apresentou colônias circulares, esbranquiçadas e levemente convexas, com bordas relativamente arredondadas de textura irregular (figura 1). A microscopia eletrônica de varredura confirmou a morfologia bacilar da estirpe bacteriana, com células flageladas medindo entre 0,5–1,0  $\mu\text{m}$  de largura e 1,0–3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, distribuídas de maneira isolada ou em pequenos agrupamentos (Figura 2). A observação de flagelos confirma a motilidade dessa bactéria, um fator adaptativo que permite a colonização de diferentes nichos ambientais. Estudos conduzidos por Ray & Patnaik (2024) indicaram que *Alcaligenes faecalis* pode exibir diferentes padrões de motilidade dependendo das condições do meio, o que pode estar relacionado à formação de biofilmes e à resistência a condições adversas.



**Figura 5.** Colônias de *Alcaligenes* sp. PE 187 cultivadas em meio NA (esquerda) e brilho iridescente das colônias sob iluminação direta (direita).

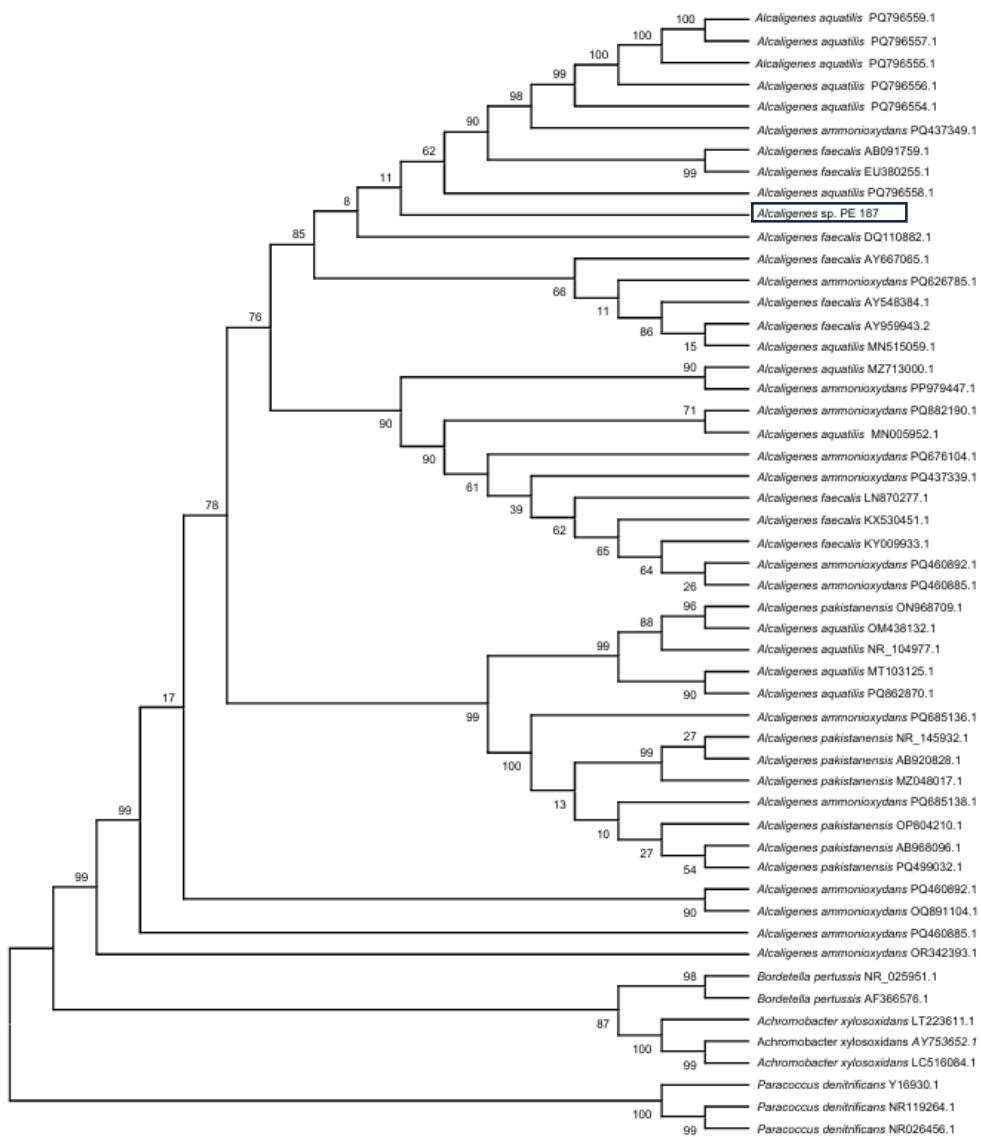


**Figura 6.** Micrografia obtida por MEV de *Alcaligenes* sp. PE 187, evidenciando células com morfologia bacilar, extremidades arredondadas e dimensões aproximadas de 0,5–1,0  $\mu\text{m}$  de largura por 1,0–3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento.

A análise taxonômica do gene 16S rRNA revelou uma identidade de 99,70% com *Alcaligenes faecalis* strain NBRC 13111, sugerindo que o isolado pertence a essa espécie. Além disso, a alta identidade com *A. aquatilis* (98,77%) e *A. ammonioxydans* (98,85%) indica uma relação filogenética próxima, o que pode refletir similaridades metabólicas e ecológicas entre essas espécies. O cladograma de similaridade (figura 3) sugere que algumas linhagens de *Alcaligenes aquatilis*, *Alcaligenes ammonioxydans* e *Alcaligenes faecalis*, incluindo *Alcaligenes* sp. PE 187, pertencem a um mesmo clado monofilético. Isso indica que essas linhagens compartilham um ancestral comum mais recente entre si do que com outras espécies do gênero.

A identificação bacteriana com base no gene 16S rRNA é amplamente utilizada na taxonomia bacteriana, e estudos indicam que uma similaridade acima de 98,65% geralmente é aceita como critério para designação de espécie (Chun *et al.*, 2018). No entanto, a resolução do 16S rRNA pode ser limitada para diferenciar linhagens dentro de espécies estreitamente relacionadas. Por esse

motivo, recomenda-se o uso de métodos complementares, como a análise de identidade de nucleotídeos médios (ANI) e do pangenoma, para maior precisão taxonômica (Rodriguez & Konstantinidis, 2018). Para uma confirmação definitiva da classificação taxonômica da linhagem de *Alcaligenes* sp. PE 187, foram conduzidas análises filogenômicas e a caracterização do pangenoma, permitindo uma avaliação mais robusta da posição taxonômica do isolado.



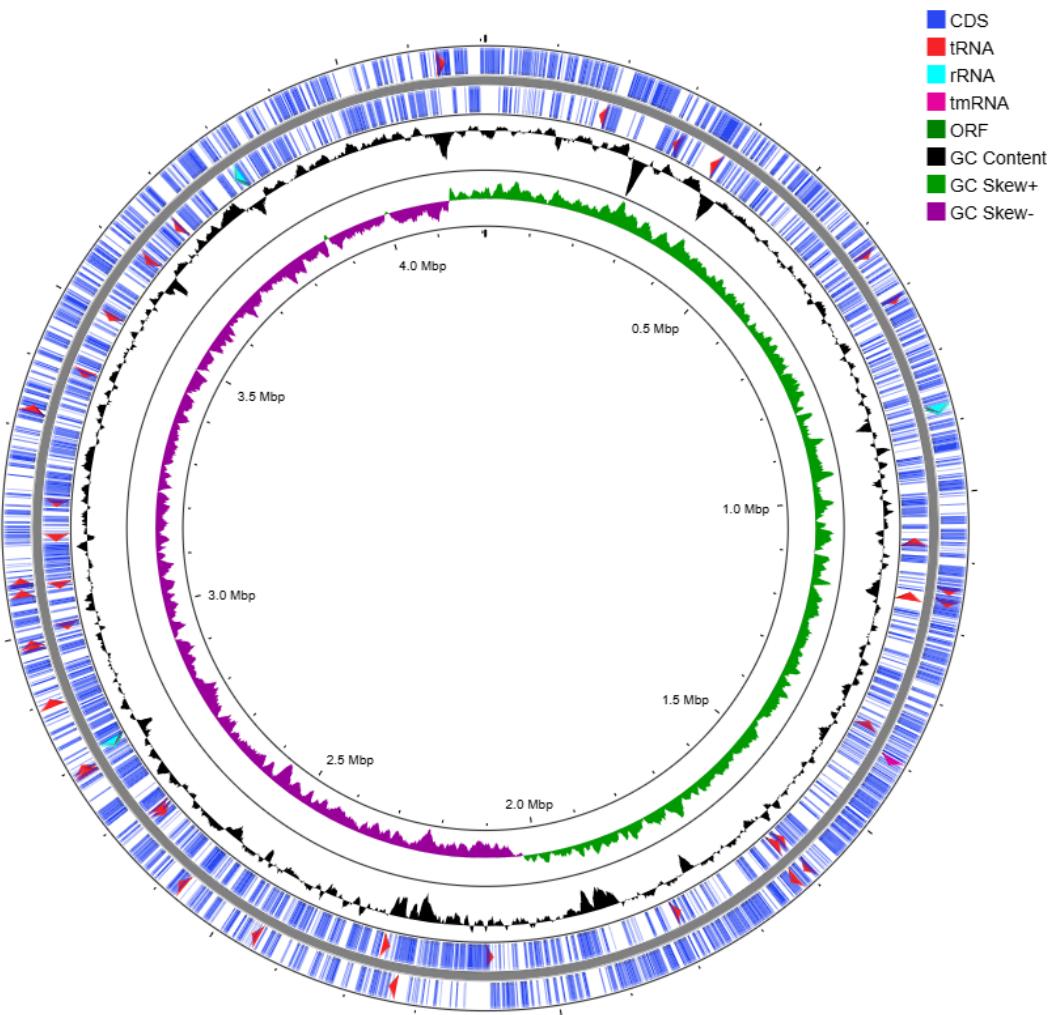
**Figura 7.** Cladograma de similaridade baseado na sequência do gene 16S rRNA da *Alcaligenes* sp. PE 187 em contraste a outras estirpes do gênero *Alcaligenes*. A relação evolutiva foi inferida pelo método de máxima verossimilhança (ML) com 1000 repetições de bootstrap.

## 6.2 Análises Genômicas

### 6.2.1 Qualidade e montagem do genoma

A montagem genômica permite a caracterização molecular de microrganismos, possibilitando a identificação de genes, a organização do material genético e a inferência de suas funções metabólicas (Reddy 2019). Com esse objetivo o genoma da *Alcaligenes* sp. PE 187 foi montado e analisado. O resultado revelou um único *contig* com um tamanho total de 4.206.586 pares de bases (bp) e um teor de GC de 56,75%. A qualidade da montagem foi avaliada por diferentes métricas. O N50 estimado foi de 4.206.586 bp e o L50 igual a 1, evidenciando a ausência de fragmentação. A completude genômica foi confirmada pelo *CheckM*, que indicou 100% de completude e ausência de contaminação. Adicionalmente, a análise pelo BUSCO indicou que 100% dos genes essenciais estavam presentes, sendo 99,2% em cópias únicas e 0,8% duplicados.

A anotação genômica conduzida pelo *Prokka* identificou 3.867 genes, dentre os quais 3.798 sequências codificadoras de proteínas (CDS), 9 genes de rRNA, 59 genes de tRNA e 1 um tmRNA. A caracterização desses elementos fornece informações relevantes sobre o potencial metabólico da bactéria e sua organização genética. Estudos recentes indicam que diferentes estirpes de *A. faecalis* apresentam variabilidade genômica significativa, o que pode impactar diretamente suas capacidades metabólicas e adaptação ambiental (Pedrosa-Silva & Venancio, 2023). Além disso, a profundidade de cobertura média do sequenciamento foi de 418,89x, garantindo um alto grau de confiabilidade na montagem e minimizando erros de sequenciamento (Han *et al.*, 2023). A organização estrutural do genoma da *Alcaligenes* sp. PE 187 e sua distribuição de genética podem ser visualizadas no mapa genômico circular (figura 4).



**Figura 8.** Mapa genômico circular de *A. faecalis* PE 187. Os anéis externos representam as CDS distribuídas nas fitas positiva e negativa do DNA, seguidos pela distribuição dos genes de tRNA, rRNA e tmRNA. O gráfico de variação do conteúdo GC (anéis pretos) e do viés de GC Skew (anéis verdes e roxos) auxilia na identificação de regiões relacionadas à replicação e organização genômica.

Os resultados obtidos estão alinhados com aqueles encontrados em outras cepas do gênero, como *A. faecalis* PGB1 e *A. faecalis* subsp. *phenolicus* MB207, reforçando sua identidade dentro do grupo (Lang *et al.*, 2022; Basharat *et al.*, 2018). A alta profundidade de cobertura e o número total de genes codificadores anotados (3.798 genes) sugerem um repertório metabólico completo, compatível com características previamente descritas para o gênero, incluindo resistência a metais pesados e degradação de compostos orgânicos complexos (Basharat *et al.*, 2018; Pedrosa-Silva & Venancio, 2023). Esses achados indicam um potencial biotecnológico relevante, especialmente para aplicações em biorremediação e

bioconversão de polímeros sintéticos em biopolímeros de interesse industrial .(Lang *et al.*, 2022;).

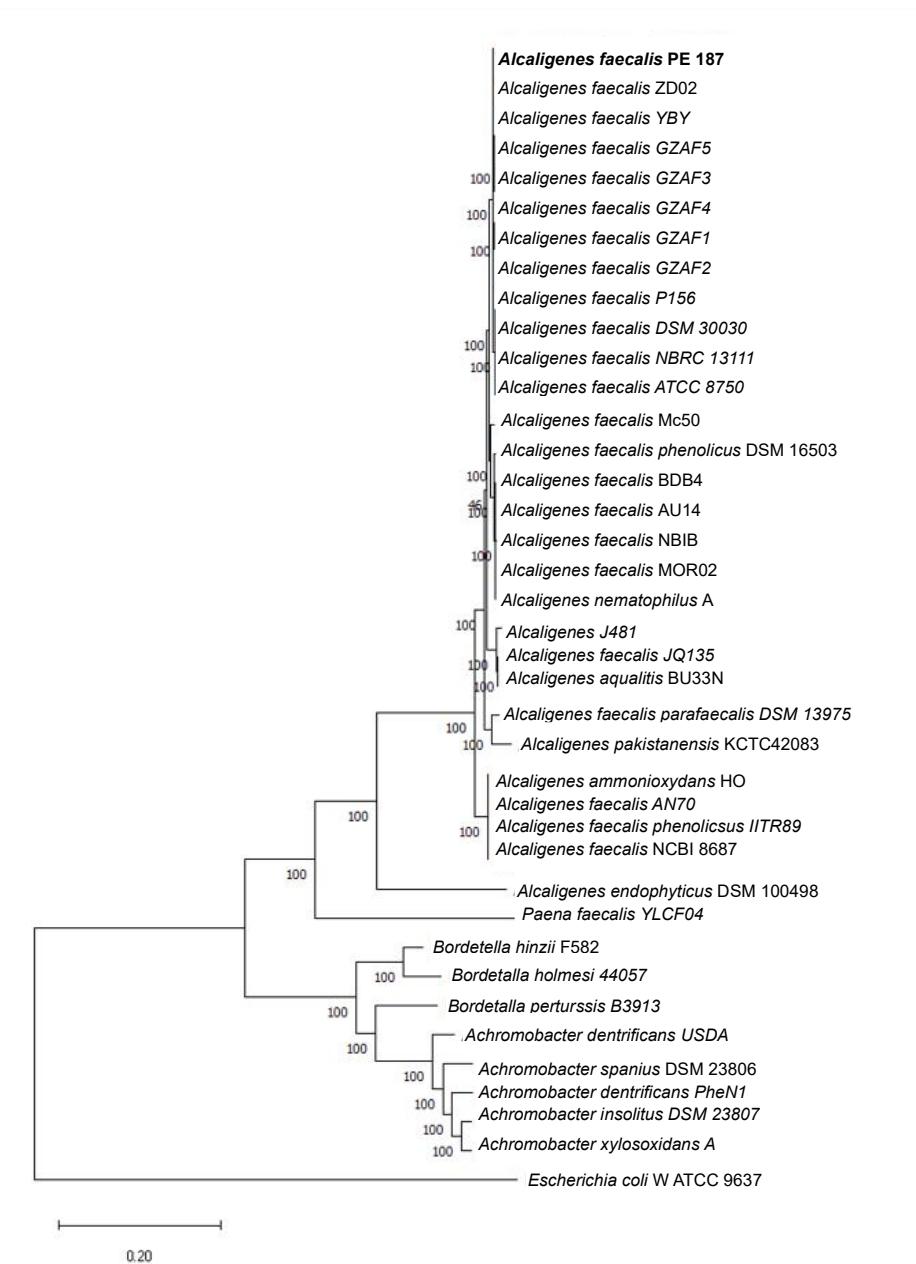
### **6.2.2 Análise filogenômica da *Alcaligenes* sp. PE 187**

Para consolidar a classificação taxonômica da *A. faecalis* PE 187 e investigar suas relações evolutivas dentro do gênero, foi realizada uma análise filogenômica comparativa. Com base no cladograma filogenômico (figura 5), a estirpe agrupa-se dentro do clado de *Alcaligenes faecalis*, formando um ramo bem suportado estatisticamente com diversas cepas previamente caracterizadas, como *A. faecalis* DSM 30030, *A. faecalis* NBRC 13111 e *A. faecalis* ATCC 8750. O alto suporte estatístico nesse agrupamento confirma sua relação filogenética próxima com essas linhagens, reforçando sua identidade taxonômica. Além disso, a *A. faecalis* PE 187 posiciona-se em um subclado específico dentro do complexo *A. faecalis*, sugerindo o compartilhamento de características genéticas relevantes com cepas dessa espécie bacteriana.

A clara separação entre *A. faecalis* e espécies filogeneticamente próximas, como *A. pakistanensis* e *A. endophyticus*, confirma a robustez dos métodos utilizados. Estudos anteriores mostram que, apesar da similaridade genética, essas espécies apresentam diferenças funcionais e ecológicas significativas, resultantes de processos evolutivos distintos. Além da separação intraespecífica, a presença de gêneros relacionados no cladograma, como *Bordetella* e *Achromobacter*, reforça a monofilia do gênero *Alcaligenes* e sua posição filogenética dentro da ordem *Burkholderiales*.

Os altos valores de *bootstrap* garantem a confiabilidade da inferência filogenética, demonstrando a sustentação estatística dos agrupamentos. Por fim, a utilização de *Escherichia coli* como grupo externo permitiu o enraizamento do cladograma, evidenciando a distância evolutiva entre *A. faecalis* e outros

membros da ordem *Burkholderiales*. Portanto, é seguro afirmar que a estirpe analisada pertence à espécie *Alcaligenes faecalis*.

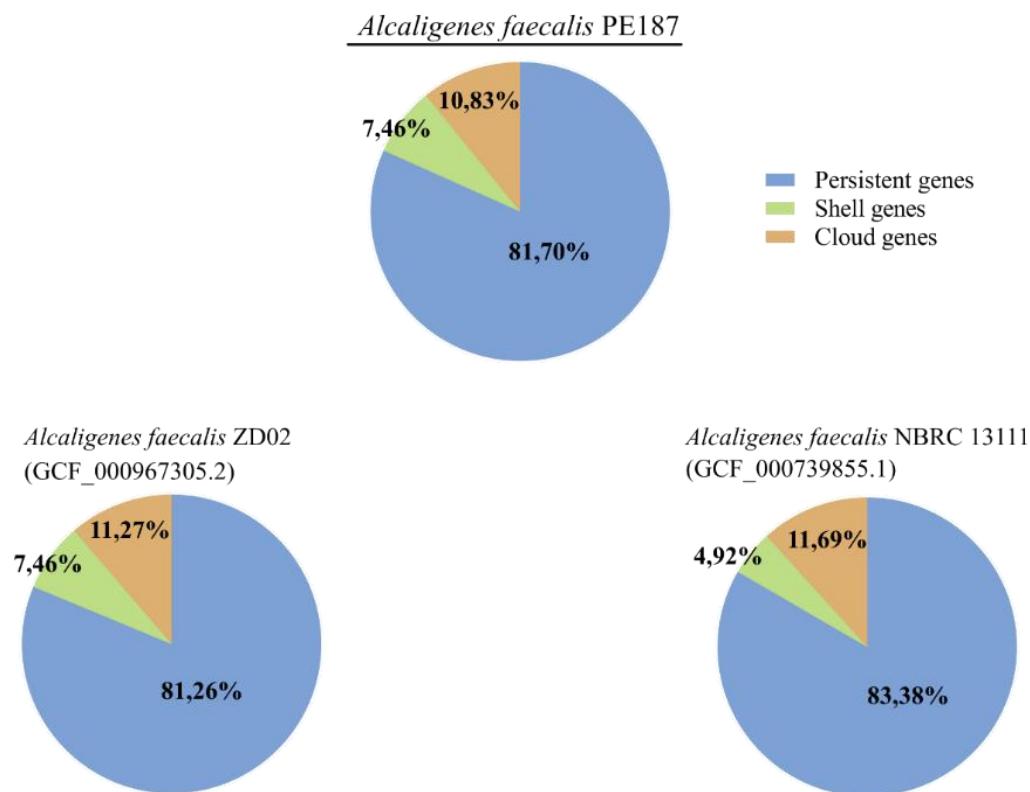


**Figura 9.** Cladograma de similaridade baseado na análise filogenômica de *Alcaligenes faecalis* PE 187 e linhagens correlatas. O cladograma foi construído utilizando genes conservados entre as cepas analisadas. Os valores de *bootstrap* indicam o suporte estatístico para cada agrupamento. A cepa PE 187 se agrupa em um clado bem definido junto a outras linhagens de referência de *A. faecalis*, enquanto espécies proximamente relacionadas, como *A. pakistanensis* e *A. endophyticus*, formam agrupamentos distintos. O gênero *Escherichia* foi utilizado como grupo externo para o enraizamento da árvore

### 6.2.3 Análise do Pangenoma

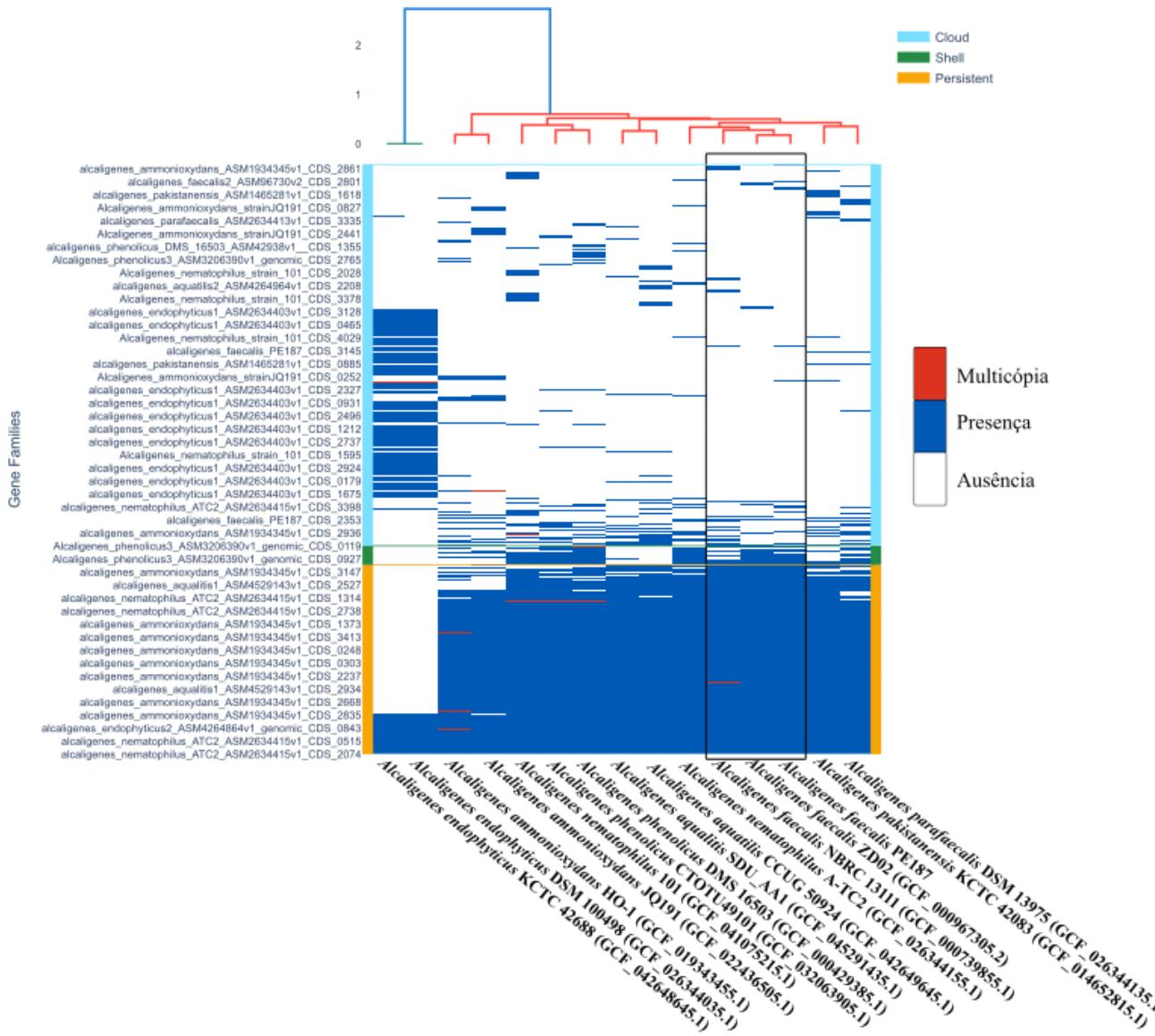
A análise do pangenoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 foi realizada com o objetivo de investigar a diversidade e a proximidade genômica dessa estirpe com outras relacionadas, conforme identificado pela análise filogenômica. A categorização dos genes em grupos – *core*, *shell* e *cloud* – possibilita a caracterização da estrutura genômica e a identificação de regiões específicas potencialmente associadas a processos adaptativos e funções metabólicas especializadas.

Os resultados evidenciaram uma distribuição bem definida dos genes nas diferentes categorias. A representação do pangenoma foi realizada por meio de gráficos que ilustram a composição gênica das três linhagens mais próximas de *A. faecalis* PE 187 (Figura 6). Os genes persistentes (*core genes*), presentes na maioria das estirpes, desempenham funções essenciais para a manutenção celular e a viabilidade da espécie. Os genes intermediários (*shell genes*), por outro lado, estão distribuídos em um subconjunto das linhagens e, frequentemente, estão relacionados a mecanismos de adaptação ambiental, como resistência a estresses físicos e químicos. Já os genes variáveis (*cloud genes*) estão presentes em menos de 10% das linhagens analisadas e, por serem adquiridos por transferência horizontal, podem conferir vantagens adaptativas, como genes envolvidos em funções especializadas ou interações específicas com o ambiente (Gautreau *et al.*, 2020). A proporção entre essas categorias sugere que a estirpe *A. faecalis* PE 187 possui um pangenoma relativamente estável, mas com uma fração variável que pode estar relacionada à adaptação a nichos ambientais distintos.



**Figura 10.** Distribuição do pangenoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 e outras duas linhagens. Os gráficos de pizza representam a proporção de *persistent genes* ou *core genes* (azul), *shell genes* (laranja) e *cloud genes* (verde), evidenciando a estabilidade genômica da linhagem PE 187 em comparação com as demais

A matriz de presença e ausência de genes, gerada pelo software PPanGGOLiN (Figura 7), revelou um padrão genômico altamente conservado entre *A. faecalis* PE 187 e as linhagens mais próximas filogeneticamente. No entanto, foram identificadas regiões do genoma com variabilidade, particularmente em segmentos contendo genes acessórios e exclusivos da estirpe PE 187. Esses genes, possivelmente relacionados a processos metabólicos específicos, podem conferir vantagens adaptativas à espécie. Esses resultados destacam a importância da análise pangenômica para a compreensão da diversidade genômica e da evolução de linhagens bacterianas e seu potencial para aplicações industriais e ambientais.



**Figura 11.** Matriz de presença e ausência de genes no pangenoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 e linhagens correlatas. A matriz hierárquica exibe a distribuição dos genes em core, shell e cloud genomes, demonstrando a similaridade genômica entre as linhagens analisadas

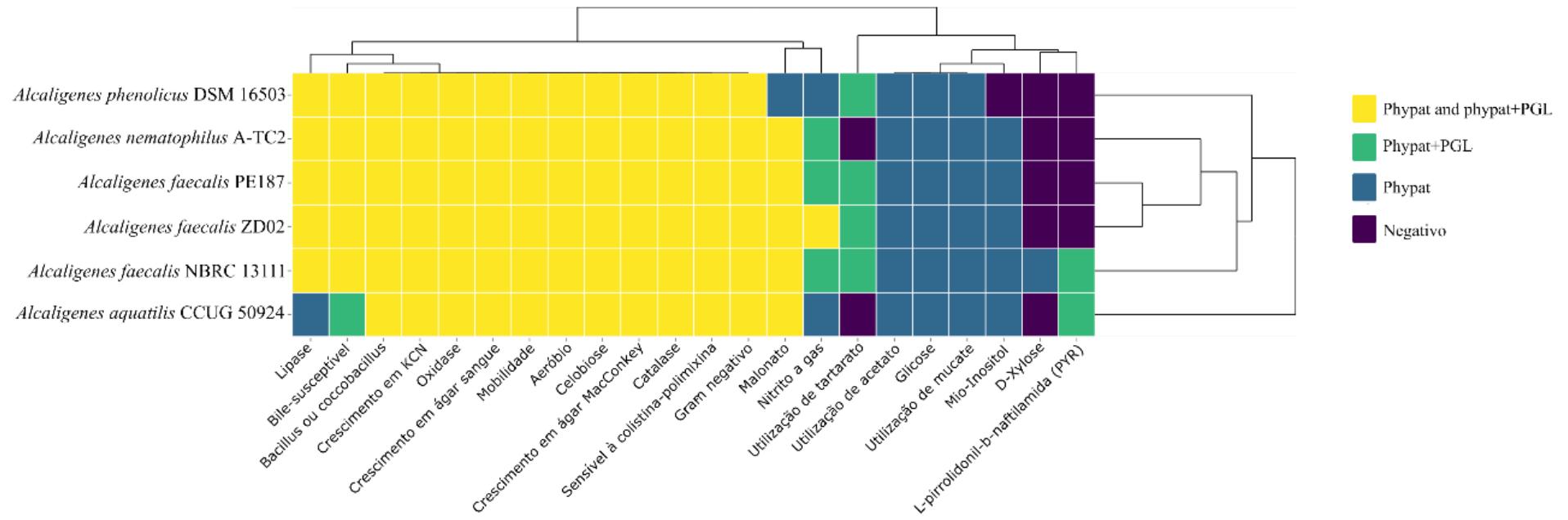
#### 6.2.4 Caracterização Fenotípica in Silico

A predição fenotípica *in silico* permite comparar características metabólicas e fisiológicas entre microrganismos com base em seus genomas. Com esse intuito, a análise preditiva de *Alcaligenes faecalis* PE 187 foi realizada, de modo que os fenótipos com predição negativa em todas as linhagens foram excluídos da representação gráfica (Figura 8). Os resultados indicam que *A. faecalis* PE 187 apresenta um perfil fenotípico altamente semelhante a *A. faecalis* ZD02, o que corrobora a proximidade filogenômica e funcional dessas linhagens. Ambas demonstraram predições positivas para catalase, oxidase e mobilidade, características comuns em espécies do gênero *Alcaligenes* (Pedrosa-Silva & Venancio, 2023). Essa similaridade sugere sobreposição metabólica significativa entre as linhagens analisadas, especialmente no metabolismo de substratos e na resistência a condições ambientais adversas.

A assimilação de diferentes substratos revelou padrões distintos entre as linhagens. *A. faecalis* PE 187 demonstrou predição positiva para assimilação de glicose e celobiose, indicando um metabolismo versátil em relação a carboidratos. Além disso, a predição positiva para a redução de nitrito a gás de *A. faecalis* PE 187 sugere uma potencial capacidade de participação no ciclo do nitrogênio, característica relevante para seu nicho ecológico (Chen *et al.*, 2021).

A ausência de predição para fatores de virulência como beta-hemólise, produção de coagulase e DNAse, reforça o caráter não patogênico dessa estirpe, em contraste a linhagens clínicas frequentemente associadas a infecções hospitalares. Esse achado é particularmente relevante para aplicações biotecnológicas seguras, pois indica que a estirpe pode ser explorada para biorremediação e bioinoculação com baixo risco de virulência (Adabi *et al.*, 2022). De fato, estudos recentes destacam o potencial de *A. faecalis* na biorremediação em virtude da sua capacidade de degradar compostos orgânicos e promover a reciclagem de nutrientes em ecossistemas naturais (Pedrosa-Silva & Venancio, 2023).

A predição positiva para lipase e mobilidade em *A. faecalis* PE 187 sustenta seu potencial envolvimento na degradação de compostos orgânicos complexos, incluindo hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), conforme descrito em outras linhagens do gênero (Singha *et al.*, 2017). Além disso, sua capacidade de assimilação de glicose e outros substratos pode estar relacionada à produção de polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros biodegradáveis de interesse industrial. Essas características reforçam a relevância de *A. faecalis* PE 187 para aplicações biotecnológicas voltadas tanto para a remediação ambiental quanto para a bioprodução sustentável de polímeros.



**Figura 12.** Mapa de predição fenotípica in silico de *Alcaligenes faecalis* PE 187. A matriz de calor exibe as diferenças entre os modelos Phypat e Phypat+PGL, permitindo a visualização de fenótipos compartilhados e variações entre linhagens correlatas

### 6.2.5 *Predição de genes homólogos associados à degradação de poliamida e síntese de polihidroxialcanoatos*

A identificação de genes homólogos envolvidos na degradação de poliamida (PA) e na biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) no genoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 foi realizada por meio de Modelos Ocultos de Markov (HMMs), utilizando o software HMMER v3.3.2. Foram utilizadas sequências de referência dos genes *nylA*, *nylB*, *nylC*, *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaR* e *phaZ*, previamente descritos na literatura, para a construção de perfis HMM. Os genes da família *nyl* estão relacionados às etapas iniciais da degradação da PA, enquanto os genes da família *pha* compõem o aparato enzimático necessário à biossíntese de PHAs, polímeros de reserva com potencial aplicação industrial como bioplásticos biodegradáveis (Negoro, 2021). Para a busca por homólogos, foram adotados como critérios de significância um E-value  $\leq 1e-20$  e um Bit Score  $\geq 50$ , conforme estabelecido em estudos voltados à triagem genômica de genes funcionais em microrganismos ambientais (Pappala, 2022). Embora valores de E-value abaixo de 1e-20 indiquem confiabilidade estatística na correspondência entre sequências, a interpretação funcional deve ser feita com cautela, especialmente para genes com valores próximos ao limiar adotado, sendo recomendadas análises complementares para confirmação funcional.

Dentre os genes analisados, *nylA*, que codifica a enzima 6-aminohexanoato-cíclico-dímero hidrolase, e *nylB*, responsável pela codificação da 6-aminohexanoato-linear-oligômero hidrolase, foram detectados no genoma da cepa com valores significativos de similaridade. Essas enzimas atuam de forma sequencial na degradação inicial da PA6, promovendo a clivagem de seus oligômeros cíclicos e lineares, respectivamente (Negoro *et al.*, 2000; Negoro, 2021). O gene PE\_187\_1660 apresentou a maior similaridade com *nylA*, com E-value de 3.8e-95, sugerindo um forte potencial para degradação de ciclodímeros derivados da PA. Outros genes, como PE\_187\_887, PE\_187\_3509 e PE\_187\_480, também foram identificados como possíveis homólogos de *nylA*, com E-values de 3.2e-53 a 1.8e-36, valores que conferem boa confiabilidade quanto à homologia. Já os

homólogos de *nylB*, como os genes PE\_187\_1232 (E-value de 1.5e-14) e PE\_187\_1639 (E-value de 1.3e-13), apresentaram valores próximos ao limiar mínimo de corte adotado. Embora inferiores a 1e-10, o que os torna aceitáveis na literatura, esses achados demandam atenção, pois podem representar variantes funcionais com menor conservação de domínio (Satoh *et al.*, 2021). Nenhum homólogo de *nylC* foi identificado dentro dos critérios estabelecidos, o que pode estar relacionado a uma elevada divergência na sequência desse gene entre diferentes espécies, conforme relatado por Negoro *et al.* (2023). Assim, a ausência de detecção pode refletir limitações da ferramenta de busca e não a inexistência do gene no genoma analisado, sendo recomendadas abordagens complementares, como transcritômica ou expressão heteróloga, para investigação adicional.

Apesar dos genes *nyl* não terem sido previamente descritos em *A. faecalis*, a presença de *nylA* e *nylB* no genoma da estirpe *A. faecalis* PE 187 revela um potencial inexplorado para a degradação de PA. Estudos como o de Gatz-Schrupp *et al.* (2020) e Negoro *et al.* (2021) mostraram a presença dos genes *nylA*, *nylB* e *nylC* em *Pseudomonas* sp. e *Flavobacterium* sp. degradadoras de nylon. A enzima *NylC*, codificada pelo gene *nylC* de *Flavobacterium*, foi otimizada estruturalmente por meio de simulações de dinâmica molecular e mutações sítio-dirigidas para melhorar sua eficiência na degradação de poliamidas (Puetz *et al.*, 2024). A descoberta de genes relacionados à degradação de poliamida em *A. faecalis* PE 187 indica um potencial metabólico ainda pouco descrito para essa espécie, justificando estudos funcionais adicionais.

Em relação ao potencial de biossíntese de PHAs, foram identificados homólogos com alta significância para os genes *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaR* e *phaZ*. O gene *phaA* (PE\_187\_879) codifica a  $\beta$ -cetotiolase, que catalisa a condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA; *phaB* (PE\_187\_2637) codifica a acetoacetil-CoA redutase, que converte esse composto em (R)-3-hidroxibutiril-CoA; e *phaC* (PE\_187\_2638) codifica a PHA sintase, enzima chave para a polimerização dos monômeros em polímeros intracelulares (Chen & Jiang, 2018; Quach *et al.*, 2022). Esses três genes compõem o núcleo funcional da via de biossíntese dos PHAs, e seus E-values

variando entre 7.8e-103 e 6.4e-179 indicam alta conservação funcional. O gene *phaR* (PE\_187\_2636), que atua como regulador transcracional dessa via, e *phaZ* (PE\_187\_1064), uma hidrolase responsável pela degradação intracelular de PHAs, também foram identificados com E-values altamente significativos.

**Tabela 2.** Genes homólogos identificados no genoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 relacionados à degradação de poliamida (*NylA*, *NylB*) e biossíntese de polihidroxialcanoatos (*PhaA*, *PhaB*, *PhaC*, *PhaR*, *PhaZ*), com respectivos valores de E-value, Bit Score Referências bibliográficas que embasam as funções previstas estão indicadas entre parênteses.

Gene Identificado	Gene de Referência	E-value	Bit Score
PE_187_1660	<i>NylA</i>	3.8e-95	317.3
PE_187_887	<i>NylA</i>	3.2e-53	178.9
PE_187_3509	<i>NylA</i>	2.9e-48	162.6
PE_187_480	<i>NylA</i>	3.6e-46	155.7
PE_187_1232	<i>NylB</i>	1.5e-14	51.5
PE_187_1639	<i>NylB</i>	1.3e-13	48.4
PE_187_879	<i>PhaA</i>	1.4e-173	575.1
PE_187_2637	<i>PhaB</i>	7.8e-103	340.8
PE_187_2638	<i>PhaC</i>	6.4e-179	593.5
PE_187_2636	<i>PhaR</i>	3.1e-65	217.9
PE_187_1064	<i>PhaZ</i>	1.1e-27	94.8

A presença simultânea de genes funcionalmente associados à degradação da poliamida e à biossíntese de PHAs no genoma de *A. faecalis* PE 187 sugere a existência de um aparato metabólico coordenado capaz de converter resíduos plásticos sintéticos em biopolímeros. Essa combinação de funções é pouco descrita na literatura e destaca essa cepa como uma candidata promissora para aplicações biotecnológicas voltadas à biorremediação e à reciclagem biológica de materiais plásticos.

### **6.2.6 Anotação Funcional e Predição de Vias Metabólicas**

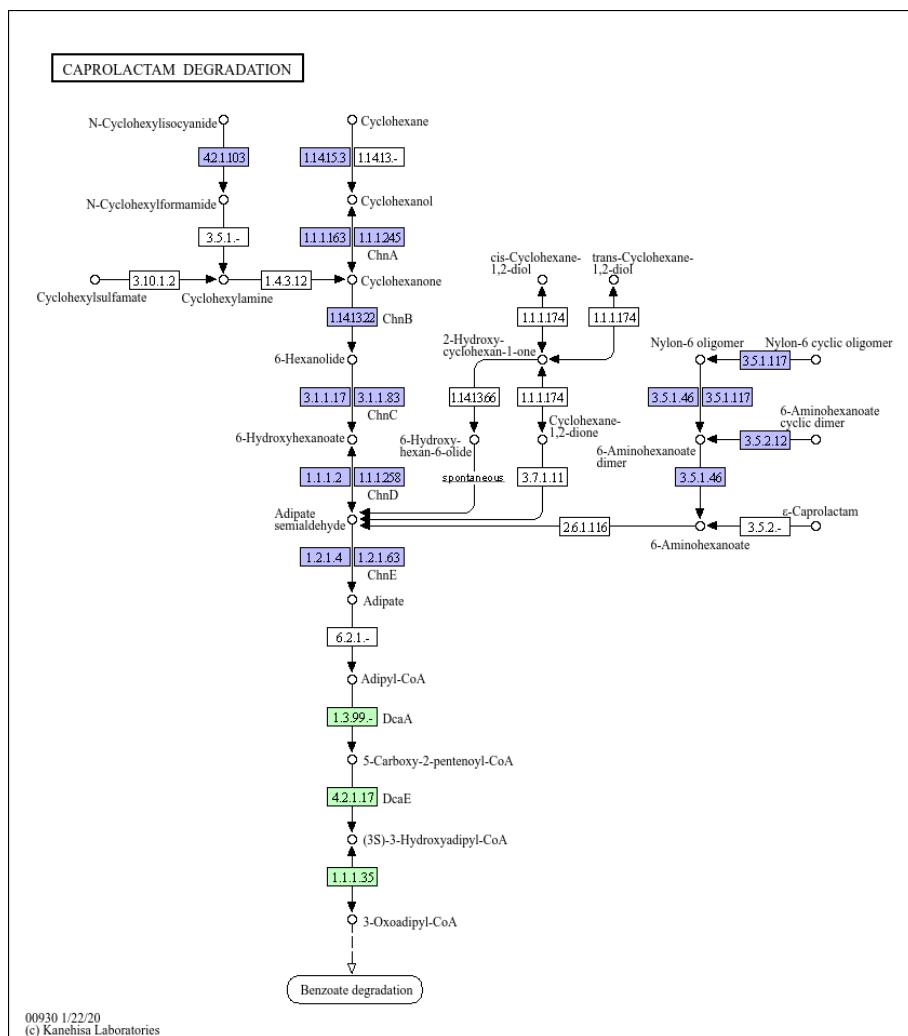
A análise funcional do genoma revelou a presença de genes associados à via de degradação da caprolactama, relacionada a degradação de PA6, conforme identificado no KEGG Mapper (figura 10). Foram detectadas enzimas-chave envolvidas na conversão da caprolactama em intermediários metabólicos, os quais podem ser posteriormente integrados a outras vias, como a de degradação do benzoato. Esses resultados sugerem que *Alcaligenes faecalis* PE 187 apresenta potencial para degradar poliamidas, como o nylon-6, por meio de rotas metabólicas específicas.

Foram identificados genes que codificam as enzimas DcaA (EC:1.3.99.), DcaE (EC:4.2.1.17) e uma desidrogenase adicional (EC:1.1.1.35), responsáveis pela conversão de adipil-CoA em 3-oxo-adipil-CoA, um intermediário posteriormente metabolizado em rotas secundárias. Contudo, algumas enzimas pertencentes às etapas iniciais da via de degradação da caprolactama não tiveram suas funções completas detectadas no genoma, o que pode sugerir que *A. faecalis* dependa da ação de enzimas extracelulares ou da interação com outros microrganismos, em consórcio, para completar a degradação desse composto (figura 9).

Adicionalmente, a presença de genes homólogos a *nylA* e *nylB*, previamente identificados no genoma da estirpe, fortalece a hipótese de que *A. faecalis* seja capaz de degradar oligômeros derivados de poliamidas. Esses genes codificam enzimas conhecidas por sua atuação na degradação do nylon, podendo atuar de forma sinérgica com as vias metabólicas descritas, ampliando a capacidade de degradação de polímeros sintéticos. Estudos anteriores demonstraram que algumas bactérias são capazes de metabolizar poliamidas mesmo na ausência de uma via completa de degradação da caprolactama. Nesse sentido, já foi relatada a capacidade de *Arthrobacter citreus* para converter caprolactama em ácido 6-aminocapróico e ácido glutâmico (Baxi *et al.*, 2019). Similarmente, *Brevibacterium epidermidis* demonstrou capacidade de degradar tanto caprolactama quanto oligômeros

de nylon-6 (Esikova *et al.*, 2023), enquanto *Pseudomonas jessenii* foi descrita por ser capaz de metabolizar caprolactama mesmo na ausência da via metabólica completa (Otzen *et al.*, 2018).

Isso reforça a hipótese de que *Alcaligenes faecalis* PE 187, apesar da ausência de algumas funções enzimáticas completas da via de degradação da caprolactama, pode empregar mecanismos alternativos ou enzimas ainda não caracterizadas para completar esse processo. Para validar essa hipótese, foram realizadas culturas de *Alcaligenes faecalis* PE 187 utilizando a PA como única fonte de carbono e energia, a fim de avaliar a capacidade dessa estirpe para degradar esse polímero.



**Figura 13** Reconstrução da via de degradação da caprolactama identificada em *Alcaligenes faecalis* PE 187. As enzimas destacadas em verde (EC) correspondem a funções enzimáticas completamente identificadas no genoma. As enzimas em vermelho indicam funções parcialmente identificadas, enquanto aquelas em branco representam etapas da via não identificadas no genoma da cepa.

Em relação ao potencial de biossíntese de PHAs a análise funcional do genoma de *Alcaligenes faecalis* PE 187 revelou a presença de genes associados ao metabolismo do butanoato, conforme observado na reconstrução dessa via metabólica a partir dos dados genômicos (Figura 9). O metabolismo do butanoato está diretamente relacionado à produção e degradação de compostos intermediários que podem ser utilizados como substratos para a síntese de PHAs, como ácidos graxos de cadeia curta. A biossíntese desses biopolímeros ocorre a partir de precursores derivados do metabolismo do butanoato, como acetil-CoA e acetoacetil-CoA, que alimentam a rota de síntese do polihidroxibutirato (PHB). As enzimas codificadas pelos

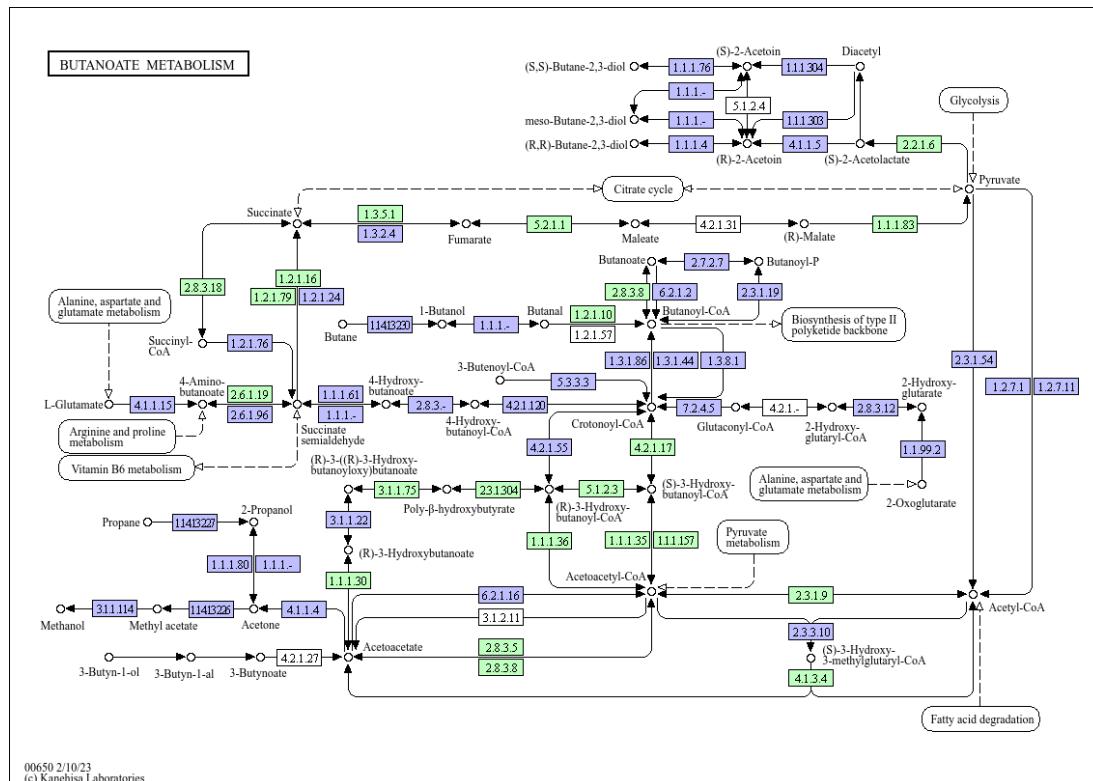
genes *phaA*, *phaB* e *phaC*, previamente identificados no genoma da estirpe, atuam sequencialmente na conversão desses intermediários em PHB, um dos principais tipos de PHAs. A identificação desses genes-chave no genoma de *A. faecalis* PE 187 reforça seu potencial capacidade de sintetizar PHAs a partir de precursores derivados do metabolismo do butanoato, o que é consistente com estudos anteriores que descrevem essa via como central para a produção microbiana de biopolímeros (De Eugenio *et al.*, 2010; Urtuvia *et al.*, 2018).

Nessa reconstrução da via metabólica foram detectados genes que codificam enzimas responsáveis pela conversão de butanoato em intermediários do ciclo do ácido cítrico e da biossíntese de PHAs, incluindo a acetolactato sintase, 3-hidroxiisobutirato desidrogenase, aldeído desidrogenase, além de outras enzimas-chave que atuam na conversão de metabólitos intermediários em precursores para a síntese de PHAs. A presença dessas enzimas sugere que *A. faecalis* PE 187 pode metabolizar ácidos graxos derivados da degradação de polímeros sintéticos, como a poliamida. Essas evidências indicam que a bactéria pode utilizar fragmentos resultantes da degradação da PA como fonte de carbono, direcionando-os para vias centrais do metabolismo celular.

A regulação desses processos metabólicos possivelmente é influenciada por genes regulatórios como *phaR* e *phaZ*, identificados no genoma da *A. faecalis* PE 187, que estão envolvidos na síntese e na degradação dos PHAs (Zheng *et al.*, 2020;). O gene *phaR* atua como regulador transcripcional da expressão dos genes de biossíntese, enquanto *phaZ* codifica a PHA depolimerase, responsável pela degradação do polímero quando necessário (ESCAPA *et al.*, 2012; Alvarez-Santullano *et al.*, 2021). A presença simultânea desses genes sugere que a estirpe é capaz de ajustar dinamicamente a produção e degradação dos PHAs em resposta às condições ambientais e à disponibilidade de substratos.

Com base na via reconstruída a partir dos genes identificados, é possível inferir que *A. faecalis* PE 187 tem a capacidade de utilizar não apenas intermediários clássicos do metabolismo do butanoato, mas também produtos oriundos da degradação da poliamida (figura 10). Fragmentos derivados da degradação enzimática da poliamida poderiam ser convertidos em

metabólitos, tais como adipato e caprolactama, os quais seriam posteriormente direcionados para a síntese de acetil-CoA, integrando-se à via do butanoato e, consequentemente, contribuindo para a biossíntese de PHAs (PARK *et al.*, 2012).



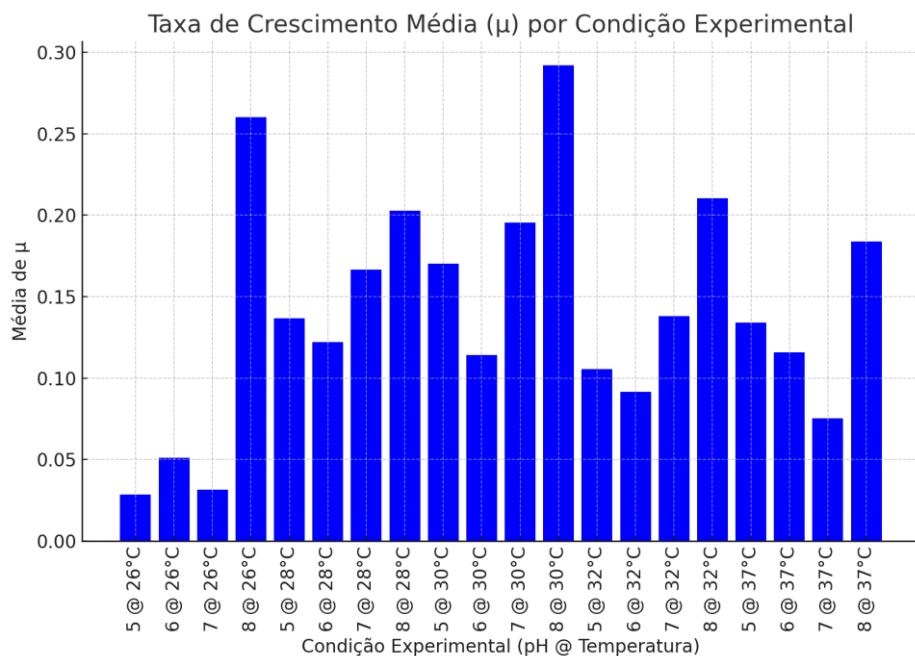
**Figura 14.** Reconstrução da via metabólica do butanoato em *Alcaligenes faecalis* PE 187. Em verde estão indicadas as funções enzimáticas completas identificadas no genoma da linhagem estudada; em azul, as funções enzimáticas incompletas e em branco as funções enzimáticas não identificadas. As rotas metabólicas destacadas mostram a conversão de intermediários, como acetil-CoA e acetoacetil-CoA, envolvidos diretamente na biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHAs).

### 6.3 Avaliação do potencial de biodegradação da PA por *Alcaligenes faecalis* PE 187

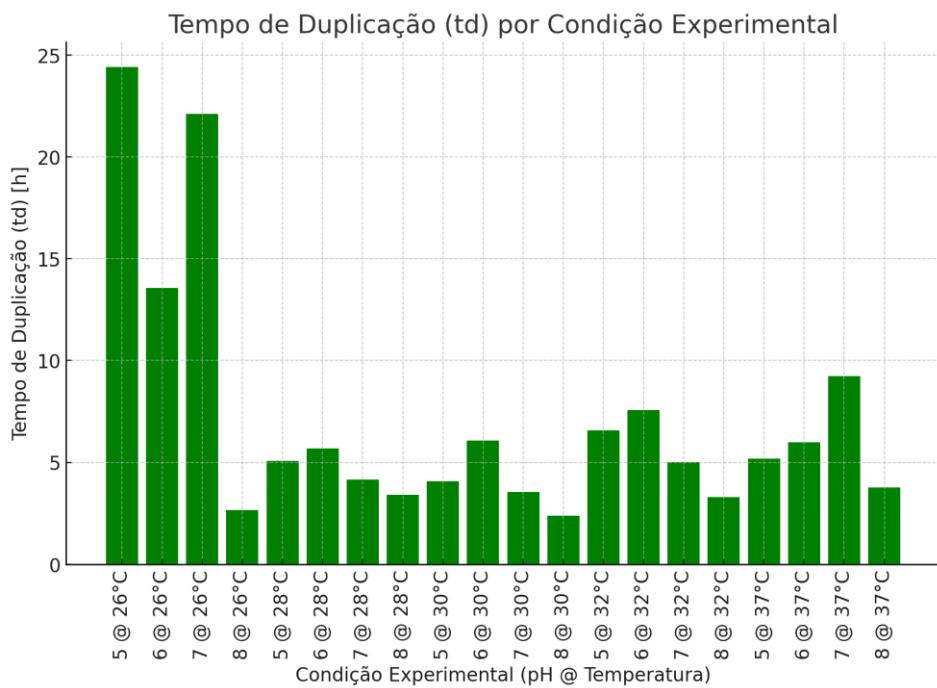
Para otimizar os cultivos de *Alcaligenes faecalis* PE 187 em MMM contendo PA como única fonte de carbono, foram conduzidos ensaios a fim de determinar as melhores condições de pH e temperatura. Este procedimento é particularmente relevante para aplicações biotecnológicas que visam a maximizar o crescimento bacteriano e a garantir resultados confiáveis em ensaios subsequentes (Rosso *et al.*, 1995; Mohkam *et al.*, 2020). Assim, a

linhagem foi cultivada em placas de 96 poços submetidas a diferentes combinações de pH e temperatura.

Os resultados confirmaram que ambos os fatores influenciaram significativamente sua taxa de crescimento específica ( $\mu$ ). O crescimento ótimo foi observado a 30°C e pH 8, condição em que a bactéria apresentou a maior taxa de crescimento ( $\mu = 0,292 \text{ h}^{-1}$ ) e o menor tempo de duplicação ( $td = 2,37 \text{ h}$ ). Em contraste, temperaturas mais baixas, como 26°C, foram menos favoráveis, apresentando tempos de duplicação significativamente mais longos ( $td = 24,43 \text{ h}$  em pH 5) e, consequentemente, menor crescimento.

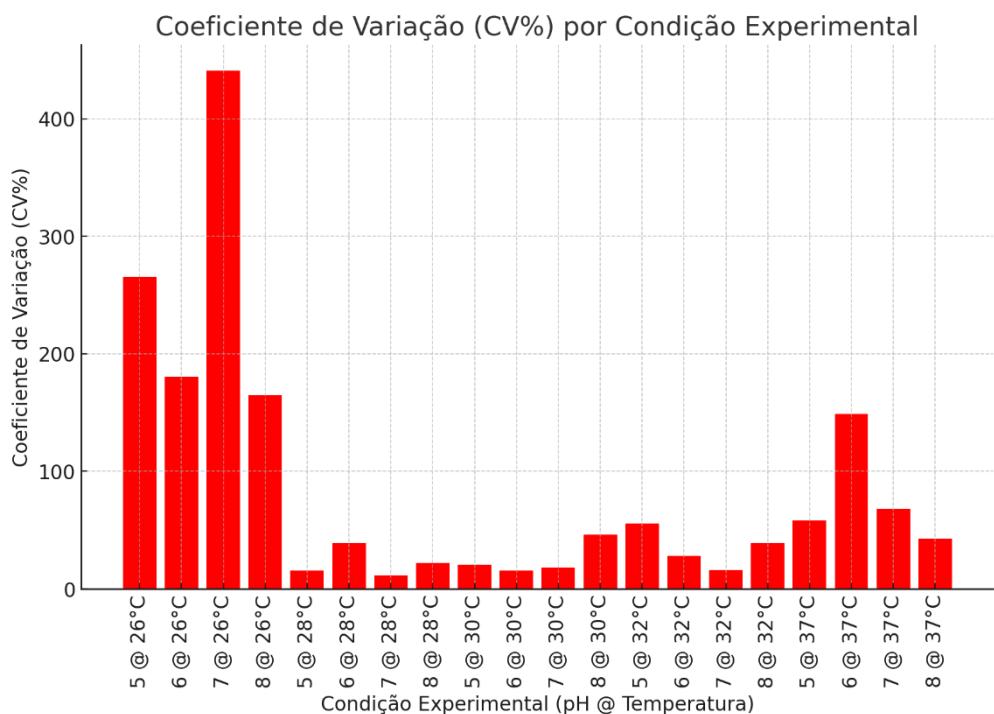


**Figura 15.** Taxa de crescimento específica média de *Alcaligenes faecalis* PE 187 em diferentes condições experimentais.



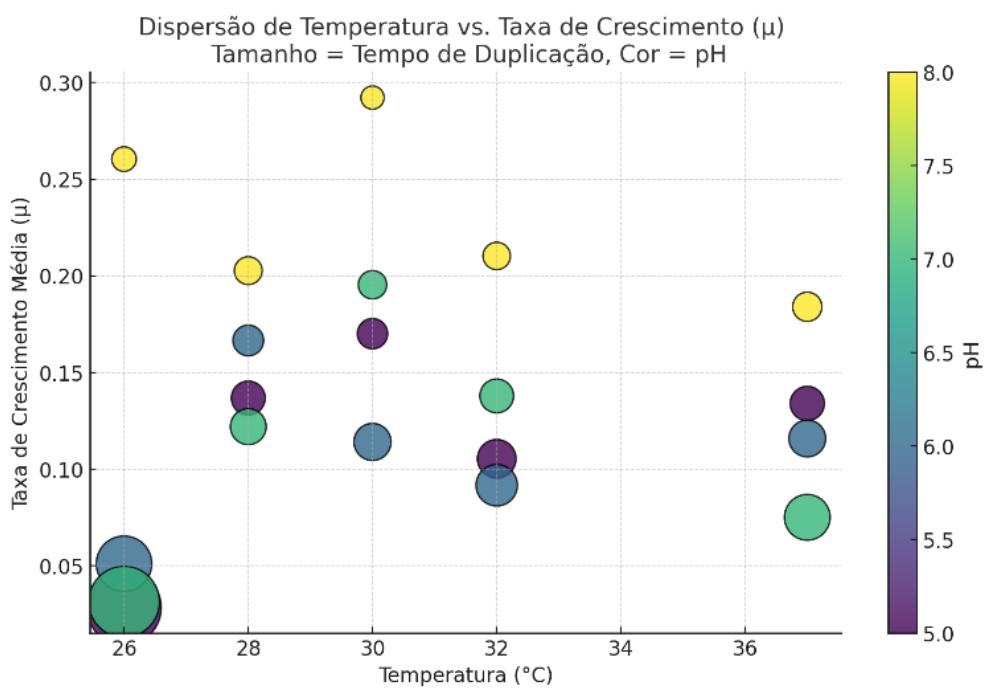
**Figura 16.** Tempo de duplicação de *Alcaligenes faecalis* PE 187 em diferentes condições experimentais.

A análise do coeficiente de variação (CV%) (figura 11) revelou que a combinação de 28°C e pH 6 apresentou a menor dispersão entre as replicatas (CV% = 15,29%), o que pode indicar maior estabilidade experimental. Já as condições extremas, como 26°C em pH 5, obtiveram os maiores valores de CV% (441,08% para pH 7 a 26°C) e menor previsibilidade dos resultados. A análise estatística confirmou que a temperatura acarretou um efeito significativo sobre a taxa de crescimento ( $p = 0,0056$ , teste de *Kruskal-Wallis*). O teste post-hoc de Dunn indicou que 26°C diferiu significativamente de 28°C ( $p = 0,015$ ) e de 30°C ( $p = 0,032$ ), mas não foi observada diferença estatística entre 28°C e 30°C ( $p = 0,241$ ), sugerindo que ambas as temperaturas são adequadas para o crescimento ótimo da linhagem



**Figura 17.** Coeficiente de variação da taxa de crescimento específica de *Alcaligenes faecalis* PE 187 em diferentes condições experimentais. Valores elevados de CV% indicam maior dispersão dos dados entre as replicatas, enquanto valores mais baixos sugerem maior reproduzibilidade dos experimentos.

A comparação entre as condições de 30°C em pH 8 e 28°C em pH 6 destaca um aspecto relevante na escolha das condições experimentais. Enquanto a primeira condição favorece o crescimento mais rápido e é indicada para a maximização da biomassa, a segunda apresenta maior estabilidade experimental e menor variabilidade nos dados, sendo recomendada para experimentos que exigem maior reproduzibilidade, como ensaios de expressão gênica ou produção de metabólitos secundários (Mohkam *et al.*, 2020). A figura 11 permite a observação da dispersão das condições experimentais considerando a temperatura, taxa de crescimento e tempo de duplicação.

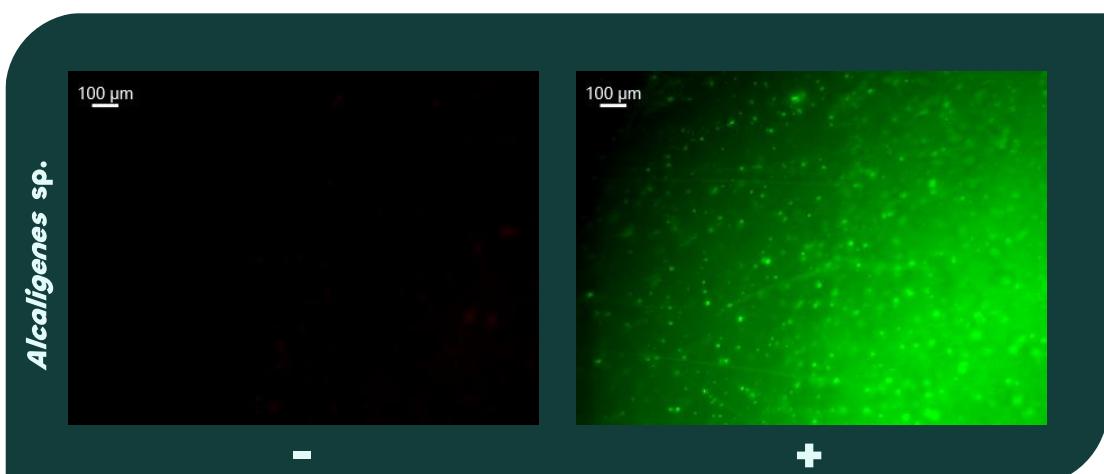


**Figura 18.** Dispersão de Temperatura vs. Taxa de Crescimento Específica ( $\mu$ ) para *Alcaligenes faecalis* PE 187. Cada ponto representa uma combinação específica de temperatura e pH testada. A cor dos círculos indica o pH da condição experimental, de acordo com a barra de cores lateral (5.0 a 8.0). O tamanho dos círculos é proporcional ao tempo de duplicação (td), sendo círculos maiores associados a tempos de duplicação mais longos. Os maiores valores de  $\mu$  foram observados em temperaturas próximas de 30°C e pH 8, enquanto as menores taxas de crescimento estão concentradas em temperaturas mais baixas (26°C).

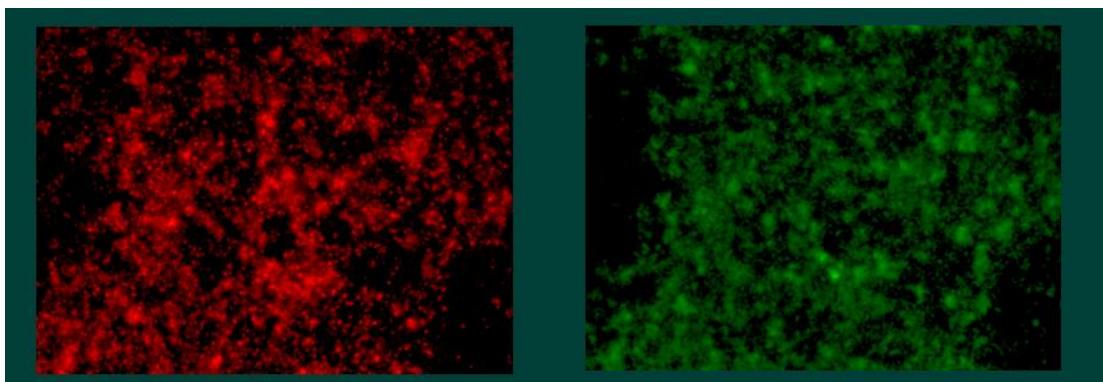
Com base nos resultados obtidos para a determinação das condições ótimas de crescimento, foi possível definir os parâmetros adequados para a realização dos ensaios prolongados de cultivo em MMM suplementado com PA como única fonte de carbono. Considerando que o maior crescimento foi observado a 30°C em pH 8 e que a maior estabilidade experimental foi encontrada a 28°C em pH 6, essas condições foram selecionadas como referência para o cultivo de *Alcaligenes faecalis* PE 187 em filmes de PA.

### 6.3.1 Cultivo de *Alcaligenes faecalis* PE 187 em meio mínimo mineral contendo filmes de poliamida

Com base nos resultados referentes às condições ótimas de crescimento, foi possível definir os parâmetros adequados para a realização dos cultivos em MMM contendo PA como única fonte de carbono. Considerando que a maior estabilidade experimental foi encontrada a 28°C em pH 6, essas condições foram selecionadas para os cultivos posteriores de *Alcaligenes faecalis* PE 187. Assim, essa bactéria foi cultivada em MMM contendo filmes de PA por 90 dias, a fim de estimar a habilidade dessas células de manterem-se viáveis após longos períodos de cultivo. Para controle negativo a estirpe também foi cultivada em MMM com lâmina de vidro (figura 16). De fato, foi possível observar a completa colonização dos filmes de PA, além da vasta predominância de células vivas em contraste à reduzida evidência de morte celular (figura 15), ao contrário do resultado obtido no controle negativo (figura 16). Ainda, esse resultado sugere a potencial atividade das enzimas NylA e NylB, enzimas hidrolíticas capazes de degradar oligômeros de PA cujos foram identificados no genoma da estirpe.



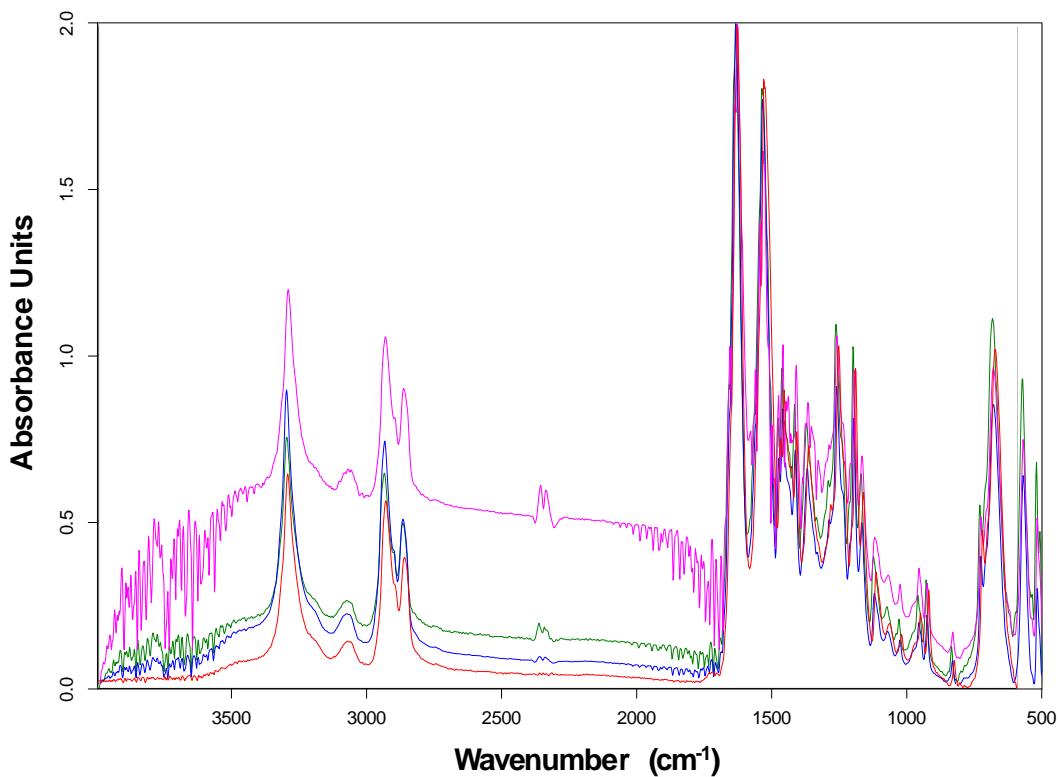
**Figura 19.** Viabilidade celular de *Alcaligenes* sp. após 90 dias de cultivo em MMM contendo um filme de poliamida como única fonte de carbono. As micrografias de fluorescência das células coradas com os fluoróforos SYTO9® e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD bacterial viability kit, Invitrogen, USA) representam as células vivas em verde (+) e as mortas em vermelho(-).



**Figura 20.** Viabilidade celular de *Alcaligenes* sp. após 30 dias de cultivo em MMM com lâmina de vidro. As micrografias de fluorescência das células coradas com os fluoróforos SYTO9® e iodeto de propídeo (LIVE/DEAD bacterial viability kit, Invitrogen, USA) representam as células vivas em verde (+) e as mortas em vermelho(-).

Para confirmar a indução de modificações químicas, estruturais e morfológicas à PA, os filmes tratados com *Alcaligenes* sp. por 90 dias foram submetidos à caracterização físico-química por meio da utilização de uma abordagem espectroscópica. Essa avaliação permitiu inferir se os microrganismos aderidos à PA e viáveis na presença deste polímero como única fonte de carbono e energia por tão longos períodos estavam, de fato, utilizando o potencial energético contido na molécula deste. Para tanto, os resultados obtidos para os polímeros bioticamente tratados foram comparados a controles negativo, caracterizados por filmes de PA não-tratados.

O perfil químico dos filmes de PA tratados e não tratados foi investigado por meio de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR). A partir dessa técnica foi possível acessar a alteração da composição química e a formação de novos grupos funcionais nos filmes de PA em resposta ao tratamento biótico. Os espectros de infravermelho dos filmes de PA revelaram diferenças entre os filmes tratados e não-tratados com *Alcaligenes faecalis* PE 187. (figura 17).



**Figura 21.** Espectro de infravermelho (ATR-FTIR) dos filmes de poliamida incubados por 90 dias com *Alcaligenes* sp. (azul, verde e magenta) em contraste ao filme controle não-tratado (vermelho). Os três espectros dos filmes tratados apresentam os resultados para cada uma das triplicatas biológicas analisadas.

A análise dos espectros de ATR-FTIR comparando os filmes de PA não-tratados e os tratados com *Alcaligenes* sp. revelou alterações químicas significativas, sugerindo um processo de degradação parcial do material polimérico. Os espectros foram normalizados para garantir uma comparação precisa entre as amostras. Observou-se uma redução na intensidade das bandas características da poliamida, especialmente nas regiões de 1650-1690  $\text{cm}^{-1}$  (Amida I, C=O), 1540-1580  $\text{cm}^{-1}$  (Amida II, N-H e C-N) e 1200-1300  $\text{cm}^{-1}$  (Amida III, C-N e N-H). Essa diminuição sugere uma possível quebra das ligações amida (-CONH-), principal estrutura do polímero, indicando que o microrganismo promoveu a degradação da matriz polimérica. Além disso, novos picos de absorção foram identificados na região entre 2250 e 2400  $\text{cm}^{-1}$ , os quais não estavam presentes no espectro da PA controle. Esses novos sinais podem ser atribuídos à formação de grupos isocianato (-N=C=O) e/ou grupos nitrila (-C≡N), possivelmente resultantes da degradação parcial a

poliamida e da modificação química dos fragmentos poliméricos. O espectro da PA biodegradada também apresentou um deslocamento global para cima quando comparado ao controle, indicando que houve uma alteração na superfície do material. Esse fenômeno pode estar relacionado a mudanças na rugosidade do filme, modificação na estrutura química da superfície ou redistribuição da matriz polimérica devido à ação enzimática do microrganismo.

A adesão microbiana a substratos poliméricos e sua viabilidade ao longo do tempo são fatores determinantes na biodegradação de polímeros sintéticos (Peixoto *et al.*, 2017). Após 90 dias de incubação, a análise de viabilidade celular revelou a presença de células metabolicamente ativas aderidas à superfície do filme de PA, indicando que *Alcaligenes* sp. foi capaz de se fixar e proliferar na interface sólido-líquido do polímero. Esse resultado sugere que o material pode ter fornecido condições favoráveis para o crescimento microbiano, seja como substrato energético ou como suporte físico para a formação de biofilme.

A colonização de superfícies poliméricas por microrganismos tem sido amplamente estudada no contexto da degradação de plásticos, com diversos trabalhos demonstrando que a adesão inicial e a formação de biofilmes são etapas fundamentais no processo de biodegradação (Mohanan *et al.*, 2020). Em particular, *Alcaligenes* sp. já foi relatado como um microrganismo capaz de degradar polímeros sintéticos, incluindo poliamidas, devido à produção de enzimas hidrolíticas como proteases e amidases (Oppermann *et al.*, 1998; Sudhakar *et al.*, 2007; Oudili *et al.*, 2024). O fato de as células permanecerem viáveis após 90 dias reforça a hipótese de que interações químicas e biológicas entre o microrganismo e o polímero ocorreram ao longo do experimento.

A análise espectroscópica por ATR-FTIR dos filmes de PA 6 incubados com *Alcaligenes* sp. evidenciou alterações químicas na estrutura do polímero, sugerindo um processo ativo de degradação microbiana. A redução na intensidade das bandas em  $1650\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$  (Amida I, C=O),  $1540\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$  (Amida II, N-H e C-N) e  $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  (Amida III, C-N e N-H) indica quebra parcial das ligações amida (-CONH-), um processo essencial para a

degradação da poliamida (Kolvenbach *et al.*, 2014). Isso é consistente com o efeito de enzimas como amidases, que promovem a clivagem da cadeia polimérica ao atacar as ligações amida (Heumann *et al.*, 2006).

Além da redução das bandas de absorção características da PA, novos picos foram detectados na região entre 2250 e 2400 cm<sup>-1</sup>, os quais não estavam presentes no espectro da PA controle. Esses novos sinais podem ser atribuídos à formação de grupos isocianato (-N=C=O) ou nitrila (-C≡N), produtos frequentemente associados à degradação oxidativa ou metabólica de poliamidas (Urbanek *et al.*, 2018). Isso sugere que a degradação promovida por *Alcaligenes* sp. gere fragmentos intermediários que contêm esses grupos funcionais, os quais podem posteriormente ser convertidos em metabólitos microbianos.

Outro fenômeno observado foi o deslocamento global do espectro da PA biodegradada, bem como um aumento na absorbância global em comparação ao controle. Esses efeitos podem estar relacionados a mudanças na rugosidade da superfície do filme, causadas pela degradação parcial do polímero, um fenômeno previamente descrito em estudos sobre a degradação microbiana de poliamidas e poliésteres (Zumstein *et al.*, 2018). A modificação na interação da superfície do filme com o infravermelho também pode estar associada à redistribuição da matriz polimérica devido à ação enzimática.

Os resultados obtidos indicam que *Alcaligenes* sp. apresente um potencial significativo para a degradação de poliamidas, demonstrado tanto pela sua capacidade de adesão e crescimento na superfície do polímero quanto pelas modificações químicas detectadas por espectroscopia. Isso reforça o papel desse microrganismo como uma ferramenta biotecnológica promissora para a biodegradação de plásticos à base de poliamida. Estudos futuros devem focar na identificação dos metabólitos resultantes da degradação, bem como na caracterização das enzimas envolvidas no processo.

## 7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados expostos nessa dissertação demonstram o potencial da estirpe *Alcaligenes faecalis* PE 187 na biodegradação da PA e na conversão de seus derivados em PHAs. A identificação de genes relacionados à degradação de PA, como *nylA* e *nylB*, bem como os associados à produção de PHAs (*PhaA*, *PhaB*, *PhaC*, *PhaR* e *PhaZ*), sugere que essa bactéria possui o aparato metabólico necessário para converter resíduos plásticos em biopolímeros de alto valor agregado. Adicionalmente, os ensaios experimentais indicaram que *Alcaligenes faecalis* PE 187 é capaz de aderir à poliamida e induzir modificações estruturais detectáveis por espectroscopia ATR-FTIR. Estes achados reforçam o potencial dessa estirpe para aplicações futuras na bioconversão sustentável de plásticos sintéticos.

As etapas futuras da pesquisa consistirão em: (i) analisar a produção de PHAs pela *Alcaligenes faecalis* PE. 187 em MMM com PA como única fonte de carbono; (ii) aprofundar a compreensão dos mecanismos regulatórios que controlam a expressão dos genes relacionados à degradação de PA e à síntese de PHAs; (iii) estudar a expressão desses genes sob diferentes condições ambientais, com foco especial na presença de PA; e (iv) validar e otimizar a funcionalidade dos genes identificados.

Por fim, os conhecimentos gerados a partir desse estudo podem fornecer uma base sólida para o desenvolvimento de biotecnologias inovadoras focadas tanto na remediação de poliamidas no meio ambiente quanto na produção sustentável de biopolímeros de alto valor agregado. A continuidade desta pesquisa durante o doutorado abrirá novas possibilidades para explorar plenamente o potencial biotecnológico da *Alcaligenes faecalis* PE 187, visando aplicações industriais que conciliem eficiência econômica com responsabilidade ambiental.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, Y. S. et al. Engineering adipic acid metabolism in *Pseudomonas putida*. **Metabolic Engineering**, v. 67, p. 29–40, set. 2021.
- ADABI, M.; HASHEMI, S. H.; SOMAYEH BAKHTIYARI. The First Study of Investigation of Clinical Isolates of Alcaligenes Xylosoxidans and Alcaligenes Faecalis by Phenotypic and Genetic Methods in Iran. **Iranian Journal of Medical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 148–154, 2022.
- 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.
- ALVAREZ-SANTULLANO, N. et al. Genome-Wide Metabolic Reconstruction of the Synthesis of Polyhydroxyalkanoates from Sugars and Fatty Acids by *Burkholderia* *Sensu Lato* Species. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1290, 2021.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Disponível em:
- ARAMVASH, A.; DASHTI AGHJEH, S. One-Factor-at-a-Time Optimization of Polyhydroxybutyrate Production and Growth of Alcaligenes eutrophus by Altering Culture Parameters and Incubation Time. **Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran**, v. 26, n. 4, p. 303–313, 2015.
- ASSIS, J. et al. Simultaneous Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and Extracellular Polymeric Substance (EPS) from Crude Glycerol from Biodiesel Production by Different Bacterial Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 6, p. 1110–1127, 2016.
- BASHARAT, Z. et al. Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 26 fev. 2018.
- BASHARAT, Z; YASMIN, A. Sulphonated azo dye decolorization by *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207: Insights from laboratory and computational analysis. **Biophysical Chemistry**, v. 286, p. 106806–106806, 1 jul. 2022.
- BAXI, N. N.; PATEL, S.; HANSOTI, D. An *Arthrobacter citreus* strain suitable for degrading  $\epsilon$ -caprolactam in polyamide waste and accumulation of glutamic acid. **AMB express**, v. 9, n. 1, p. 161, 2019.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T. et al. Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus*

necator using waste glycerol. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 391–397, 2012.

CHENG, G.-Q.; JIANG, X.-R. Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 53, p. 20–25, out. 2018.

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**, v. 68, n. 1, p. 461–466, 2018.

DANECEK, P. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. **GigaScience**, v. 10, n. 2, 29 jan. 2021.

DE EUGENIO, I. L. et al. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the *pha* genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1591–1603, 2010.

DE WITT, J. et al. Upcycling of polyamides through chemical hydrolysis and engineered *Pseudomonas putida*. **Nature Microbiology**, 10 fev. 2025.

DERAKHSHANI, H. et al. Completion of draft bacterial genomes by long-read sequencing of synthetic genomic pools. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, 2020.

DOU, Y. et al. Effect of composition on the crystallization, water absorption, and biodegradation of poly( $\epsilon$ -caprolactam-co- $\epsilon$ -caprolactone) copolymers. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2488, 2020.

EDDY, S. R. Accelerated Profile HMM Searches. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 10, 2011.

EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, 2019.

ESCAPA, I. F. et al. The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 1049–1063, 2012.

ESIKOVA, T. Z.; AKATOVA, E. V.; SOLYANIKOVA, I. P. Epsilon-Caprolactam- and Nylon Oligomer-Degrading Bacterium *Brevibacterium epidermidis* BS3: Characterization and Potential Use in Bioremediation. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 373, 2023.

FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

FELDER, S.; VU, N. A.; REESE, S.; SIMON, J.-W. *Experimental and Numerical Investigation of the Material Behavior of semi-crystalline Polyamide 6*. Tech. Mech., v. 40, n. 1, p. 22-30, 2020.

LI, X. et al. Effects of hydrogen-bonding density on polyamide crystallization kinetics. **Polymer**, v. 189, n. 122165, p. 122165, 2020.

Filt long. Disponível em: <https://github.com/rrwick/Filtlong>

FinchTV 1.4.0. Geospiza, Inc.; Seattle, WA, USA; <http://www.geospiza.com>)

FRANCISNEI PEDROSA-SILVA; VENANCIO, T. M. Comparative Genomics Reveals Novel Species and Insights into the Biotechnological Potential, Virulence, and Resistance of Alcaligenes. **Genes**, v. 14, n. 9, p. 1783–1783, 2023.

GATZ-SCHRUPP, J. et al. Isolation and genomic analysis of 11-aminoundecanoic acid-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. JG-B from nylon 11 enrichment culture. **Journal of Genomics**, v. 8, p. 16–20, 2020.

GAUTREAU, G. et al. PPanGGOLiN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. **PLOS Computational Biology**, v. 16, n. 3, p. e1007732, 2020.

**Global polyamide market size 2017-2025, by application.** Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/1286359/global-polyamide-market-size-by-application/>>. Acesso em: 20 fev. 2025.

Heng Li, Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences, **Bioinformatics**, Volume 34, Issue 18, September 2018, Pages 3094 3100

HEUMANN, S. et al. New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 69, n. 1-2, p. 89–99, 2006.

JOHNSTON, B. et al. Mass Spectrometry Reveals Molecular Structure of Polyhydroxyalkanoates Attained by Bioconversion of Oxidized Polypropylene Waste Fragments. **Polymers**, v. 11, n. 10, p. 1580, 2019.

KANZARIYA et al. Kinetics of biomass and polyhydroxyalkanoates synthesis using sugar industry waste as carbon substrate by Alcaligenes sp. NCIM 5085. **Journal of environmental biology**, v. 44, n. 4, p. 612–622, 2023.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.

KOICHIRO, T. et al. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution** 38:3022-3027, 2021.

KOLMOGOROV, M. et al. metaFlye: scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs. **Nature Methods**, v. 17, n. 11, p. 1103–1110, 2020.

KOLVENBACH, B. A. et al. Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 8–14, jun. 2014.

KURIMA, A. et al. Spin-trapping analysis of the thermal degradation reaction of polyamide 66. **Polymers**, v. 14, n. 21, p. 4748, 2022.

KUROKAWA, M.; YING, B.-W. Precise, High-throughput Analysis of Bacterial Growth. **Journal of Visualized Experiments**, n. 127, 19 set. 2017.

LANG, J. et al. Genomic and resistome analysis of *Alcaligenes faecalis* strain PGB1 by Nanopore MinION and Illumina Technologies. **BMC Genomics**, v. 23, n. S1, 2022.

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

Li H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v1 q

LI, M.; WILKINS, M. Lignin bioconversion into valuable products: fractionation, depolymerization, aromatic compound conversion, and bioproduct formation. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 1, n. 2, p. 166–185, 2020.

MANNI, M. et al. BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 10, p. 4647–4654, 2021.

MCKEEN, L. W. Polyamide plastics (nylons). Em: **Fatigue and Tribological Properties of Plastics and Elastomers**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 199–260.

MOHANAN, N. et al. Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 1664-302, 2020.

MOHKAM, M. et al. Isolation and identification of novel L-Methioninase producing bacteria and optimization of its production by experimental design method. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101566–101566, 2020.

NEGORO, S. et al. Chapter Seventeen Structural and functional characterization of nylon hydrolases. **Methods in Enzymology**, v. 648, p. 357–389, 2021.

OH, Y.-R.; JANG, Y.-A.; EOM, G. T. Microbial production of adipic acid from 6-hydroxyhexanoic acid for biocatalytic upcycling of polycaprolactone. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 181, p. 110521–110521, 2024.

- OPPERMANN, F. B.; PICKARTZ, S.; STEINBÜCHEL, A. Biodegradation of polyamides. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 337–344, 1998.
- OTZEN, M.; PALACIO, C. M.; JANSSEN, D. B. Characterization of the caprolactam degradation pathway in *Pseudomonas jessenii* using mass spectrometry-based proteomics. v. 102, n. 15, p. 6699–6711, 2018.
- OULIDI et al. Biodegradation of polyamide 6 by *Lysinibacillus* sp, *Alcaligene faecalis* and *Enterococcus faecalis*. **Cleaner chemical engineering**, v. 3, p. 100054–100054, 2022.
- PAPPALA, S. Biological Analysis and Linear Block Hidden Markov Model for Gene and Labelled. **Global Journal of Computer Science and Technology**, v. 22, n. H1, p. 13–17, 2022.
- PARK, S. J. et al. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1196–1206, 1 nov. 2012.
- 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.
- PEIXOTO, J. Prospecção de microrganismos com potencial para a biodegradação de polietileno. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Brasília, 2013.
- PUETZ, H. et al. KnowVolution of an efficient polyamidase through molecular dynamics simulations of incrementally docked oligomeric substrates. 2024.
- REDDY, B. Advancements in Microbial Genome Sequencing and Microbial Community Characterization. In: **Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems**. Singapore: Springer, [s.d.]. p. 87–114.
- REDDY, V. U. N. et al. Review of the Developments of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). **Bioengineering**, v. 9, n. 5, p. 225, 2022.
- RINA RANI RAY; SMARANIKA PATTNAIK. *Alcaligenes faecalis*: A bacterium for sustainable management of environment. **Environmental Quality Management**, 2024.
- RODRIGUEZ-R, L. M.; KONSTANTINIDIS, K. T. The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. 2016.
- ROSSO, L. et al. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 2, p. 610–616, 1995.

SAGONG, H.-Y. et al. Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 10, p. 790–805, 2018.

SAITO, Y.; JIN, I.; YAMADA, M. Marine bacteria have multiple polyamide 4-degrading enzymes. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 70, n. 3, p. n/a-n/a, 2024.

SASANAMI, Y. et al. Purification and characterization of an enzyme that degrades polyamide 4 into gamma-aminobutyric acid oligomers from *Pseudoxanthomonas* sp. TN-N1. **Polymer Degradation and Stability**, v. 197, p. 109868, 2022.

SCOTT et al. Phenotypic and Genetic Characterization of Polyhydroxyalkanoate Producing Bacterial Isolates from Hypersaline Water Body, Atlantic Ocean, Nigeria. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 23, n. 12, p. 1–14, 2023.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SINGHA, L. P.; KOTOKY, R.; PANDEY, P. Draft Genome Sequence of *Alcaligenes faecalis* BDB4, a Polyaromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium Isolated from Crude Oil-Contaminated Soil. **Genome Announcements**, v. 5, n. 48, 2017.

SINGHABOOT, P.; KAEWKANNETRA, P. A higher in value biopolymer product of polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by *Alcaligenes latus* in batch/repeated batch fermentation processes of sugar cane juice. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2081–2089, 2015.

SOHN, Y. J. et al. Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125693, 2021.

SOHN, Y. J. et al. Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: A review. **Bioresource Technology**, v. 340, p. 125693, 2021.

SUDHAKAR, M. et al. Marine bacteria mediated degradation of nylon 66 and 6. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 3, p. 144–151, 2007.

URBANEK, A. K.; RYMOWICZ, W.; MIROŃCZUK, A. M. Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 18, p. 7669–7678, 2018.

URTUVIA, V. et al. *Burkholderia xenovorans* LB400 possesses a functional polyhydroxyalkanoate anabolic pathway encoded by the pha genes and

- synthesizes poly(3-hydroxybutyrate) under nitrogen-limiting conditions. **International Microbiology**, v. 21, n. 1-2, p. 47–57, 2018.
- WALKER, B. J. et al. Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112963, 2014.
- WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 2017.
- WINNACKER, M. Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 11, p. 1900101, 2019.
- YAJIMA, T. et al. Bioconversion of biphenyl to a polyhydroxyalkanoate copolymer by Alcaligenes denitrificans A41. **AMB Express**, v. 10, n. 1, 2020.
- YAN, Q. et al. BIOSYNTHESIS AND THERMAL PROPERTIES OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-co-3-HYDROXYVALERATE) WITH LARGE VARIETY OF HYDROXYVALERATE CONTENTS BY BACILLUS CEREUS. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 25, n. 04, p. 341–34, 2007.
- YAP, P. P. X. et al. The impact of mechanical recycling on the degradation of polyamide. **Polymer degradation and stability**, v. 225, n. 110773, p. 110773, 2024.
- ZHENG, L. et al. Recycling and degradation of polyamides. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 8, p. 1742, 2024.
- ZHENG, Y. et al. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. **Metabolic Engineering**, v. 58, p. 82–93, 2020.
- ZHOU, Z. et al. METABOLIC: high-throughput profiling of microbial genomes for functional traits, metabolism, biogeochemistry, and community-scale functional networks. **Microbiome**, v. 10, n. 1, 2022.
- ZUMSTEIN, M. T. et al. Biodegradation of synthetic polymers in soils: Tracking carbon into CO<sub>2</sub> and microbial biomass. **Science Advances**, v. 4, n. 7, 2018.