

CAIO ISSAMU SOMIZA

BIOCONVERSÃO DE MONÔMEROS DE POLIETILENO TEREFALATO EM
PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR MICRORGANISMOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S696b
2024
Somiza, Caio Issamu, 1998-
Bioconversão de monômeros de polietileno tereftalato em
produtos biotecnológicos por microrganismos / Caio Issamu
Somiza. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (76 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.676>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Polímeros - Biodegradação. 2. Politereftalato de etileno.
3. Ácido tereftálico. 4. Etilenoglicol. 5. Biossurfactantes.
6. Exopolissacarídeos. 7. Polihidroxialcanoatos. I. Tótola,
Marcos Rogério, 1965-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 668.4192


CAIO ISSAMU SOMIZA

BIOCONVERSÃO DE MONÔMEROS DE POLIETILENO TEREFALATO EM
PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR MICRORGANISMOS


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovação: 01 de outubro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 CAIO ISSAMU SOMIZA
Data: 10/10/2024 17:14:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Caio Issamu Somiza
Autor

Documento assinado digitalmente
 MARCOS ROGERIO TOTOLA
Data: 10/10/2024 13:15:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcos Rogério Tótola
Orientador

Aos que fazem a roda girar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que me permitiram conduzir este trabalho em condições dignas e satisfatórias. A Deus, pela possibilidade de ser. À minha família, por apoiar meu crescimento. Aos meus amigos e colegas, pelas boas conversas e companhia. Aos servidores e professores da Universidade Federal de Viçosa. E aos que trabalham para manter a cidade e o país vivos e funcionantes.

Em especial, agradeço ao professor Tótola pelos ensinamentos teóricos e por manter meus pés no chão. Ao Alex, Letícia, Nívea e Rosa pelos serviços, favores, suporte, motivação, diligência e exemplo. E à minha querida amiga Isabela, pelas loucuras e experiências que compartilhamos nessa vida.

Por fim, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

RESUMO

SOMIZA, Caio Issamu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2024.
Bioconversão de monômeros de polietileno tereftalato em produtos biotecnológicos por microrganismos. Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Embora a reciclagem seja amplamente utilizada como solução para mitigar o acúmulo de resíduos plásticos, esse processo apresenta limitações consideráveis, como o alto consumo de energia, água e a utilização de solventes orgânicos tóxicos. Além disso, a reciclagem convencional não atende à crescente demanda por substituição dos polímeros sintéticos por biopolímeros, nem soluciona o problema dos resíduos plásticos já acumulados no ambiente. Nesse contexto, a bioconversão de plásticos surge como uma alternativa promissora, integrando a degradação de polímeros à produção de bioprodutos de alto valor agregado, de maneira mais sustentável tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico. O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar microrganismos capazes de degradar os monômeros de polietileno tereftalato (ácido tereftálico (TA) e etilenoglicol (EG)), e avaliar a produção de compostos com potencial de aplicação biotecnológica. Demonstrou-se que isolados bacterianos obtidos por culturas de enriquecimento foram capazes de produzir biopolímeros, exopolissacarídeos (EPS) e lipídeos a partir desses monômeros, com aplicações promissoras nas indústrias de bioplásticos, cosméticos e farmacêutica. Até este estudo, a produção de lipídeos e exopolissacarídeos não-celulósicos a partir de TA e EG não havia sido reportada, destacando o caráter inovador dos bioprocessos encontrados. Os resultados deste estudo podem fundamentar alternativas à reciclagem convencional, proporcionando novas formas de valorização de resíduos plásticos.

Palavras-chave: Bioconversão; Polietileno Tereftalato (PET); Ácido Tereftálico; Etilenoglicol; Biossurfactantes; Exopolissacarídeos; Polihidroxialcanoatos.

ABSTRACT

SOMIZA, Caio Issamu, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2024. **Bioconversion of Polyethylene Terephthalate Monomers into Biotechnological Products by Microorganisms.** Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Although recycling is widely used as a solution to mitigate the accumulation of plastic waste, this process has considerable limitations, such as high consumption of energy, water, and the use of toxic organic solvents. Furthermore, conventional recycling does not meet the growing demand for replacing synthetic polymers with biopolymers, nor does it solve the problem of plastic waste already accumulated in the environment. In this context, plastic bioconversion emerges as a promising alternative, integrating polymer degradation with the production of high-value-added bioproducts in a more sustainable way, both environmentally and economically. This study aimed to isolate and characterize microorganisms capable of degrading the monomers of polyethylene terephthalate, terephthalic acid (TA), and ethylene glycol (EG), and to evaluate the production of compounds with potential biotechnological applications. It has been demonstrated that bacterial isolates obtained from enrichment cultures were capable of producing biopolymers, exopolysaccharides (EPS), and lipids from these monomers, with promising applications in the bioplastics, cosmetics, and pharmaceutical industries. Until this study, the production of lipids and non-cellulosic exopolysaccharides from TA and EG had not been reported, highlighting the innovative nature of the bioprocesses identified. The results of this study may support alternatives to conventional recycling, providing new ways to valorize plastic waste.

Keywords: Bioconversion; Polyethylene Terephthalate (PET); Terephthalic Acid; Ethylene Glycol; Biosurfactants; Exopolysaccharides; Polyhydroxyalkanoates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flow diagram summarizing the screening process.	16
Figura 2: Selected studies risk-of-bias.	17
Figura 3: Crescimento dos isolados em MM contendo 40 g L ⁻¹ de ácido tereftálico (TA) como fonte de carbono e energia. Os pontos representam a média dos valores de DO ₆₀₀ após normalização por logaritmo neperiano. As barras representam a concentração de TA no sobrenadante da cultura e as quantificações foram realizadas para os dias 1, 3, 5, 8 e 11. Todas as análises foram realizadas com três repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias correspondentes.....	57
Figura 4: Crescimento dos isolados em MM contendo 40 g L ⁻¹ de etilenoglicol (EG) como fonte de carbono e energia. Os pontos representam a média dos valores de DO ₆₀₀ após normalização por logaritmo neperiano. As barras representam a concentração de EG no sobrenadante da cultura. Todas as análises foram realizadas com três repetições experimentais. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias correspondentes.....	58
Figura 5: Concentração de ácido glicólico (GA) no sobrenadante das culturas em meio MM contendo 40 g L ⁻¹ de EG. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias correspondentes.	59
Figura 6: Dendrograma da Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos dos isolados gerado pelo Microbial Identification System (MIDI).....	59
Figura 7: Árvore filogenética baseada no sequenciamento do gene de 16S rRNA comparando com outras espécies dos respectivos gêneros identificados por BLASTn. Número nos nós indica os graus de suporte da análise de bootstrap (em porcentagem) pelo método de neighbor-joining. Barra indica 0,02 substituições por sítio.....	60
Figura 8: Teste de produção de exopolissacarídeos. Todos os meios foram suplementados com 0,2 g L ⁻¹ de calcofluor. A e B: MSM contendo 10 g L ⁻¹ de EG. C e D: MSM contendo 10 g L ⁻¹ de TA. A e C: placas em luz branca comum. C e D: placas sob luz ultravioleta (365 nm).	63
Figura 9: Teste de produção de polihidroxicanoatos. A solução de Azul de Nilo sulfato (0,5 g L ⁻¹) foi adicionada sobre as colônias e as imagens foram obtidas após 20 minutos de tratamento. A e B: MSM contendo 10 g L ⁻¹ de EG. C e D: MSM contendo 10 g L ⁻¹ de TA. A e C: placas em luz branca comum. C e D: placas sob luz ultravioleta (365 nm).	65
Figura 10: Cromatograma da GC/MS da biomassa metanolizada da bactéria TA18 cultivada em MSMTA.....	66
Figura 11: Curva padrão de etilenoglicol. Concentrações em g L ⁻¹	74

Figura 12: Curva padrão de ácido tereftálico. Concentrações em g L ⁻¹	74
Figura 13: Curva padrão de ácido glicólico. Concentrações em g L ⁻¹	75
Figura 14: Tabela de identificação dos picos encontrados por GC/MS da amostra de biomassa derivatizada de TA18 cultivada em MSM TA.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Characteristics of eligible studies for systematic review.....	18
Tabela 2: Search terms used.	41
Tabela 3: Selected studies' remaining information	43
Tabela 4: Bactérias isoladas a partir das culturas de enriquecimento	53
Tabela 5: Produção de biossurfactantes pelos isolados selecionados em meios de cultura diferentes.	61
Tabela 6: Produção de PHA pelos isolados em MSM.....	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. CAPÍTULO 1: A systematic review on Microbial Bioconversion of Polyethylene Terephthalate monomers to high-value products.....	13
2.1. INTRODUCTION	13
2.2. MATERIAL AND METHODS.....	15
2.2.1. Data collection and screening	15
2.2.2. Data extraction.....	15
2.2.3. Risk-of-bias	15
2.3. RESULTS	16
2.3.1. Screening and selection.....	16
2.3.2. Articles' extracted data	17
2.3.3. Selected articles risk-of-bias	17
2.4. DISCUSSION.....	22
2.4.1. Bioconversion by wild strains	22
2.4.1.1. Reserve material.....	22
2.4.1.2. Organic acids	24
2.4.1.3. Bacterial cellulose.....	27
2.4.1.4. Fuel and energy.....	28
2.4.2. Bioconversion by genetically modified strains	29
2.4.2.1. Construction of synthetic pathways	29
2.4.2.2. Genetic modifications to produce or accumulate metabolites	33
2.5. CONCLUSION.....	34
2.6. REFERENCES.....	36
2.7. SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	41
3. CAPÍTULO 2: Isolamento de bactérias degradadoras de monômeros de polietileno tereftalato e prospecção de produtos com potencial biotecnológico	46
3.1. INTRODUÇÃO	46

3.2. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.2.1. Meios de cultura utilizados	47
3.2.2. Cultura de enriquecimento e isolamento microbiano	47
3.2.3. Triagem dos isolados consumidores de etilenoglicol e ácido tereftálico	48
3.2.4. Extração de ácidos graxos e identificação por MIDI Sherlock	49
3.2.5. Extração de DNA e amplificação parcial do gene 16S	49
3.2.6. Teste de produção de biossurfactantes	50
3.2.7. Teste de produção de exopolissacarídeos	50
3.2.8. Teste de produção de polihidroxicanoatos (PHAs)	51
3.2.9. Caracterização de PHAs produzidos a partir de TA	52
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.3.1 Isolamento a partir das culturas de enriquecimento	52
3.3.2. Curvas de crescimento e degradação de TA e EG em meios de cultura com maiores concentrações dos substratos orgânicos	56
3.3.4. Identificação dos isolados bacterianos por sequenciamento parcial do gene 16S	59
3.3.5. Produção de biossurfactantes pelos isolados selecionados	61
3.3.6. Produção de exopolissacarídeos pelos isolados selecionados	63
3.3.7. Produção de polihidroxicanoatos pelos isolados selecionados	64
3.4. CONCLUSÃO	68
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
3.6. MATERIAL SUPLEMENTAR	74
4. CONCLUSÃO GERAL	76

1. INTRODUÇÃO GERAL

A reciclagem de plástico é atualmente a principal forma de tratamento desse resíduo. No entanto, essa abordagem não resolve a demanda por substituição dos polímeros sintéticos por biopolímeros, nem oferece uma solução adequada para o plástico que chega ao meio ambiente. Além disso, os métodos de reciclagem empregados têm um impacto ambiental significativo, pois requerem grandes quantidades de água, energia, altas temperaturas e, em alguns casos, o uso de reagentes tóxicos. Embora a reciclagem permita que o plástico retorne ao ciclo produtivo, ela não aborda integralmente os desafios ambientais, tampouco oferece um destino sustentável para os resíduos que escapam aos processos de coleta e reciclagem.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo explorar e identificar substâncias de valor agregado produzidas por microrganismos a partir dos monômeros de PET. O primeiro capítulo, intitulado “A systematic review on Microbial Bioconversion of Polyethylene Terephthalate monomers to high-value products”, sistematiza estudos que abordam explicitamente esse processo de conversão, indicando as substâncias produzidas, os microrganismos empregados e os monômeros utilizados. Nessa revisão, buscou-se identificar substâncias de valor agregado produzidas a partir de etilenoglicol ou ácido tereftálico, além dos microrganismos que realizam tal processo. A partir disso, o segundo capítulo foi desenvolvido para isolar microrganismos e explorar a produção de substâncias com potencial aplicação biotecnológica a partir desses substratos. Nesse capítulo, intitulado “Isolamento de bactérias degradadoras de monômeros de polietileno tereftalato e prospecção de produtos com potencial biotecnológico”, foram avaliados os potenciais de produção de biossurfactantes, exopolissacarídes e polihidroxicanoatos, substâncias com amplo potencial biotecnológico, por isolados bacterianos obtidos por meio de culturas de enriquecimento. Esses experimentos foram realizados com o objetivo de aumentar a lista de possíveis substâncias produzidas a partir de monômeros de PET, buscando alternativas para a reutilização de plásticos como matéria-prima na produção de substâncias de valor agregado, contribuindo para a redução dos custos associados ao tratamento desse tipo de resíduo.

2. CAPÍTULO 1: A systematic review on Microbial Bioconversion of Polyethylene Terephthalate monomers to high-value products

2.1. INTRODUCTION

PET-hydrolyzing enzymes have been widely studied due to their potential to efficiently and sustainably degrade polyethylene terephthalate. Recent research focuses on improving their enzymatic activity and stability, aiming to optimize the use of these enzymes in plastic waste treatment, making them promising tools for biotechnological solutions to plastic pollution (Yoshida et al., 2016; Liu et al., 2023). However, the fate of the products resulting from PET depolymerization is not addressed in these studies. Typically, the recovered monomers are repolymerized to PET again, which, while useful, does not address the need to replace synthetic polymers with biopolymers, nor does it provide a final solution for plastic that reaches the environment (Kim et al., 2022). A potential alternative is the bioconversion of these monomers, in which microorganisms can produce value-added products through terephthalic acid and ethylene glycol metabolism.

The catabolism of terephthalate (TA) involves two distinct stages: the conversion of TA to protocatechuic acid (PCA) and the subsequent degradation of PCA to metabolites that enter the tricarboxylic acid cycle. Each stage is independently regulated. The conversion of TA to PCA is facilitated by the Tph protein complex. Initially, TA is transported into the cytosol by TphC; then, TA is reduced to 1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylic acid (DCD) utilizing O₂ and NADPH. The resulting DCD is then decarboxylated to form PCA, concurrently reducing NADP⁺ to NADPH (Sasoh et al., 2006). The genes responsible for these processes, known as *tph* genes, are typically organized in clusters and are regulated by the transcription factor TphR, which has its expression induced by the presence of TA (Kasai et al., 2010). This genetic organization appears to be conserved among TA-degrading bacteria, although in certain *Rhodococcus* strains, the gene encoding for the TA transporter is positioned at the end of the cluster, indicating a potential variation in regulatory architecture (Choi et al., 2005).

The protocatechuate can be processed by three distinct pathways referred as how they cleave its aromatic ring, all of which yield key metabolic intermediates used as carbon and energy sources. The 2,3-meta cleavage pathway starts with the protocatechuate 2,3-dioxygenase (*pca-2,3*) adding two oxygen atoms in the 2 and 3 position of PCA, resulting in the opening of the aromatic ring. The full pathway involves the reducing of two NAD⁺ to two NADH and two events of decarboxylation, yielding acetyl-CoA and pyruvate. This pathway was described by Crawford et al. (1979) using the strain *Paenibacillus* sp. JJ-1b.

Additional studies found that the *pca-2,3* genes are organized in the *pra* operon regulated by the transcription repressor PraR (Kasai et al., 2009).

Similarly, the first reaction of the 3,4-ortho cleavage pathway (*pca-3,4*) is the addition of two oxygen atoms, however, in the 3 and 4 position of PCA. This reaction also causes the opening of the aromatic ring. This pathway has only one decarboxylation reaction, no reduction of NAD⁺ or NADP⁺ and ultimately yields acetyl-CoA and succinate. The pathway was characterized in *Pseudomonas putida* KT2440 and can be found in *Acinetobacter calcoaceticus* (Doten et al, 1987) and in various strains of *Rhodococcus*. The genes encoding for the *pca-3,4* genes can be arranged in a single cluster (as in *A. calcoaceticus*) or scattered across the genome (as in *P. putida*). Different *Rhodococcus* species may have different ways to organize these genes, as both cases have been reported (Eulberg et al., 1998).

Lastly, the 4,5-meta cleavage pathway (*pca-4,5*) uses the protocatechuate 4,5-dioxygenase to open the aromatic ring by adding two oxygen atoms in the 4 and 5 position of PCA. This pathway reduces NADP⁺ to NADPH and does not have a decarboxylation reaction, yielding the higher carbon amount as pyruvate and oxaloacetate. The operon organization of the *pca-4,5* genes was described in *Pseudomonas straminea* and *Comamonas testosteroni*. *Delftia acidovorans* and *Sphingomonas paucimobilis* also have been reported to use this pathway to metabolize aromatic compounds.

Ethylene glycol (EG) is metabolized through a series of enzymatic reactions, beginning with its conversion to glycolaldehyde by an alcohol dehydrogenase, followed by further oxidation to glycolate by an aldehyde dehydrogenase. The process ultimately leads to the formation of glyoxylate, which enters central metabolism via the glyoxylate shunt, providing a carbon source while bypassing the decarboxylation steps of the TCA cycle. Although this pathway generates electrons in the form of reduced quinone, NADH, or cytochromes, the organism's ability to grow using ethylene glycol as its sole carbon source depends on its capacity to perform the glyoxylate shunt. If this step is not functional, the organism cannot sustain growth on ethylene glycol. Additionally, incomplete pathways can lead to the accumulation of intermediates such as glycolaldehyde or glycolate. Consequently, most ethylene glycol bioconversion studies focus on converting it into glycolate.

These are the established pathways through which PET monomers can be integrated into microbial metabolism, enabling the production of high-value compounds or biotechnologically relevant substances. This review aims to provide a comprehensive overview of the various substances produced by microorganisms from PET monomers and to offer an understanding of the metabolic processes involved.

2.2. MATERIAL AND METHODS

2.2.1. *Data collection and screening*

This work followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (Moher et al., 2015; Rethlefsen & Page, 2021). The question this work aims to solve is: what high-value products have been produced by microorganisms from PET monomers? The articles were collected from Medline/PubMed, Web of Science, and Scopus databases on February 29, 2024, at 7 AM. The filters used to constrain the search were: (#1) Microorganisms, (#2) Substrates and (#3) Conversion (Supplementary 1), combined with Boolean connectors searching the terms in the study's title, abstract or keywords.

After the collection, duplicated articles were merged using Mendeley software and the article's title, abstract and keywords were evaluated using JabRef software to assess its relevance for the present work by the selection criteria, which were: remaining duplicates, non-experimental studies, non-English writing, and off-topic. Selected articles had their full text screened against the exclusion criteria and the ones within this work scopus had their data extracted and the references checked for additional qualifying articles. Exclusion criteria were: (i) the high-value substance isn't produced from monomer; (ii) conversion only uses microorganism biocatalysts; (iii) theoretical and bioinformatics-only works.

2.2.2. *Data extraction*

The data extracted from the qualifying articles, when possible, included:

- i) paper's information: title, authors, publication year, first author's affiliation country and journal title,
 - ii) bioconversion: monomer converted, high-value product,
 - iii) microorganisms: identification, genetic modifications, source of genes used,
- and is fully available in Supplementary Information (Supplementary 2). Missing data was considered not collected by the authors.

2.2.3. *Risk-of-bias*

Risk of bias was identified in five domains: D1: Methodological rigor in experimental design; D2: Control of confounding variables and uniform experimental conditions; D3: Impartiality of operators during the experiment; D4: Complete and reliable data, without significant losses; D5: Transparency in results, without selection or bias. Each selected article

was classified as [LOW], low risk of bias; or [SOME CONCERNS], probable risk of bias; or [HIGH], high risk of bias, in all domains and the overall risk of bias was summarized.

2.3. RESULTS

2.3.1. Screening and selection

A total of 5,280 works were retrieved from the initial search across all three databases. After both screening processes, 25 research articles were selected for this study, as summarized in Figure 1. Additionally, 7 more articles were identified through reference list checks, bringing the total number of papers to 32 for the present review.

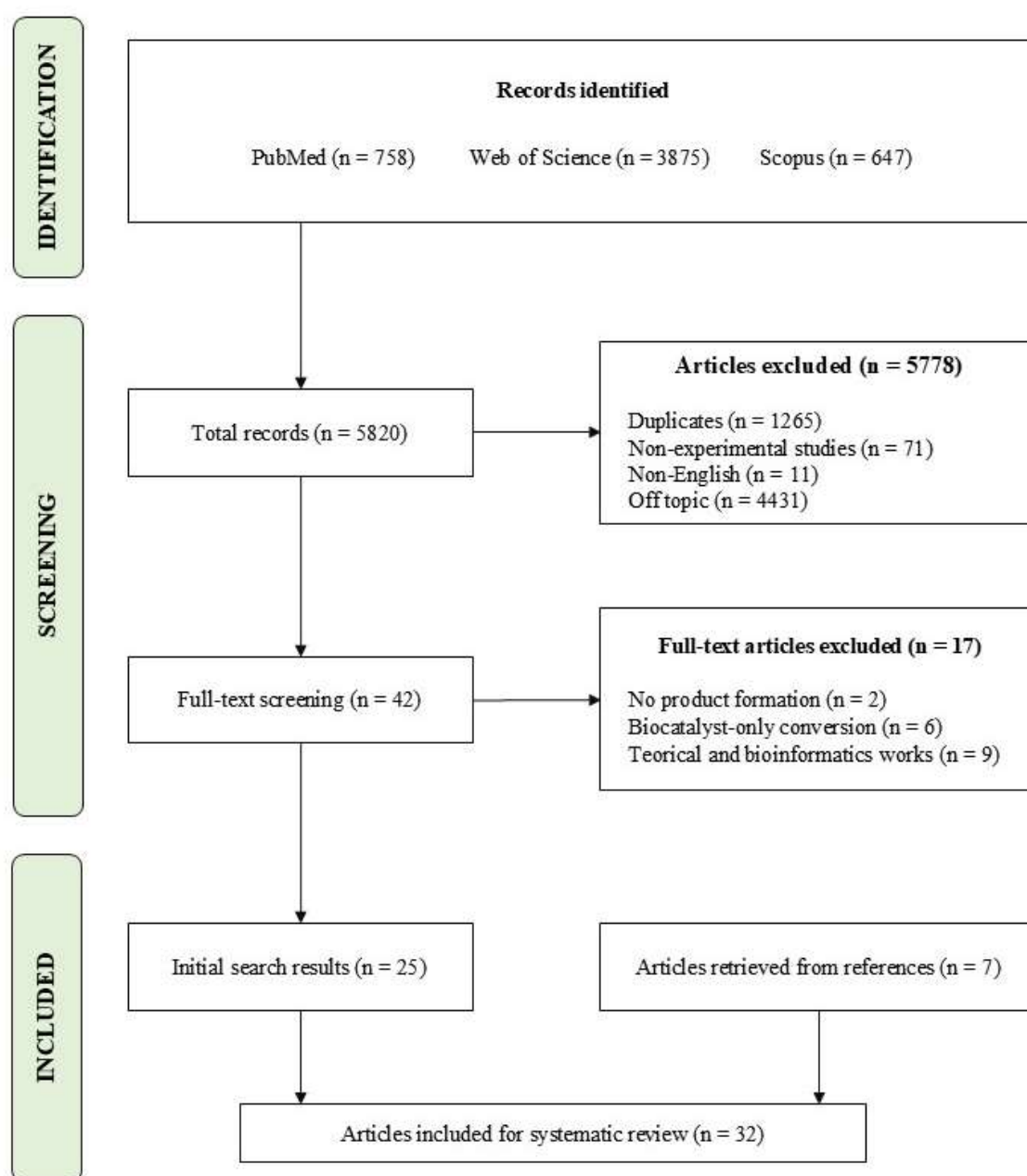


Figure 1: Flow diagram summarizing the screening process.

2.3.2. Articles' extracted data

Table 1 summarizes the collected data from the studies including publication year, authorship, monomer converted, substance produced, microorganism utilized, if the strain was genetically modified and, if so, what are the exogenous genes source. Remaining information was organized in Table 2 of supplementary information.

2.3.3. Selected articles risk-of-bias

In the risk-of-bias assessment, no study showed high concerns in any evaluated domain. Over half of the selected studies lacked information regarding the randomization process, and some concerns were raised about the measurement and selection of reported results. These concerns were noted because some studies do not clearly outline the experimental design or specify whether the reported values are averages of replicates. Overall, the selected studies show a low risk of bias.

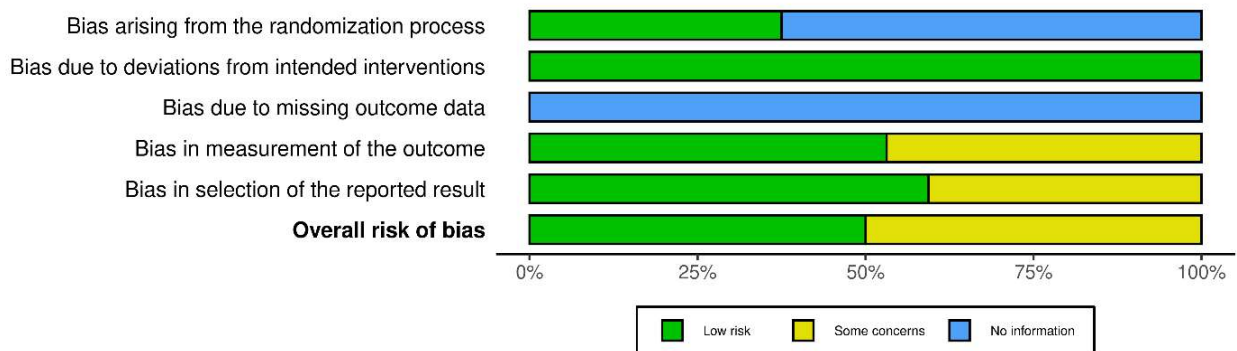


Figure 2: Selected studies risk-of-bias.

Table 1: Characteristics of eligible studies for systematic review

Year	Authors	Monomer	Product(s)	Microorganism	GMO	genes from
1984	Eichler and Schink	EG	Acetate	<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	non-GMO	-
1999	Kleerebezem et al.	TA	Acetate and methane	Consortium (<i>Pelotomaculum</i> , <i>Thermotogae</i> , <i>Syntrophus</i> and unidentified isolate)	non-GMO	-
2000	Shah et al.	EG	Polyhydroxybutyrate	<i>Ralstonia eutropha</i>	non-GMO	-
2001	Kataoka et al.	EG	Glycolic acid	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia</i> <i>naganishii</i> , <i>Hansenula anomala</i> , <i>H.</i> <i>octospora</i> , <i>Gluconobacter industrius</i> , <i>G.</i> <i>suboxydans</i> , <i>G. dioxyaceticus</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> , <i>Rhodococcus</i>	non-GMO	-
2006	Qiu et al.	TA	Acetate, methane and benzoate	Consortium (<i>Pelotomaculum</i> <i>terephthalicum</i> and <i>Methanospirillum</i> <i>hungatei</i>)	non-GMO	-
2008	Kenny et al.	TA	Polyhydroxyalkanoate	<i>Pseudomonas putida</i> and <i>frederiksbergensis</i>	non-GMO	-
2009	Wei et al.	EG	Glycolic acid	<i>Gluconobacter oxydans</i>	non-GMO	-
2009	Wei et al.	EG	Glycolic acid	<i>Gluconobacter oxydans</i>	non-GMO	-
2012	Kenny et al.	TA	Polyhydroxyalkanoate	<i>Pseudomonas putida</i>	non-GMO	-
2012	Mückschel et al.	EG	Glyoxylic acid	<i>Pseudomonas putida</i>	non-GMO	-

Year	Authors	Monomer	Product(s)	Microorganism	GMO	genes from
2014	Gao et al.	EG	Glycolic acid	<i>Burkholderia sp.</i>	non-GMO	-
2016	Trifunovic et al.	EG	Acetate	<i>Acetobacterium woodii</i>	non-GMO	-
2019	Hua et al.	EG	Glycolic acid	<i>Gluconobacter oxydans</i>	non-GMO	-
2019	Kim et al.	EG and TA	Gallic acid, pyrogallol, catechol, muconic acid, vanillic acid and glycolic acid	<i>Escherichia coli</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>Comamonas sp.</i> , + <i>pobA</i> and + <i>catA</i> from <i>P. putida</i> , + <i>lpdC</i> , + <i>aroY</i> and + <i>phKLMNOPQ</i> origin not mentioned
2020	Kang et al.	TA	2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid	<i>Escherichia coli</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>Comamonas sp.</i> and + <i>ligABC</i>
2020	Zhang et al.	EG and TA	Bacterial cellulose	<i>Taonella mepensis</i>	non-GMO	-
2021	Fujiwara et al.	EG and TA	Polyhydroxyalkanoate	<i>Ideonella sakaiensis</i>	non-GMO	-
2021	Kim et al.	EG and TA	Glycolic acid from EG and protocatechuic acid from TA	<i>Escherichia coli</i> for protocatechuic acid and <i>Gluconobacter oxydans</i> for glycolic acid	<i>E. coli</i> GMO and <i>G. oxydans</i> non-GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>Comamonas sp.</i>
2021	Liu et al.	TA	Polyhydroxybutyrate	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	GMO	+ <i>phbCAB</i> operon from <i>Ralstonia eutropha</i>
2021	Pandit et al.	EG	Glycolic acid	<i>Escherichia coli</i>	GMO	overexpression of native <i>aldA</i> mutant <i>fucO</i>

Year	Authors	Monomer	Product(s)	Microorganism	GMO	genes from
2021	Sadler and Wallace	TA	Vanillin	<i>Escherichia coli</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>Comamonas</i> sp.
2021	Tiso et al.	EG and TA	Polyhydroxyalkanoate and hydroxyalkanoyloxy-alkanoate	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	non-GMO	-
2021	Werner et al.	EG and TA	Beta-ketoadipate	<i>Pseudomonas putida</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>Comamonas</i> sp. and <i>::tpaK</i> from <i>Rhodococcus jostii</i>
2022	Carniel et al.	EG	Glycolic acid	<i>Yarrowia lipolytica</i>	non-GMO	-
2022	Esmail et al.	EG and TA	Bacterial Cellulose	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	non-GMO	-
2022	Kalathil et al.	EG and TA	Acetate and electricity	<i>Ideonella sakaiensis</i> and <i>Geobacter sulfurreducens</i> *	non-GMO	-
2022	Liu et al.	EG and TA	Muconic acid	<i>Pseudomonas putida</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>P. stutzeri</i> , + <i>aroY</i> and + <i>ecdB</i> from <i>Enterobacter cloacae</i> , native Δ <i>pcaHG</i> and Δ <i>catBC</i>
2023	Diao et al.	EG and TA	Lycopene	<i>Rhodococcus jostii</i>	non-GMO	-
2023	Frazão et al.	EG	2,4-dihydroxybutyric acid	<i>Escherichia coli</i>	non-GMO	-
2023	Liu et al.	EG and TA	Polyhydroxyalkanoate	<i>Pseudomonas putida</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster from <i>Comamonas</i> sp., native Δ <i>gclR</i> and Δ <i>phaZ</i> ,

Year	Authors	Monomer	Product(s)	Microorganism	GMO	genes from
						overexpression of <i>glcDEF</i> and <i>phaCI</i>
2023	Panda et al.	EG	L-tyrosine, L-phenylalanine and <i>p</i> -couramic acid	<i>Escherichia coli</i>	GMO	overexpression of native <i>aldA</i> and <i>fucO</i> , Δ tyrR and Δ pheA and +aroG and +tyrA
2023	Valenzuela-Ortega et al.	TA	Adipic acid	<i>Escherichia coli</i>	GMO	+ <i>tph</i> cluster <i>Comamonas</i> sp., + <i>aroY</i> and + <i>kpdB</i> from <i>Klebsiella pneumoniae</i> , + <i>catA</i> from <i>Pseudomonas putida</i> and + <i>bcER</i> from <i>Bacillus coagulans</i>

2.4. DISCUSSION

2.4.1. Bioconversion by wild strains

The ability to degrade ethylene glycol and terephthalic acid has already been identified in various microbial genera and species, including, but not limited to, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Gluconobacter*, and *Ideonella sakaiensis*. Among these microorganisms, there are some capable of producing biotechnologically valuable compounds from these substrates, thereby enhancing the economic interest in plastic waste valorization processes. This is particularly significant given that recycling often generates raw materials that are more expensive than *de novo* synthesis from fossil fuels (Kahlert; Bening, 2022).

Several biotechnological products are naturally produced by bacteria, including secondary metabolites, organic acids, alcohols, proteins, lipids, (exo)polysaccharides, and other biopolymers (Demain, 2000). By exploring substances that can be derived from plastics, valorization processes can be diversified, thereby expanding the potential applications for these anthropogenic wastes.

2.4.1.1. Reserve material

Various microorganisms produce reserve substances with significant biotechnological or economical potential. Typically, the accumulation of these substances occurs under conditions of nutritional stress, which can be simulated by nitrogen limitation in the culture medium, thereby forcing the accumulation of such compounds within the cells (Madison; Huisman, 1999). Polymeric substances present an additional level of complexity, as their chemical composition can vary depending on the microbial strain, cultivation conditions, and the metabolized carbon source (Reddy et al., 2003). Despite that, these reserve materials have a wide range of applications, including food, cosmetic and pharmaceutical industries. Therefore, the composition of the culture medium is crucial to produce tailored polymeric reserve substances, and the use of waste materials enhance the process sustainability.

Shah et al. (2000) demonstrated that ethylene glycol (EG) can be converted into poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Ralstonia eutropha*, although its ability to use EG as its sole carbon source was not confirmed. ¹³C labeling analysis showed that both carbon atoms of EG were transformed into acetyl-CoA and subsequently incorporated into PHB. Acetyl-CoA is converted into PHB by the action of the PhbABC proteins, which include a β -ketothiolase, acetoacetyl reductase, and PHA synthase, respectively. However, the metabolic pathway responsible for converting EG into acetyl-CoA in *R. eutropha* has not yet been fully elucidated.

Kenny et al. (2008) isolated *Pseudomonas* strains from soil presenting PET granules from the surroundings of a PET molding facility and their PHA synthesis ability was assessed. Three isolates, GO16, GO19 and GO23, were able to consume 4.202 g L⁻¹ of TA after 50 hours of cultivation under nitrogen-limiting conditions, accumulating up to 27% PHA of cell dry weight. Accumulation started as nitrogen concentration decreased. The PHA produced was composed of 3-hydroxyoctanoate, with smaller amounts of 3-hydroxyhexanoate, 3-hydroxydecanoate, 3-hydroxydodecanoate, and 3-hydroxydodecenoate. Among the strains, *Pseudomonas putida* GO19 was the most efficient, achieving a production rate of 8.4 mg PHA L⁻¹ h⁻¹ and producing PHA with 18.7% crystallinity. Conversely, *Pseudomonas frederiksbergensis* GO23 accumulated PHA at a slower rate of 4.4 mg PHA L⁻¹ h⁻¹, but produced PHA with the highest crystallinity, reaching 31.1%. These differences in efficiency and crystallinity are attributed to the varying proportions of monomers in the composition of the PHA, demonstrating the potential of these strains to produce materials with distinct physical properties. TA used in this study was derived from pyrolyzed PET, followed by NaOH alkaline hydrolysis. Combining and proving to be possible the combination of PET depolymerization and valorization of the resulting monomers demonstrates that a more sustainable plastic waste management is indeed achievable.

In a subsequent study, Kenny et al. (2012) utilized *P. umsongensis* GO16 (initially described as *P. putida*) in a fed-batch bioreactor to produce PHA from TA, combined with residual glycerol from biodiesel production. They tested various combinations of TA and glycerol, both during initial cultivation and subsequent substrate addition. Their findings revealed that the feeding strategy significantly affects the monomer composition of the PHA. The addition of glycerol, at any stage, led to the accumulation of two longer monomers, 3-hydroxytetradecanoate and 3-hydroxytetradecenoate. Moreover, glycerol addition also increased TA utilization and PHA production, highlighting its potential as a strategy to optimize the bioconversion process. The similarity in PHA composition between sole TA and commercially purified glycerol indicated that differences in composition and proportion were due to the organic non-glycerol substances present in the crude glycerol. The PHA produced under different fermentation strategies differed in molecular weight and tackiness, with glycerol addition also increasing the polymer's melting temperature.

To broaden the strain's ability to uptake PET monomers, Tiso et al. (2021) enhanced GO16 natural growth rate on EG from 0.14 to 0.4 h⁻¹ through adaptive laboratory evolution, resulting in the evolved strain KS3. This new strain was tested for PHA production using PET hydrolysate derived from Leaf Compost Cutinase (LCC), a PET hydrolasing enzyme, and

achieved a maximum yield of 0.15 g L⁻¹ PHA after 23 hours of cultivation, using 40 mM of each PET monomer calculated from the LCC hydrolysate. The PHA composition in KS3 was similar to previous studies, consisting of 3-hydroxyoctanoate, 3-hydroxydecanoate, and 3-hydroxydodecanoate. Additionally, KS3 was transformed with a plasmid carrying genes for hydroxyalkanoxyloxy-alkanoates (HAA) production, a precursor that can be co-polymerized into the bioplastic poly (amide urethane). The production of HAA from LCC hydrolysate was successful, reaching 5 mg L⁻¹ h⁻¹ from TA, although no HAA production was observed from EG consumption, despite EG being able to sustain growth.

Fujiwara et al. (2021) reported that *Ideonella sakaiensis* 201-F6, a bacterium known for its ability to hydrolyze and uptake PET monomers, also carries genes for PHA synthesis. By using PET granules as the carbon source, they achieved a PHA yield of 0.75 g L⁻¹ after 6 days of incubation, with PHA making up 48% of the cell's dry weight. The produced PHA primarily consisted of 3-hydroxybutyrate, with only trace amounts of 3-hydroxyvalerate, demonstrating that direct conversion of PET to PHA in a single step is indeed feasible.

Polyhydroxyalkanoates are a diverse group of biopolymers composed of hydroxyalkanoate monomers linked by ester bonds, synthesized by microorganisms as intracellular reserve materials (Reddy et al., 2003). These polymers have gained significant interest due to their potential to replace conventional plastics derived from fossil fuels, as some PHAs exhibit desirable physicochemical properties with higher biodegradability, making them a particularly attractive substance. The monomeric composition of PHAs can vary depending on the microbial strain, the initial substrate, and the culture conditions, resulting in a wide range of properties (Ferre-Guell; Winterburn, 2018). Therefore, the production of PHA from plastic waste represents a direct and promising way to replace and repurpose conventional plastics.

2.4.1.2. Organic acids

Organic acids are a diverse group of substances with extensive biotechnological applications in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries (Ghai et al., 2023). These acids are often produced through microbial fermentation, where carbon substrates are partially oxidized, yielding products like acetic, lactic, and citric acid (Lorenzo et al., 2022). Implementing microbial bioconversion to produce these versatile substances from plastic waste can contribute to a more sustainable solution for plastic disposal.

Mückschel et al. (2012) investigated EG metabolization in two *P. putida* strains JM37 and KT2440 as their sole carbon source, finding that only the first showed population growth. Temporary accumulation of glycolic acid and glyoxylic acid and EG degradation was found by

resting cells of both strains, indicating that EG was being oxidized even with minimal growth. KT2440 was also found to produce glyoxylic acid, which was further oxidized into oxalic acid or entered the TCA cycle by the glyoxylate shunt. Based on proteomic analysis, the authors proposed a metabolic pathway for EG, suggesting that it is oxidized step by step into glycolaldehyde, glycolic acid, and, finally, glyoxylic acid.

Kataoka et al. (2001) conducted a screening study to identify microorganisms capable of oxidizing ethylene glycol (EG) into glycolic acid (GA). Out of 2,099 cultures, which included bacteria, yeast, and filamentous fungi, they found 150 strains that achieved over 20 % molar conversion of EG to GA. A further screening with higher EG concentrations narrowed the isolates to 15 strains, including *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia naganishii*, *Hansenula anomala*, *Hansenula octospora*, *Gluconobacter industrius*, *Gluconobacter suboxydans*, *Gluconobacter dioxyaceticus*, *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., *Pseudomonas putida*, and *Rhodococcus* sp. All these strains successfully produced GA from media containing 10 % and 20 % v v⁻¹ EG. However, the authors focused the subsequent assays on *P. naganishii*, which produced the highest amount of GA at 10 % initial EG content (35.3 g L⁻¹ of GA), and *Rhodotorula* sp., which displayed the highest production at 20 % initial EG content (20.2 g L⁻¹ of GA). At optimum culture conditions (30°C, pH 7.0, and 1 vvm aeration for both strains), *P. naganishii* and *Rhodotorula* sp. converted 111 g L⁻¹ of EG in 120 hours, producing 105 g L⁻¹ and 110 g L⁻¹ of GA, respectively, using a resting cell fermentation strategy, reaching around 90 % molar conversion rate. However, when the substrate concentration was increased to 20%, the molar conversions decreased to 11.6 % and 28.2 % for *P. naganishii* and *Rhodotorula* sp., respectively. Despite this reduced conversion efficiency, these yields remain impressive, considering that EG exhibits antimicrobial activity (Moghayedi et al., 2017).

Other studies exemplify the diversity of microbial strains capable of efficiently converting EG into GA. For instance, *Burkholderia* sp. EG13 demonstrated a remarkable ability to convert 12.4 g L⁻¹ of EG to GA with a 98.8% molar yield in 24 hours. When scaled up using *in situ* product recovery (ISPR) and fed-batch fermentation in a 2 L bioreactor, this strain maintained its high efficiency, producing 793 mM of GA from 800 mM of EG (a 0.991 molar ratio) after 120 hours, exhibiting high potential and scalability of the bioconversion process (Gao et al., 2014). Similarly, *Yarrowia lipolytica* strain IMUFRJ also exhibited impressive tolerance to high concentrations of EG (1 M), converting it into 429.5 mM of GA (32.66 g L⁻¹) after 72 hours in high-agitation bioreactors, corresponding to a 42.95 % molar yield (Carniel et al., 2023). The notable tolerance to EG supports *Y. lipolytica* robustness in industrial applications using this PET monomer, making it a valuable candidate for processes

involving high concentrations of EG and broadening the range of microbial strains that can efficiently convert EG to GA (Napora-Wijata et al., 2013).

For yield improvements, high cell density fermentation has proven effective in enhancing both biomass yield and the conversion efficiency of EG to GA in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. By optimizing culture conditions through a Uniform Design approach, a dry cell weight of 14.1 g L^{-1} was achieved after 35 hours in a 3.7 L bioreactor with fed-batch fermentation. The resting cells from this process were then used to convert EG into GA, reaching a conversion efficiency of 86.7% and an overall production of 70.2 g L^{-1} of GA after 48 hours. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis confirmed that no other by-products were generated, showcasing the potential of this strain for large-scale bioconversion of EG (Wei et al., 2009A). Further research of this research group implemented an ISPR step that retained part of the GA produced in the reactor, thereby reducing its availability and mitigating end-product inhibition, ultimately achieving an improved GA yield of 93.2 g L^{-1} (Wei et al., 2009B).

Additionally, improvement of GA production by *G. oxydans* was further assessed using an oxygen-compressed bioreactor and immobilized whole-cell catalysis (Hua et al., 2019). This process yielded 63.6 g L^{-1} of GA after 48 hours of incubation in a fed-batch fermentation. Notably, the immobilized cells could be recycled into fresh culture broth, effectively functioning as a continuous culture system. Even after ten rounds of culture, the performance decreased only by 9.9% compared to the first round, with a cumulative total of 605.7 g of GA produced over 480 hours of fermentation.

Using EG derived from PET waste, Kim et al. (2021) utilized *G. oxydans* to produce GA. Starting with 30.6 g L^{-1} of EG, they achieved a conversion yield of 91.6% (mol mol^{-1}), resulting in 31.4 g L^{-1} of GA, demonstrating that high titers of GA can be achieved from chemically treated plastic waste. Glycolysis reaction was performed for PET depolymerization using betaine as a catalyst, which not only operates at lower temperatures and relatively quickly but also presents a promising and more sustainable method for depolymerizing PET waste.

Most of the studies focus on the conversion of EG into glycolic acid, serving as an easy metabolic intermediate to accumulate while having a wide range of applications. It is particularly recognized for its antimicrobial properties and has been extensively used in the skincare industry, where it is employed as an acne controlling agent and in chemical peels (Takenaka et al., 2011; Sharad, 2013). Additionally, glycolic acid is able to be polymerized into poly (glycolic acid) (PGA), creating a bio-based polymer. Although PGA is highly susceptible to hydrolysis, co-polymerization with lactic acid produces poly (lactic-co-glycolic acid)

(PLGA), a material known for its high biocompatibility. As a result, PLGA has been proposed for various clinical applications, including tissue engineering and drug delivery systems (Makadia & Siegel, 2011; Gentile et al., 2014). This overview summarizes some of the biotechnological applications of GA and highlights its potential to be synthesized from PET monomers, representing a sustainable destination to plastic waste.

Acetobacterium species have been found to ferment various short-chain alcohols, including EG, into acetate. For instance, *A. carbinolicum* efficiently converts EG into acetate, while *A. woodii* initially accumulates ethanol until the EG in the medium is depleted. Afterward, the accumulated ethanol is further converted into acetate (Eichler & Schink, 1984; Trifunovic et al., 2016). Given the global demand for acetate, which is higher than for GA, this pathway offers another promising alternative for PET waste valorization, increasing its economic feasibility.

2.4.1.3. Bacterial cellulose

Bacterial cellulose (BC) is a valuable biomaterial known for its high purity, mechanical strength, and water-holding capacity (Girard et al., 2024). It has been assessed for clinical applications such as wound dressings, tissue engineering, and drug delivery systems due to its film-forming properties and good biocompatibility (Picheth et al., 2017). Additionally, BC is utilized in the food industry as a thickening agent, stabilizer, and dietary fiber, demonstrating its versatility as a bacterial metabolite (Lin et al., 2020).

Komagataeibacter xylinus DSM 2004 and DSM 46604 were both found to be capable of converting TA and EG into bacterial cellulose (BC). However, only DSM 2004 is able to grow on both monomers as sole carbon sources, while DSM 46604 showed no growth in EG-only culture medium and generally produced lower quantities of BC. Specifically, DSM 2004 achieved the highest BC yield of 2.0 g L⁻¹ in a medium containing TA and glucose (both at 20 g L⁻¹) after 18 days of static incubation at 30°C, consuming 1.80 g L⁻¹ of TA in the process. About EG consumption, DSM 2004 also performed better, consuming 8.50 g L⁻¹ of EG (from an initial concentration of 20 g L⁻¹) and producing 1.20 g L⁻¹ of BC. In comparison, DSM 46604 demonstrated lower substrate consumption and BC production, with maximum TA and EG consumption of 1.60 g L⁻¹ and 8.20 g L⁻¹, respectively, and a BC yield of 0.76 g L⁻¹. Interestingly, although DSM 46604 did not grow in an EG-only medium, the addition of glucose enabled both growth and EG consumption, likely due to the higher carbon supply supporting both processes while EG was partially oxidized. The authors hypothesized that EG metabolism lowered the pH due to its conversion into organic acids, which could have their own

biotechnological and economic relevance, though this hypothesis was not assessed or confirmed in the study (Esmail et al., 2022).

Taonella mepensis WT-6 isolated from rotten ramie leaf was found to grow and produce bacterial cellulose from TA, EG, mono (2-hydroxyethyl) terephthalate and bis-hydroxyethyl terephthalate generated from hydrothermally treated terylene. Terylene hydrolysate was used as the only nutrient source and the maximum yield was 2.42 g L⁻¹ after optimizing pH, temperature, inoculum size, cultivation time, nitrogen source and hydrolysate, nitrogen source and sodium phosphate concentrations. Not only was this strain capable of consuming TA and EG, but it also utilized oligomers generated from terylene (and PET) degradation while producing a valuable substance (Zhang et al., 2020). These results demonstrate significant potential for a more environmentally friendly PET monomer valorization process, bypassing the need for highly optimized PET depolymerization.

2.4.1.4. Fuel and energy

As the need for the transition to cleaner energy sources grows, innovative approaches, such as the valorization of existing waste, offer potential ways to reutilize resources (Stephen; Periyasamy et al., 2018). The following studies have explored the diversity of microbial processes to convert PET waste monomers into energy resources.

Klebezebum et al. (1999) demonstrated that TA can serve as substrate for methane production, as its biodegradation led to the simultaneous accumulation of acetate and hydrogen, which are precursors in methanogenesis. Although the primary focus was on analyzing kinetic parameters and chemical reactions, they successfully converted 13 mM of TA into acetate, hydrogen gas, and methane. Similarly, Qiu et al. (2006) explored the coupling of TA fermentation with methane generation through hydrogenotrophic methanogenesis. They employed a microbial consortium that included a TA-enrichment culture strain and *Methanospirillum hungatei* DSM 864, achieving complete consumption of 1 mM of TA over 20 days. This process resulted in the accumulation of acetate, methane, and benzoate in the medium. Despite the new isolate's close relation to *Desulfotomaculum*, it lacked the ability to reduce sulfate, which suggests a safer process by eliminating the risk of hydrogen sulfide production. These studies emphasize TA's potential to be converted into a valuable organic acid and flammable gases that can serve as renewable energy sources in anaerobic reactors.

Under anaerobic conditions, *Ideonella sakaiensis* was found to be capable of PET uptake and growth, while producing partially oxidized carbon compounds, such as acetate and ethanol. To further explore this process, a co-culture of *I. sakaiensis* with *Geobacter*

sulfurreducens, a bacterium that consumes acetate, was conducted. *G. sulfurreducens* oxidizes acetate and can transfer the resulting electrons to metal electron acceptors through an extracellular electron transfer (EET) pathway or via protein nanowires. By using an electrode to capture these metabolically generated electrons, the system allows for the harvesting of electricity from PET (Logan et al., 2019; Lovley & Yao, 2021; Kalathil et al., 2022).

2.4.2. Bioconversion by genetically modified strains

Genetic modifications provide precise control over microbial physiology, allowing for fast advancements, such as the addition or deletion of specific genes to optimize microbial functions. For instance, genetic modifications can be used to introduce missing enzymes needed to complete a bioprocess pathway, or even to create an entirely new pathway (Na et al., 2010). This is especially relevant for bioconversion processes, where both the assimilation and the production of compounds are required. Thereby, the ability to tailor microbial genetic responses adds significant flexibility, making these processes feasible or more efficient, improving their range of application in various industrial settings (Julleson et al., 2015).

2.4.2.1. Construction of synthetic pathways

Synthetic metabolic pathways provide a practical approach for efficiently producing high-value substances, allowing for precise control and enhancement of substrate consumption and product formation (Meyer et al., 2007). As some assimilation pathways are well-established, they can be introduced in other bacterial strains to enable the incorporation of TA or EG by interesting metabolite producing strains. Alternatively, entirely new synthetic pathways can be constructed by expressing the necessary enzymes, particularly in well-studied model organisms like *Escherichia coli* or species within the *Pseudomonas* genus. These efforts often involve overexpressing genes for EG metabolism or introducing genes for the conversion of TA to PCA. Most synthetic pathways for the bioconversion of terephthalic acid (TA) begin with the introduction of *tph* genes, typically sourced from *Comamonas sp. E6*, to convert TA into PCA. PCA then serves as a versatile intermediate for the synthesis of various aliphatic and aromatic compounds.

PCA itself can be a high-value substance as it is a key intermediate in some biotechnological processes, due to its central role in the microbial degradation of aromatic compounds. PCA was identified as a promising precursor for the biosynthesis of natural dyes, such as anthraquinones, for sustainable textile production (Cervantes-González et al., 2020). Anthraquinones are also significant in a variety of processes, including as additives in wood

pulping and as key intermediates in aromatic organic synthesis and medicinal chemistry (National Toxicology Program, 2005; Kamboj et al., 2022). In the cosmetics industry, PCA serves as a precursor for the synthesis of compounds like ethyl protocatechuate and hydroquinone, which are known for their UV protection and anti-aging properties (Penney et al., 1984; Daré et al., 2019). Additionally, PCA can be used in the development of bio-based adhesives and coatings when converted into catechol, a compound that exhibits diverse adhesive properties (Saiz-Poseu et al., 2018; Pinnataip; Lee, 2021; Ghosh et al., 2023).

In this sense, Kim et al. (2021), utilizing the same PET glycolysate as described in section 3.2.2 and a *tph*-expressing plasmid effectively converted TA into PCA yielding high conversion ratios (4.5 of TA to 3.8 g L⁻¹ PCA, or 90.4 % molar ratio) using *E. coli* as a proof-of-concept organism. In previous studies, this research group had already successfully engineered a synthetic pathway where the expression of heterologous genes enabled the production of gallic acid, catechol, and vanillic acid from PCA by further expressing the enzymes PobA, AroY, and OMT, respectively. Additionally, from catechol, the enzymes CatA and PhKLMNOPQ were employed to catalyze its conversion into muconic acid and pyrogallol, respectively. The bioconversion rates for each product varied, ranging from 41.6 % to 92.5 % (Kim et al., 2019).

Similarly, Sadler and Wallace (2021) expanded this approach by incorporating additional reactions to convert vanillic acid into vanillin, the primary compound in vanilla flavoring. Beyond the *tph* genes and OMT, they introduced the CAR enzyme, sourced from *Nocardia iowensis*, for the conversion of PCA into vanillin. Additionally, they included phosphopantetheinyl transferase from *Bacillus subtilis*, which performs an essential post-translational modification in CAR. Following culture condition optimization and the implementation of ISPR, the authors achieved a vanillin yield of 744 µM from 1 mM of TA, corresponding to a 74.4% molar conversion.

Kang et al. (2020) engineered an *E. coli* strain to efficiently produce 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDA) from chemically hydrolyzed PET feedstock. To accomplish this, the *tph* genes for TA degradation and *lig* genes from *Sphingomonas paucimobilis* for PDA synthesis were cloned into IPTG-inducible plasmids, which were then inserted into the bacteria. The resulting strain achieved a 99% molar yield in converting TA to PDA. The molecular structure of PDA features a pseudo-aromatic ring, making it a highly promising monomer for biopolymer production, combining the desirable properties of aromatic rings with improved biodegradability (Michinobu et al., 2007). PDA polyesters have been shown to be thermally

stable, highly elastic and possess strong adhering properties, making them a promising bioplastic for consumer goods industries (Hishida et al., 2009; Michinobu et al., 2009).

In a similar study, the nylon monomer, adipic acid, was also produced from TA using transformed *E. coli*. This engineered pathway starts with *tph* genes converting TA into PCA, followed by the transformation of PCA into catechol by AroY and KpdB from *Klebsiella pneumoniae*. The aromatic ring of catechol is then cleaved by *catA* from *Pseudomonas putida*, and the resulting intermediate is reduced to adipic acid by BcER from *Bacillus coagulans*. To enhance the stability and catalytic activity of BcER, the engineered cells were immobilized in alginate hydrogels. After optimizing culture conditions, the process achieved a yield of 79 % after 24 hours, corresponding to 115 mg L⁻¹ of adipic acid (Valenzuela-Ortega et al., 2023).

These previous studies employed plasmid-based expression systems, representing an initial step towards a viable industrial process. However, maintaining an expression vector within bacterial strains can be challenging and costly, particularly over multiple generations. Even with high yield rates, the viability of the overall process remains limited, especially when considering other industrial bottlenecks (Nora et al., 2018).

Pseudomonas putida strains are also candidates for PET monomer valorization due to its well-characterized genomes, which facilitate genetic manipulation (Weimer et al., 2020). Besides that, *Pseudomonas* genus is notoriously known for its metabolic versatility and its capability of metabolizing a variety of xenobiotics, being possible to couple the production of biotechnological substances and the degradation of anthropic waste (Bhatt et al., 2021).

For a holistic approach, *P. putida* KT2240 was used to express *I. sakaiensis* PETase and MHETase to hydrolase BHET (a PET oligomer) into both PET monomers. Additionally, *tph* from *Comamonas* sp. E6 and *tpaK* from *Rhodococcus jostii* were also cloned in the engineered *P. putida* KT2240 for TA oxidation to PCA and TA transport into the cells, respectively. All the heterologous genes were regulated under the strong constitutive promoter P_{tac} and incorporated in the host chromosome. As this strain possesses the whole machinery to incorporate PCA into the central metabolism, deletion of *pcaIJ* genes was implemented to force a dead-end to the pathway leading to β -ketoadipate (β KA) accumulation. Deletion of *gclR* gene, a negative regulator of glyoxylate carboligase pathway, and the substitution of its natural promoter for P_{tac} promoter were implemented to enhance the natural EG metabolism. Although the synthetic pathway was able to convert both monomers into β KA, the authors suggest that EG utilization may be under catabolic repression in the presence of β KA, so this metabolite may not be compatible for the conversion of EG (Werner et al., 2021). In this study, BHET was produced through the glycolysis of PET using EG as the diol and titanium butoxide

as the catalyst, both essential for the glycolysis reaction. This demonstrates the potential of coupling PET depolymerization with the production of β KA.

In a similar approach, Liu et al. (2022) engineered *P. putida* KT2440 aiming the production of muconic acid (MA) instead. To achieve this process, *tph* and *tpaK* genes were inserted into *P. putida* KT2440 and *gclR* was knock-out as previously done by Werner et al. (2021). Furthermore, PCA assimilation pathway was interrupted by *pcaHG* deletion and instead, PCA was converted to MA by the deletion of *catBC* and insertion of exogenous protocatechuate decarboxylase AroY and flavin prenyltransferase EcdB obtained from *Enterobacter cloacae*. Promoter P_{tac} was used to enhance the expression of native *glcDEF* and *cata* genes, to overexpress glycolate oxidase genes as well as the catechol dioxygenase, respectively. The recombinant strain was able to grow on both monomers while producing 2 g L^{-1} of MA in LB medium supplemented with 20 mM of each monomer. To further explore the strain potential, the LCC encoding gene was cloned into an expression vector, which was then transformed into the strain, enabling MA production directly from PET depolymerization. Under optimized conditions, the LCC-expressing strain produced 0.5 g of MA from 1.0 g of PET powder in LB medium, achieving a 50 % mass conversion ratio.

Using the same genetic backbone strategy (addition of *tph*, overexpression of *glcDEF* and deletion of *gclR*), Liu et al. (2023) were able to produce PHA from both PET monomers using *P. putida* KT2440. To further improve this process, they overexpressed PHA synthase (*phaCI*) by substituting its natural promoter with the strong promoter P_{46} , which had been previously identified to increase PHA production (Mitra et al., 2021), and deleted PHA depolymerase (*phaZ*) to avoid monomeric by-production. The final strain was then co-cultivated with an *E. coli* strain expressing ICCG (a genetically engineered LCC) to supply EG and TA directly from the hydrolyzation of PET, producing a single-step process contemplating PET depolymerization, monomers uptake and high-value substance production. In summary, various studies involving the genetic transformation of bacteria to enable the conversion of PET into high-value products are based on modification model bacteria to create new metabolic pathways or alter existing ones, either by overexpressing genes or blocking metabolic fluxes to accumulate the substance of interest. These strategies allow more diversity in final products, as it is not restricted to the bacteria's natural capabilities. However, genetic modifications represent another degree of complexity to the bioprocess and are not always cost-effective, as antibiotics or other selection markers may be required to maintain the overexpression vector, for example (Nora et al., 2018).

2.4.2.2. Genetic modifications to produce or accumulate metabolites

Some studies use genetic modifications to enhance the natural degradation rates of microbial strains or improve the production of specific compounds. These modifications involve increasing metabolic flux, overexpressing key genes, and blocking certain pathways to force the accumulation of desired products (Adrio; Demain et al., 2006). Although these strategies limit the potential organisms to those already capable of metabolizing EG and TA, various common metabolites have significant biotechnological applications. Producing these metabolites from plastic waste not only expands the range of potential waste uses but also diversifies waste valorization strategies.

Although *E. coli* does not naturally oxidize EG into glycolic acid (GA), it can perform this process using its native genes. To enable this, genes that encode for a propanediol oxidoreductase (*fucO*) and a glycolaldehyde dehydrogenase (*aldA*) need to be overexpressed for both growth and GA accumulation to be possible. GA can be further oxidized into glyoxylate which, depending on the oxygen-levels, is used in anabolic reactions or stops the carbon flux, resulting in the accumulation of glycolic acid. Aiming GA production, the best conversion cultivation method was controlling the oxygen levels to intercalate growth and production phases, leading to a GA production of 10.4 g L⁻¹ after 112 h, an 80 % mass yield (Pandit et al., 2021).

EG can be further metabolized into more complex molecules by *E. coli* through engineered metabolic pathways. Panda et al. (2023) modified a pathway to promote the conversion of EG into various aromatic compounds. To enable EG uptake, the genes *fucO* and *aldA* were overexpressed under the control of the constitutive promoter from DNA gyrase A. These genes were introduced into a mutant strain that had been already engineered for enhanced L-tyrosine production by deleting *tyrR* to remove transcriptional repression and *pheA* to eliminate the competing phenylalanine synthesis pathway. Additionally, a plasmid was constructed with an IPTG-inducible promoter regulating the expression of *aroG* and *tyrA*, both of which harbor mutations to prevent feedback inhibition. The strain transformed with this plasmid produced 2 g L⁻¹ of L-tyrosine from 10 g L⁻¹ of EG. To further extend the application of this engineered strain, the *tal* gene was introduced into another plasmid, encoding tyrosine ammonia lyase, which converts L-tyrosine into *p*-coumaric acid. After rearranging the expression vectors used, under equal conditions, the strain possessing both plasmids achieved a maximum yield of 1.0 g L⁻¹ of *p*-coumaric acid, and no L-tyrosine was detected. In another approach, L-phenylalanine could be produced from EG by a similar engineering strategy. This *E. coli* strain was a plasmid expressing *aroG* and *pheA*, both carrying mutations to prevent

feedback inhibition. Also, instead of deleting *pheA* as the previous strain, *tyrA* was knocked out to block the flux towards L-tyrosine, thereby redirecting all precursors toward L-phenylalanine production. The deletion of *tyrR* was also maintained as it also represses the transcription of *phe* genes. This new strain was able to produce 1.6 g L⁻¹ of L-phenylalanine from 10 g L⁻¹ of EG. With these strains, Panda et al. (2023) demonstrated the potential of amino acids and other aromatic compounds production through the engineering of a model organism.

Using a newly isolated *Rhodococcus jostii* strain, Diao et al. (2023) successfully produced carotenoids using TA and EG as its sole carbon source. The authors further introduced genetic modifications to increase lycopene production. The following modifications were introduced in the wild-type strain: transformation with a synthetic arabinose-inducible *crtEBI* operon plasmid to enhance the flux from precursors to lycopene; deletion of *crtL-b*, which led to the accumulation of lycopene by blocking its conversion to other carotenoids; and the addition of a synthetic operon to overexpress *dxs* and *idi* genes from *Corynebacterium glutamicum*, increased the production of lycopene precursors. These changes resulted in the highest producing strain (*R. jostii* S6), achieving lycopene production of up to 1.300 µg L⁻¹ using PET hydrolysate after 120 h in a fed-batch fermentation assay – a 500-fold increase compared to the wild-type strain. The production from PET hydrolysate and from commercial purified monomers was similar. Additionally, a biocatalysis process using ICCG was tested as an alternative way to obtain PET monomers for fermentation. The study confirmed that the engineered *R. jostii* strain was able to utilize as well, suggesting that the aforementioned process can be achieved using biocatalysis instead of alkaline hydrolysis. This approach offers a more environmentally friendly process, although the biocatalytic reaction has been shown to be slower and less efficient than alkaline hydrolysis.

Expression of heterologous enzymes was also implemented by Liu et al. (2021) by cloning the polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis operon from *Ralstonia eutropha* into a terephthalic acid-degrading *Pseudomonas* strain, TPA3. The engineered strain successfully produced PHB using TA as the sole carbon source, with a yield of 11.56 % of cell dry weight (g g⁻¹). To further expand its biotechnological applications, TPA3 was co-cultured with *Yarrowia lipolytica* harboring an episomal vector that expresses PETase from *Ideonella sakaiensis*, enabling a one-step conversion process from PET to PHB.

2.5. CONCLUSION

PET monomers ethylene glycol and terephthalic acid can be converted into substances with various biotechnological and industrial applications through microorganisms. However,

these processes still face significant obstacles to their large-scale application. Although several studies have demonstrated high conversion rates, many rely on complex culture media to convert substrates into bioproducts, increasing the cost of the process. Furthermore, the use of small initial amounts of substrate can give a false impression of the process's efficiency, as the results observed under controlled experimental conditions do not always translate to industrial scales. The toxicity of metabolic intermediates and ethylene glycol itself also presents a considerable challenge, as they can limit microbial growth and, consequently, the efficiency of biotechnological processes. Another factor that compromises economic viability is the maintenance of vectors for gene overexpression, which increases the cost of the process and makes its large-scale implementation less realistic.

To overcome these challenges, future studies should focus on strategies that make the process economically viable and efficient on a large scale, rather than merely discovering new microbial strains or products derived from plastic waste. High cell density cultures or fed-batch cultures can maximize substrate consumption, while *in situ* product recovery can minimize the inhibitory effects caused by certain toxic metabolites. Additionally, genetic modification of key metabolic pathways can enhance both substrate assimilation and the production of valuable compounds. These strategies, when combined with the optimization of cultivation conditions, have the potential to enable the economically sustainable bioconversion of PET.

The bioconversion of plastics into value-added metabolites offers a promising solution for mitigating the environmental impact of these wastes. By reintegrating plastic materials into the production cycle through advanced biotechnological strategies, it not only reduces the accumulation of plastic waste but also promotes a more sustainable and efficient economy, directly contributing to the advancement toward a circular economy model. However, to fully realize this potential, it is crucial to address the technical and economic challenges that still limit its application on an industrial scale.

2.6. REFERENCES

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Genetic improvement of processes yielding microbial products. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 30, n. 2, p. 187–214, 2006.
- BHATT, P.; BHANDARI, G.; BHATT, K.; MAITHANI, D.; MISHRA, S.; GANGOLA, S.; BHATT, R.; HUANG, Y.; CHEN, S. Plasmid-mediated catabolism for the removal of xenobiotics from the environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 420, n. July, p. 126618, 2021.
- CARNIEL, A.; SANTOS, A. G.; CHINELATTO, L. S. J.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z. Biotransformation of ethylene glycol to glycolic acid by *Yarrowia lipolytica*: A route for poly (ethylene terephthalate) (PET) upcycling. *Biotechnology Journal*, v. 18, n. 6, 2023.
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 18, n. 1, p. 3-4, 2000.
- DIAO, J.; HU, Y.; TIAN, Y.; CARR, R.; MOON, T. S. Upcycling of poly (ethylene terephthalate) to produce high-value bio-products. *Cell Reports*, v. 42, n. 1, p. 111908, 2023.
- EICHLER, B.; SCHINK, B. Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Archives Of Microbiology*, v. 140, n. 2-3, p. 147-152, dez. 1984. Springer Science and Business Media LLC.
- ESMAIL, A.; REBOCHO, A. T.; MARQUES, A. C.; SILVESTRE, S.; GONÇALVES, A.; FORTUNATO, E.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M.; FREITAS, F. Bioconversion of Terephthalic Acid and Ethylene Glycol into Bacterial Cellulose by *Komagataeibacter xylinus* DSM 2004 and DSM 46604. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, 2022.
- FERRE-GUELLE, A.; WINTERBURN, J. Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates with Controlled Composition and Microstructure. *Biomacromolecules*, v. 19, n. 3, p. 996–1005, 2018.
- FRAZÃO, C. J. R.; WAGNER, N.; RABE, K.; WALTHER, T. Construction of a synthetic metabolic pathway for biosynthesis of 2,4-dihydroxybutyric acid from ethylene glycol. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 0-0, 6 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC.
- FUJIWARA, R.; SANUKI, R.; AJIRO, H.; FUKUI, T.; YOSHIDA, S. Direct fermentative conversion of poly (ethylene terephthalate) into poly(hydroxyalkanoate) by *Ideonella sakaiensis*. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 0-0, 7 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
- GAO, X.; MA, Z.; YANG, L.; MA, J. Enhanced Bioconversion of Ethylene Glycol to Glycolic Acid by a Newly Isolated *Burkholderia* sp. EG13. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 174, n. 4, p. 1572–1580, 2014.
- HUA, X.; DU, G. L.; XU, Y. Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer. *Bioresource Technology*, v. 283, n. 159, p. 326–331, 2019.

JULLESSON, D.; DAVID, F.; PFLEGER, B.; NIELSEN, J. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 7, p. 1395–1402, 2015.

KAHLERT, S.; BENING, C. R. Why pledges alone will not get plastics recycled: Comparing recycle production and anticipated demand. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 181, n. December 2021, p. 106279, 2022.

KALATHIL, S.; MILLER, M.; REISNER, E. Microbial Fermentation of Polyethylene Terephthalate (PET) Plastic Waste for the Production of Chemicals or Electricity. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 61, n. 45, 2022.

KANG, M. J.; KIM, H. T.; LEE, M. W.; KIM, K. A.; KHANG, T. U.; SONG, H. M.; PARK, S. J.; JOO, J. C.; CHA, H. G. A chemo-microbial hybrid process for the production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid as a promising bioplastic monomer from PET waste. *Green Chemistry*, v. 22, n. 11, p. 3461–3469, jun. 2020.

KATAOKA, M.; NAGASAWA, T.; YAMADA, H. Nitrile hydratase catalyzed production of acrylamide from acrylonitrile: comparison of *Rhodococcus* and *Brevibacterium* enzymes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 65, n. 10, p. 2265–2270, 2001.

KENNY, S. T.; NIKODINOVIC RUNIC, J.; KAMINSKY, W.; WOODS, T.; BABU, R. P.; O'CONNOR, K. E. Development of a bioprocess to convert PET derived terephthalic acid and biodiesel derived glycerol to medium chain length polyhydroxyalkanoate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 95, n. 3, p. 623–633, 2012.

KENNY, S. T.; NIKODINOVIC RUNIC, J.; KAMINSKY, W.; WOODS, T.; BABU, R. P.; KEELY, C. M.; BLAU, W.; O'CONNOR, K. E. Up-cycling of PET (polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (polyhydroxyalkanoate). *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 20, p. 7696–7701, out. 2008.

KIM, D. H.; HAN, D. O.; SHIM, K. I.; KIM, J. K.; PELTON, J. G.; RYU, M. H.; JOO, J. C.; HAN, J. W.; KIM, H. T.; KIM, K. H. One-Pot Chemo-bioprocess of PET Depolymerization and Recycling Enabled by a Biocompatible Catalyst, Betaine. *ACS Catalysis*, v. 11, n. 7, p. 3996–4008, 2021.

KIM, H. T.; KIM, J. K.; CHA, H. G.; KANG, M. J.; LEE, H. S.; KHANG, T. U.; YUN, E. J.; LEE, D. H.; SONG, B. K.; PARK, S. J.; JOO, J. C.; KIM, K. H. Biological Valorization of Poly(ethylene terephthalate) Monomers for Upcycling Waste PET. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 7, n. 24, p. 19396–19406, 2019.

KIM, N.-K.; LEE, S.-H.; PARK, H.-D. Current biotechnologies on depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and repolymerization of reclaimed monomers from PET for bio-upcycling: A critical review. *Bioresource Technology*, v. 363, p. 127931, nov. 2022.

KLEEREBEZEM, R.; HULSHOFF POL, L. W.; LETTINGA, G. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 1152–1160, mar. 1999.

LIU, F.; ZHENG, Y.; YUAN, Y.; HAN, Y.; SU, T.; QI, Q. Current advances in the structural biology and molecular engineering of PETase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 11, n. September, 2023.

LIU, P.; ZHENG, Y.; YUAN, Y.; ZHANG, T.; LI, Q.; LIANG, Q.; SU, T.; QI, Q. Valorization of Polyethylene Terephthalate to Muconic Acid by Engineering *Pseudomonas Putida*. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 19, 2022.

LIU, P.; ZHANG, T.; ZHENG, Y.; LI, Q.; SU, T.; QI, Q. Potential one-step strategy for PET degradation and PHB biosynthesis through co-cultivation of two engineered microorganisms. *Engineering Microbiology*, v. 1, p. 100003, dez. 2021. Elsevier BV.

LIU, P.; ZHENG, Y.; YUAN, Y.; HAN, Y.; SU, T.; QI, Q. Upcycling of PET oligomers from chemical recycling processes to PHA by microbial co-cultivation. *Waste Management*, v. 172, p. 51-59, dez. 2023. Elsevier BV.

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

MEYER, A.; PELLAUX, R.; PANKE, S. Bioengineering novel in vitro metabolic pathways using synthetic biology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 246–253, 2007.

MOHER, D.; SHAMSEER, L.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L. A. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic Reviews*, v. 4, p. 1-9, 2015.

MÜCKSCHEL, B.; SIMON, O.; KLEBENSBERGER, J.; GRAF, N.; ROSCHE, B.; ALTENBUCHNER, J.; PFANNSTIEL, J.; HUBER, A.; HAUER, B. Ethylene Glycol Metabolism by *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 24, p. 8531-8539, 15 dez. 2012. American Society for Microbiology.

NA, D.; KIM, T. Y.; LEE, S. Y. Construction and optimization of synthetic pathways in metabolic engineering. *Current Opinion in Microbiology*, v. 13, n. 3, p. 363–370, 2010.

NORA, L. C.; WESTMANN, C. A.; MARTINS-SANTANA, L.; ALVES, L. F.; MONTEIRO, L. M. O.; GUAZZARONI, M. E.; SILVA-ROCHA, R. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 125–147, 2019.

PANDA, S.; FU, J.; ZHOU, J.; FEIGIS, M.; HARRISON, E.; MA, X.; YUEN, V. F. K.; MAHADEVAN, R.; ZHOU, K. Engineering *Escherichia coli* to produce aromatic chemicals from ethylene glycol. *Metabolic Engineering*, v. 79, p. 38–48, 2023.

PANDIT, A. V.; HARRISON, E.; MAHADEVAN, R. Engineering *Escherichia coli* for the utilization of ethylene glycol. *Microbial Cell Factories*, v. 20, n. 1, p. 1–17, 2021.

QIU, Y. L.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; IMACHI, H.; TSENG, I. C.; CHENG, S. S.; OHASHI, A.; HARADA, H.; KAMAGATA, Y. *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: Two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers

in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. *Archives of Microbiology*, v. 185, n. 3, p. 172–182, 2006.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.

RETHLEFSEN, M. L.; PAGE, M. J. PRISMA 2020 and PRISMA-S: common questions on tracking records and the flow diagram. *Journal of the Medical Library Association*, v. 110, n. 2, p. 253-257, 2022.

SADLER, J. C.; WALLACE, S. Microbial synthesis of vanillin from waste poly(ethylene terephthalate). *Green Chemistry*, v. 23, n. 13, p. 4665–4672, jul. 2021.

SHAH, D. T.; BERGER, P. A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; MADDEN, L. A.; ANDERSON, A. J. Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* in the Presence of ¹³C-Labeled Ethylene Glycol. *Macromolecules*, v. 33, p. 6624-6626, 2000.

STEPHEN, J. L.; PERIYASAMY, B. Innovative developments in biofuels production from organic waste materials: A review. *Fuel*, v. 214, n. November 2017, p. 623–633, 2018.

TISO, T.; NARANCIC, T.; WEI, R.; POLLET, E.; BEAGAN, N.; SCHRÖDER, K.; HONAK, A.; JIANG, M.; KENNY, S. T.; WIERCKX, N. Towards bio-upcycling of polyethylene terephthalate. *Metabolic Engineering*, v. 66, p. 167-178, jul. 2021. Elsevier BV.

TRIFUNOVIĆ, D.; SCHUCHMANN, K.; MÜLLER, V. Ethylene Glycol Metabolism in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *Journal of Bacteriology*, v. 198, n. 7, p. 1058–1065, jan. 2016.

VALENZUELA-ORTEGA, M.; SUITOR, J. T.; WHITE, M. F. M.; HINCHCLIFFE, T.; WALLACE, S. Microbial Upcycling of Waste PET to Adipic Acid. *ACS Central Science*, v. 9, n. 11, p. 2057–2063, nov. 2023.

WEI, G.; YANG, X.; ZHOU, W.; LIN, J.; WEI, D. Adsorptive bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biochemical Engineering Journal*, v. 47, n. 1–3, p. 127–131, 2009.

WEI, G.; YANG, X.; GAN, T.; ZHOU, W.; LIN, J.; WEI, D. High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 36, n. 8, p. 1029-1034, 12 maio 2009. Oxford University Press (OUP).

WEIMER, A.; KOHLSTEDT, M.; VOLKE, D. C.; NIKEL, P. I.; WITTMANN, C. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 18, p. 7745–7766, 2020.

WERNER, A. Z.; CLARE, R.; MAND, T. D.; PARDO, I.; RAMIREZ, K. J.; HAUGEN, S. J.; BRATTI, F.; DEXTER, G. N.; ELMORE, J. R.; HUENEMANN, J. D. Tandem chemical deconstruction and biological upcycling of poly(ethylene terephthalate) to β -keto adipic acid by *Pseudomonas putida* KT2440. *Metabolic Engineering*, v. 67, p. 250-261, set. 2021. Elsevier BV.

YOSHIDA, S.; HIRAGA, K.; TAKEHANA, T.; TANIGUCHI, I.; YAMAJI, H.; MAEDA, Y.; TOYOHARA, K.; MIYAMOTO, K.; KIMURA, Y.; ODA, K. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science (New York, N.Y.)*, v. 351, n. 6278, p. 1196–1199, mar. 2016.

ZHANG, Y.; CHEN, Y.; CAO, G.; MA, X.; ZHOU, J.; XU, W. Bacterial cellulose production from terylene ammonia hydrolysate by *Taonella mepensis* WT-6. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 166, p. 251–258, 2021.

2.7. SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table 2: Search terms used.

Database	Descriptors	Items found
PUBMED	#1. Microorganismos (“fungal” [Title/Abstract] OR “fungus” [Title/Abstract] OR “bacteria” [Title/Abstract] OR “bacterial” [Title/Abstract] OR “microbial” [Title/Abstract] OR “microorganism” [Title/Abstract] OR “consortia” [Title/Abstract])	1,214,352
	#2. Substrate (“PET monomer”[Title/Abstract] OR “Ethylene Glycol”[Title/Abstract] OR “Terephthalate”[Title/Abstract] OR “Terephthalic acid”[Title/Abstract] OR “PET” [Title/Abstract])	171,328
	#3. Conversion (“Bioconversion” [Title/Abstract] or “Biodegradation” [Title/Abstract] or “degradation” [Title/Abstract] or “Transformation” [Title/Abstract] or “Conversion” [Title/Abstract] or “Biotransformation” [Title/Abstract] or “Metabolism” [Title/Abstract] or “Valorization” [Title/Abstract] or “Upcycling” [Title/Abstract])	1,688,821
	Total found on PUBMED: #1 and #2 and #3	758
Web of Science	#1. Microorganismos TS= (“fungal” OR “fungus” OR “bacteria” OR “bacterial” OR “microbial” OR “microorganism” OR “consortia”)	1,713,757
	#2. Substrate TS= (“PET monomer” OR “Ethylene Glycol” OR “Terephthalate” OR “Terephthalic acid” OR “PET”)	351,596
	#3. Conversion TS= (“Bioconversion” or “Transformation” or “Conversion” or “Biotransformation” or “Metabolism” or “Valorization” or “Upcycling”)	2,756,795
	Total found on Web of Science: #1 and #2 and #3	647
Scopus	#1. Microorganismos (“fungal” OR “fungus” OR “bacteria” OR “bacterial” OR “microbial” OR “microorganism” OR “consortia”)	3,487,922

Database	Descriptors	Items found
	#2. Substrate ("PET monomer" OR "Ethylene Glycol" OR "Terephthalate" OR "Terephthalic acid" OR "PET")	366,945
	#3. Conversion ("Bioconversion" or "Biodegradation" or "degradation" or "Transformation" or "Conversion" or "Biotransformation" or "Metabolism" or "Valorization" or "Upcycling")	7,702,363
	Total found on Scopus: #1 and #2 and #3	3,875
Overall total:		5,280

Table 3: Selected studies' remaining information

Year	Authors	Country	Title	Journal
1984	Eichler and Schink	Germany	Oxidation of primary aliphatic alcohols by <i>Acetobacterium carbinolicum</i> sp. Nov., a homoacetogenic anaerobe	Archives of Microbiology
1999	Kleerebezem et al.	Netherlands	Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia	Applied and Environmental Microbiology
2000	Shah et al.	United Kingdom	Synthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) by <i>Ralstonia eutropha</i> in the presence of ¹³ C-Labeled ethylene glycol	ACS Macromolecules
2001	Kataoka et al.	Japan	Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
2006	Qiu et al.	Japan	<i>Pelotomaculum terephthalicum</i> sp. nov. and <i>Pelotomaculum isophthalicum</i> sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens	Archives of Microbiology
2008	Kenny et al.	Ireland	Up-cycling of PET (Polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (Polyhydroxyalkanoate)	Environmental Science & Technology
2009	Wei et al.	China	High density fermentation of <i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003 for glycolic acid production	Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology
2009	Wei et al.	China	Adsorptive bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by <i>Gluconobacter oxydans</i> DSM 2003	Biochemical Engineering Journal
2012	Mückschel et al.	Germany	Ethylene glycol metabolism by <i>Pseudomonas putida</i>	Applied and Environmental Microbiology
2012	Kenny et al.	Ireland	Development of a bioprocess to convert PET derived terephthalic acid and biodiesel derived glycerol to medium chain length polyhydroxyalkanoate	Applied and Environmental Microbiology

Year	Authors	Country	Title	Journal
2014	Gao et al.	China	Enhanced bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by a newly isolated Burkholderia sp. EG13	Applied Biochemistry and Biotechnology
2016	Trifunovic et al.	Germany	Ethylene glycol metabolism by acetogen <i>Acetobacterium woodii</i>	Journal of Bacteriology
2019	Hua et al.	China	Cost-practical of glycolic acid bioproduction by immobilized whole-cell catalysis accompanied with compressed oxygen supplied to enhance mass transfer	Bioresource Technology
2019	Kim et al.	South Korea	Biological valorization of Poly (ethylene terephthalate) monomers for upcycling waste PET	ACS Sustainable Chemistry & Engineering
2020	Kang et al.	South Korea	A chemo-microbial hybrid process for the production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid as a promising bioplastic monomer from PET waste	Green Chemistry
2020	Zhang et al.	China	Bacterial cellulose production from terylene ammonia hydrolysate by <i>Taonella mepensis</i> WT-6	International Journal of Biological Macromolecules
2021	Fujiwara et al.	Japan	Direct fermentative conversion of poly (ethylene terephthalate) into poly(hydroxyalkanoate)	Scientific Reports
2021	Kim et al.	South Korea	One-pot chemo-bioprocess of PET depolymerization and recycling enabled by a biocompatible catalyst, Betaine	ACS Catalysis
2021	Liu et al.	China	Potential one-step strategy for PET degradation and PHB biosynthesis through co-cultivation of two engineered microorganisms	Engineering Microbiology
2021	Pandit et al.	Canada	Engineering Escherichia coli for the utilization of ethylene glycol	Microbial Cell Factories
2021	Sadler and Wallace	United Kingdom	Microbial synthesis of vanillin from waste poly (ethylene terephthalate)	Green Chemistry
2021	Tiso et al.	Germany	Towards bio-upcycling of polyethylene terephthalate	Metabolic Engineering
2021	Werner et al.	United States of America	Tandem chemical deconstruction and biological upcycling of poly (ethylene terephthalate) to B-ketoadipic acid by <i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Metabolic Engineering
2022	Carniel et al.	Brazil	Biotransformation of ethylene glycol to glycolic acid by <i>Yarrowia lipolytica</i> : A route for poly (ethylene terephthalate) (PET) upcycling	Biotechnology Journal

Year	Authors	Country	Title	Journal
2022	Esmail et al.	Portugal	Bioconversion of terephthalic acid and ethylene glycol into bacterial cellulose by <i>Komagataeibacter xylinus</i> DSM 2004 and DSM 46604	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology
2022	Kalathil et al.	United Kingdom	Microbial fermentation of polyethylene terephthalate (PET) plastic waste for the production of chemicals or electricity	Angewandte Chemie International Edition
2022	Liu et al.	China	Valorization of polyethylene terephthalate to muconic acid by engineering <i>Pseudomonas putida</i>	International Journal of Molecular Sciences
2023	Diao et al.	United States of America	Upcycling of poly (ethylene terephthalate) to produce high-value bio-products	Cell Reports
2023	Frazão et al.	Germany	Construction of a synthetic metabolic pathway for biosynthesis of 2,4-dihydroxybutyric acid from ethylene glycol	nature communications
2023	Liu et al.	China	Upcycling of PET oligomers from chemical recycling processes to PHA by microbial co-cultivation	Waste Management
2023	Panda et al.	Singapore	Engineering <i>Escherichia coli</i> to produce aromatic chemicals from ethylene glycol	Metabolic Engineering
2023	Valenzuela-Ortega et al.	United Kingdom	Microbial upcycling of waste PET to adipic acid	ACS central science

3. CAPÍTULO 2: Isolamento de bactérias degradadoras de monômeros de polietileno tereftalato e prospecção de produtos com potencial biotecnológico

3.1. INTRODUÇÃO

Plásticos são amplamente utilizados em diversos setores da sociedade, principalmente na forma de embalagens, bens de consumo e materiais de construção. No entanto, grande parte desses materiais é descartada de forma inadequada, contaminando ecossistemas e ameaçando a biodiversidade (Geyer et al., 2017). Diante desse cenário, a reciclagem se consolidou como uma das soluções mais empregadas para diminuir o acúmulo de plástico no ambiente e reutilizar essa matéria-prima, reduzindo a necessidade de produzir plástico virgem a partir de combustíveis fósseis (Scheirs, 1998).

Entre os diversos tipos de plástico, o polietileno tereftalato (PET) se destaca por sua alta taxa de recuperação (Scheirs, 1998). No entanto, a reciclagem de PET ainda enfrenta desafios significativos, tanto em termos de viabilidade econômica quanto de impacto ambiental. Os métodos de reciclagem atuais demandam grandes quantidades de água, energia e altas temperaturas, além de envolverem o uso de solventes orgânicos tóxicos, o que aumenta os custos energéticos e o impacto ambiental (Frounchi, 1999; Ghosal e Nayak, 2022). Como resultado, o custo de produção de plástico reciclado supera o do plástico virgem, prejudicando a competitividade do processo. Além disso, a reciclagem convencional não atende à necessidade de substituir os polímeros sintéticos por biopolímero, nem resolve o problema do plástico já acumulado no meio ambiente.

Nesse contexto, a bioconversão surge como uma alternativa promissora ao integrar a degradação do plástico com a produção de substâncias de interesse econômico (Qi et al., 2022). A identificação de microrganismos capazes de metabolizar os monômeros de plásticos e convertê-los em produtos de valor comercial é essencial para o desenvolvimento de tecnologias que promovam a integração da biodegradação e valorização desse tipo de resíduo, criando soluções mais sustentáveis e economicamente viáveis para o seu tratamento. Durante o presente estudo, foram isoladas bactérias com a capacidade de degradar ácido tereftálico e etilenoglicol. Esses microrganismos foram analisados quanto à sua capacidade de produzir polihidroxialcanoatos (PHA), biossurfactantes e exopolissacarídeos, que são compostos com amplo potencial de aplicação em indústrias como as de bioplásticos, cosméticos e farmacêutica, buscando desenvolver bioprocessos alternativos, sustentáveis e viáveis para a valorização de resíduos plásticos.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Meios de cultura utilizados

Meio mineral (MM) é composto por (g L⁻¹): K₂HPO₄ (13,9), KH₂PO₄ (2,7), NH₄NO₃ (1,0), extrato de levedura (0,05), glicose (1,0) e 50 mL de solução de micronutrientes (EDTA (0,5), MgSO₄.7H₂O (3,0), MnSO₄.4H₂O (0,5), NaCl (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,1), CoCl₂.6H₂O (0,1), ZnSO₄.7H₂O (0,1), FeSO₄.7H₂O (0,1), CuSO₄.5H₂O (0,01), Na₂MoO₄.2H₂O (0,01), NaSeO₄ (0,01), Na₂WO₄.2H₂O (0,01), NiCl₂.6H₂O (0,02)).

Tryptic soy broth (TSB) é composto por (g L⁻¹): peptona de caseína (17,0), peptona de soja (3,0), glicose (2,5), NaCl (5,0) e K₂HPO₄ (2,5). Ao acrescentar ágar (15,0), esse meio passa a ser denominado como tryptic soy agar (TSA).

Meio de sais minerais adaptado (MSM) é composto por (g L⁻¹): K₂HPO₄ (2,27), KH₂PO₄ (0,95), NH₄Cl (0,25) e 2 mL de solução de metais (Na₂EDTA.2H₂O (6,37), ZnSO₄.7H₂O (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,5), FeSO₄.7H₂O (2,5), NaMoO₄.2H₂O (0,1), CuSO₄.5H₂O (0,1), CoCl₂.6H₂O (0,2), MnSO₄.H₂O (0,52) e MgSO₄.7H₂O (60,0)).

3.2.2. Cultura de enriquecimento e isolamento microbiano

A frascos Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 30 mL de meio mineral (MM), substituindo-se a glicose por 5,0 g L⁻¹ de ácido tereftálico (MMTA) ou 5,0 g L⁻¹ de etilenoglicol (MMEG). Em seguida, 20 g de composto de folha de eucalipto e esterco foram suspensos em 200 mL de solução salina (9,0 g L⁻¹ de NaCl) e 3 mL dessa suspensão foram adicionados aos frascos. O enriquecimento e posterior isolamento foram realizados em meio contendo cada fonte de carbono separadamente, com o pH inicial ajustado a 7,0 e 8,0. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C e 40 °C em incubadora de agitação orbital. Cada tratamento foi realizado em duplicata. Amostras dos frascos que apresentaram crescimento microbiano (aumento da turbidez) foram transferidas (3 mL) para novos frascos contendo 30 mL de MMTA ou MMEG, até serem completadas três transferências. Após o período de enriquecimento, as culturas foram submetidas à diluição seriada decimal e 100 µL das diluições 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram inoculadas em MMTA ou MMEG acrescido de ágar (15 g L⁻¹) por *spread plate*. As placas foram incubadas nas respectivas temperaturas de cultivo. Colônias morfológicamente distintas foram transferidas para placas de Petri contendo meio TSA, as quais foram incubadas nas respectivas temperaturas de cultivo. Este procedimento foi repetido duas vezes para garantir a pureza das colônias obtidas.

O composto foi obtido de uma composteira montada para aulas práticas da disciplina de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Viçosa, localizada nas coordenadas

20°45'27.9"S 42°52'14.8"W. A amostra foi coletada no dia 22 de setembro de 2023, quando a composteira estava no final da fase termofílica. A amostra de compostagem foi utilizada para o isolamento por se tratar de um material com altas atividade e diversidade microbianas (Chopkova et al., 2023). Além disso, material vegetal possui diversos compostos aromáticos, principalmente como componentes da lignina, que são metabolizados por vias semelhantes às utilizadas para o catabolismo de ácido tereftálico. Já o etilenoglicol é metabolizado por álcoois desidrogenases promíscuas, encontradas em diversos grupos de microrganismos do solo. Por conta disso, a escolha da pilha de compostagem como fonte de microrganismos potencialmente capazes de utilizar TA e EG é coerente com os objetivos do trabalho.

Para a adição dos isolados à coleção do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), uma colônia de cada isolado obtido foi transferida para caldo TSB, seguindo-se incubação *overnight* a 200 rpm nas respectivas temperaturas de cultivo. Em seguida, 750 µL do cultivo foi adicionado em criotubos junto a 750 µL de solução de glicerol a 50 % (v/v). As culturas foram preservadas a -80 °C.

3.2.3. *Triagem dos isolados consumidores de etilenoglicol e ácido tereftálico*

Os isolados foram estriados em placas de Petri contendo TSA e incubados nas respectivas temperaturas de cultivo. Em seguida, uma colônia foi transferida para tubo de ensaio contendo TSB e cultivada *overnight*. Uma alíquota desse cultivo foi transferida para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de MMTA ou MMEG, de modo a se obter uma densidade óptica inicial a 600 nm (DO_{600}) de 0,1. O cultivo foi acompanhado pela leitura da DO_{600} . Alíquotas de 1 mL foram coletadas após 72 horas de cultivo para quantificação de TA e EG por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC). Isolados que não apresentaram crescimento foram desconsiderados para as etapas seguintes. A densidade óptica foi avaliada em espectrofotômetro Genesys 10S UV/VIS (Thermo Fisher Scientific).

As amostras coletadas para quantificação dos substratos residuais foram centrifugadas a 10.000 G por 5 minutos e o sobrenadante filtrado em filtros de poliamida (0,22 µm). A quantificação de EG foi realizada em coluna Biohad HPX 87H, 300 x 7,8 mm, utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu Prominence 20A acoplado a um detector de índice de refração (RID) Shimadzu 20A. O volume injetado foi de 5 µL. Ácido sulfúrico 5 mmol L⁻¹ foi utilizado como fase móvel, com fluxo de 0,7 mL min⁻¹. A temperatura do compartimento da coluna foi mantido a 45 °C. O TA foi quantificado injetando-se o mesmo volume do filtrado em coluna Phenomenex Kinetex C18, 100 A, 250 x 4,6 mm, utilizando um detector SPD-20A Shimadzu

a 250 nm. Metanol 40% (v v⁻¹) em água ultrapura foi utilizado como fase móvel com fluxo de 0,8 mL min⁻¹ em corrida isocrática. A temperatura do compartimento da coluna foi mantida a 30 °C.

Os isolados foram classificados de acordo com o consumo relativo do substrato (0 - 100%) após 72 h: (-) consumo abaixo de 10 %; (+) consumo entre 10 e 50 %; (++) consumo entre 50 e 90 %; e (+++) consumo acima de 90 %. Aqueles isolados classificados como +++ foram submetidos à identificação e cultivados em MM contendo 40 g L⁻¹ de TA ou EG, em triplicata. A cada 24 h foi coletado 1 mL do cultivo para se determinar a concentração residual dos substratos, conforme metodologia descrita anteriormente, até que a cultura atingisse a fase estacionária de crescimento. Ao final do cultivo, as células foram separadas do meio por centrifugação a 10.000 G por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado com água destilada, centrifugado novamente e seco em estufa a 60 °C até atingir peso constante. O rendimento de massa seca foi expresso em g L⁻¹.

3.2.4. Extração de ácidos graxos e identificação por MIDI Sherlock

Os isolados foram cultivados em TSA a 30 °C em estrias compostas até as colônias do quarto quadrante apresentarem crescimento confluyente. Esse procedimento foi repetido a partir das colônias formadas no quarto quadrante do primeiro cultivo. Assim que o segundo cultivo apresentou crescimento confluyente no quarto quadrante, cerca de 40 mg de massa bacteriana foram coletados para a extração de ácidos graxos. A obtenção e análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido para o SherlockTM Microbial Identification System (MIDI), empregando-se um cromatógrafo a gás 7890 A (Agilent Technologies). Os perfis de ácidos graxos dos isolados foram comparados e um dendrograma da Distância Euclidiana (DE) foi construído pelo mesmo software para verificar se os isolados representam linhagens diferentes. Adotou-se o valor de DE dos perfis de ácidos graxos de 2,5 como ponte de corte para definir se duas amostras pertencem (DE < 2,5) ou não (DE > 2,5) a um mesmo isolado, como sugerido pelo próprio programa.

3.2.5. Extração de DNA e amplificação parcial do gene 16S

Para extração do DNA genômico, foi utilizado o kit GenEluteTM Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich). Utilizou-se 1,0 mL de uma cultura cultivada *overnight* em TSB de cada isolado. A qualidade do DNA extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (m/v) utilizando-se o corante GelRedTM (Biotium). As imagens foram reveladas em um transiluminador UVITEC Cambridge e obtidas no software FireReader V10.

A partir do DNA extraído foi realizada a amplificação parcial do gene codificador do RNA ribossomal 16S pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os reagentes da reação consistiam de (μL /amostra): H_2O grau biologia molecular (14,875), 5X GoTaq Buffer® (5,0), MgCl_2 25 mM (2,0), solução de dNTPs 10 mM (1,0), primer F (0,5), primer R (0,5) e GoTaq® (0,125). Todos os reagentes foram obtidos da Promega, com exceção dos primers, sintetizados pela Exxtend. Os primers utilizados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e o 1492F (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). A reação ocorreu em 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 60 s e 72 °C por 60 s, com uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min em um termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf).

A qualidade da PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % (m v^{-1}), utilizando-se o corante GelRed™. As imagens foram obtidas como descrito anteriormente. Os produtos amplificados foram comparados com o marcador 1 kb DNA Ladder (Promega) e purificados com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Os amplicons purificados foram quantificados pelo método de Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen™) e sequenciados por sequenciamento de Sanger (Sequenciador ABI 3730xL de 48 capilares, Fiocruz). As sequências foram analisadas no GenBank utilizando a ferramenta *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTn). Utilizando o software MEGA-X, as sequências foram alinhadas pelo algoritmo MUSCLE e as árvores filogenéticas foram construídas pelo método de neighbor-joining, com bootstrap de 10.000 réplicas.

3.2.6. *Teste de produção de biossurfactantes*

Para avaliar a produção de biossurfactantes, os isolados foram cultivados em TSB a 30 °C, 200 rpm e em MSM acrescido de, separadamente, TA (10 g L^{-1}), EG (10 g L^{-1}), óleo de soja (20 g L^{-1}), glicerol (20 g L^{-1}) e n-hexadecano (20 g L^{-1}) por 168 h, a 200 rpm e 30 °C. Em seguida, 1,0 mL da fase aquosa do cultivo foi coletado e centrifugado a 10.000 G por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e utilizado no teste de espalhamento de óleo. Resumidamente, 20 μL de petróleo são adicionados sobre 70 mL de água destilada em placa de Petri (150 x 20 mm). Após a formação do filme de óleo sobre a superfície da água, 10 μL do sobrenadante do cultivo são adicionados sobre o petróleo. A presença de biossurfactantes é indicada pela formação do halo de espalhamento de óleo (Morikawa et al., 2000).

3.2.7. *Teste de produção de exopolissacarídeos*

Para avaliar a capacidade de produção de exopolissacarídeos, os isolados foram cultivados em MSM acrescido de TA e EG ($10,0 \text{ g L}^{-1}$, separadamente), ágar ($15,0 \text{ g L}^{-1}$) e

calcofluor (0,2 g L⁻¹) durante 72 h a 30 °C. A produção de exopolissacarídeos é indicada pela fluorescência da colônia sob luz ultravioleta (Leigh et al., 1985).

3.2.8. Teste de produção de polihidroxialcanoatos (PHAs)

Para avaliar a capacidade de produção de PHA, os isolados foram cultivados em MSM como no item 3.2.7., sem a adição de calcofluor. Após o 72 h, aproximadamente 3 mL de uma solução de Azul de Nilo sulfato em etanol (0,5 g L⁻¹) foram adicionadas sobre as colônias e as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. A produção de PHAs é indicada pela fluorescência da colônia sob luz ultravioleta (Kitamura; Doi, 1994).

A capacidade de produção de PHAs dos isolados foi comparada por método adaptado de Oishiki et al. (2011). Os isolados identificados como potenciais produtores de PHAs foram cultivados em placa de 96 poços em MSM como anteriormente (item 3.2.8), com exceção do ágar, e em MSM acrescido de glicose (10,0 g L⁻¹) por 72 h a 30 °C. Cada poço continha 200 µL de meio de cultura, e os cultivos foram feitos em quadruplicatas biológicas. Ao final do cultivo, avaliou-se a DO₆₀₀ das culturas em um leitor Varioskan (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA). Posteriormente, 20 µL de solução de Azul de Nilo sulfato em água (2,2 g L⁻¹) foram adicionados em cada poço e a microplaca foi mantida em temperatura ambiente por 3 minutos. A fluorescência foi medida em um equipamento Varioskan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) a 490 e 590 nm de excitação e emissão, respectivamente, antes e depois da adição do corante, e a capacidade de produção de PHAs foi estimada pela seguinte fórmula:

$$PHA = \frac{(Fl_{corada} - Fl_{branco1}) - (Fl_{não-corada} - Fl_{branco2})}{DO_{600}}$$

sendo Fl_{corada} a amostra adicionada do reagente de fluorescência Azul de Nilo sulfato; Fl_{branco1}, meio de cultura adicionado do reagente de fluorescência; Fl_{não-corada}, amostra sem adição do reagente de fluorescência; Fl_{branco2}, meio de cultura sem a adição do reagente de fluorescência.

As médias de cada isolado foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e posteriormente comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se para ambos os testes um p-valor de 0,05. A linhagem de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle negativo e valores menores que a dela foram considerados como produção não expressiva de PHA nessas condições. Posteriormente, o isolado que apresentou maior média teve os PHAs caracterizados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

3.2.9. Caracterização de PHAs produzidos a partir de TA

Os PHAs foram extraídos de um cultivo do isolado TA18 em MSM TA (10 g L^{-1}) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm, 72 horas e derivatizados pelo método proposto por Oehmen et al. (2005). Resumidamente, cerca de 20 mg de massa seca do cultivo foram adicionados a tubos de vidro contendo 2 mL de clorofórmio, 1,8 mL de metanol acidificado (15 % H_2SO_4) e 0,2 mL de solução de benzoato de sódio ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) preparado em metanol acidificado. A amostra foi aquecida em banho-maria a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 horas e resfriada à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado à amostra 1,14 mL de água, o tubo foi brevemente agitado em agitador tipo vórtex e deixado em repouso por 1 h para separação da fase aquosa (água/metanol) e orgânica (clorofórmio/PHA derivatizados). A fase orgânica foi recuperada e analisada por GC/MS.

Para análise em GC/MS, foi utilizado o cromatógrafo a gás Shimadzu Q P 2020 acoplado a detector seletivo 5975I MS, utilizando-se uma coluna capilar HP-5MS (30 m x 25 mm x 25 μm). As temperaturas de injeção, da interface, do quadrupolo e da fonte de ionização foram de $250 \text{ }^\circ\text{C}$, $280 \text{ }^\circ\text{C}$, $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e $250 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, com aumento gradual de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ até $280 \text{ }^\circ\text{C}$, a qual foi mantida por 5 minutos. A fase móvel utilizada foi gás hélio em fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. Foi injetado 1 μL da amostra derivatizada, com *delay* do solvente ajustado para 4 minutos. Utilizou-se o impacto de elétron como método de ionização a 70 eV para detecção pelo MS e foi avaliado o espectro de 60 a 600 m/z. A identificação foi realizada pela comparação das relações massa-carga com a biblioteca NIST 14 (Mass Spectral Library & Search Software - Version 2014) e considerada a substância com maior índice de similaridade.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolamento a partir das culturas de enriquecimento

Ao todo, foram isoladas 42 bactérias a partir do enriquecimento em MMTA e 37 a partir do MMEG. Os isolados foram classificados conforme a concentração do substrato testado após 72 h de cultivo (Tabela 4). As curvas-padrão para quantificação de TA e EG foram apresentadas no material suplementar (Figuras 11, 12 e 13).

Nem todos os isolados foram capazes de consumir TA ou EG quando em culturas puras. Conclui-se que o crescimento desses isolados nas culturas de enriquecimento resultou do consumo de metabólitos produzidos e secretados por outros microrganismos presentes no meio. Os isolados TA18, TA21, TA27, TA33, TA34, TA38, TA39, EG6, EG7, EG11, EG14, EG15, EG16, EG18 e EG20 mostraram elevado consumo do respectivo substrato e foram escolhidos para as próximas etapas do trabalho.

Tabela 4: Bactérias isoladas a partir das culturas de enriquecimento

Temperatura	pH	Frasco	Identificação	Capacidade de degradação do substrato*
30	7,0	1	TA1	+
			TA2	+
			TA3	-
			TA4	-
			TA5	++
			TA6	++
			TA7	++
			TA8	+
30	7,0	2	TA9	++
			TA10	+
			TA11	-
			TA12	-
30	8,0	1	TA13	++
			TA14	-
			TA15	++
			TA16	++
			TA17	-
30	8,0	2	TA18	+++
			TA19	+
			TA20	++
			TA21	+++
			TA22	-
			TA23	-
			TA24	-
			TA25	-
40	7,0	2	TA26	-
			TA27	+++
			TA28	+
			TA29	++

Temperatura	pH	Frasco	Identificação	Capacidade de degradação do substrato*
40	7,0	2	TA30	++
			TA31	-
			TA32	++
40	8,0	1	TA33	+++
			TA34	+++
			TA35	-
			TA36	++
			TA37	+
40	8,0	2	TA38	+++
			TA39	+++
			TA40	-
			TA41	-
			TA42	-
30	7,0	1	EG1	-
			EG2	-
			EG3	++
			EG4	-
			EG5	-
			EG6	+++
			EG7	+++
30	7,0	2	EG8	-
			EG9	-
			EG10	-
			EG11	+++
30	8,0	1	EG12	-
			EG13	-
			EG14	+++
			EG15	+++
30	8,0	2	EG16	+++
			EG17	-

Temperatura	pH	Frasco	Identificação	Capacidade de degradação do substrato*
30	8,0	2	EG18	+++
			EG19	-
			EG20	+++
40	7,0	1	EG21	++
			EG22	-
			EG23	-
			EG24	++
40	8,0	1	EG25	-
			EG26	-
			EG27	-
			EG28	-
			EG29	++
			EG30	++
			EG31	++
			EG32	++
40	8,0	2	EG33	++
			EG34	-
			EG35	-
			EG36	-
			EG37	-

Isolados obtidos das culturas de enriquecimento. Isolados obtidos do enriquecimento com ácido tereftálico foram identificados como TA-número. Isolados obtidos do enriquecimento com etilenoglicol foram identificados como EG-número. * (-) consumo do substrato abaixo de 10 %; (+) consumo do substrato entre 10 e 50 %; (++) consumo do substrato entre 50 e 90 %; e (+++) consumo do substrato acima de 90 %.

3.3.2. *Curvas de crescimento e degradação de TA e EG em meios de cultura com maiores concentrações dos substratos orgânicos*

Os isolados foram cultivados em meio mineral contendo 40 g L⁻¹ do respectivo substrato. A densidade óptica dos isolados em meio contendo TA estabilizou-se após 11 dias. No entanto, após normalização dos valores utilizando o logaritmo neperiano, identificou-se que a fase estacionária começou próxima de 8 dias (Figura 3). O TA foi completamente consumido antes de 11 dias pelos isolados TA18, TA27 e TA33, que atingiram densidades ópticas (DO₆₀₀) próximas a 24, mostrando potencial para fermentação em alta densidade celular. Os isolados TA38 e TA39 apresentaram uma fase lag mais longa que o restante. No entanto, TA39 apresentou um crescimento acentuado entre o segundo e o terceiro dia, sugerindo uma velocidade específica de crescimento superior à dos demais isolados. Uma alta velocidade específica de crescimento pode indicar potencial para obtenção de biomassa e outros metabólitos em batelada alimentada ou cultivo contínuo.

A densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) dos isolados cultivados em meio contendo etilenoglicol (EG) estabilizou-se no terceiro dia (Figura 4). A quantificação do substrato no meio de cultura revelou que, apesar da estabilização do crescimento, o etilenoglicol continuou a ser consumido, embora em uma taxa reduzida. Como o EG é convertido em ácido glicólico (GA) antes de ser completamente metabolizado, levantou-se a hipótese de que a oxidação incompleta do EG em GA estaria resultando no acúmulo de GA. A identificação e quantificação de ácido glicólico foram realizadas por HPLC para todos os isolados. Os resultados indicaram que os isolados EG6 e EG7 acumularam ácido glicólico em seus cultivos (Figura 5). Os demais isolados testados não apresentaram acúmulo de GA nos períodos analisados. Além disso, não foram observadas diferenças significativas no consumo de EG entre os isolados testados.

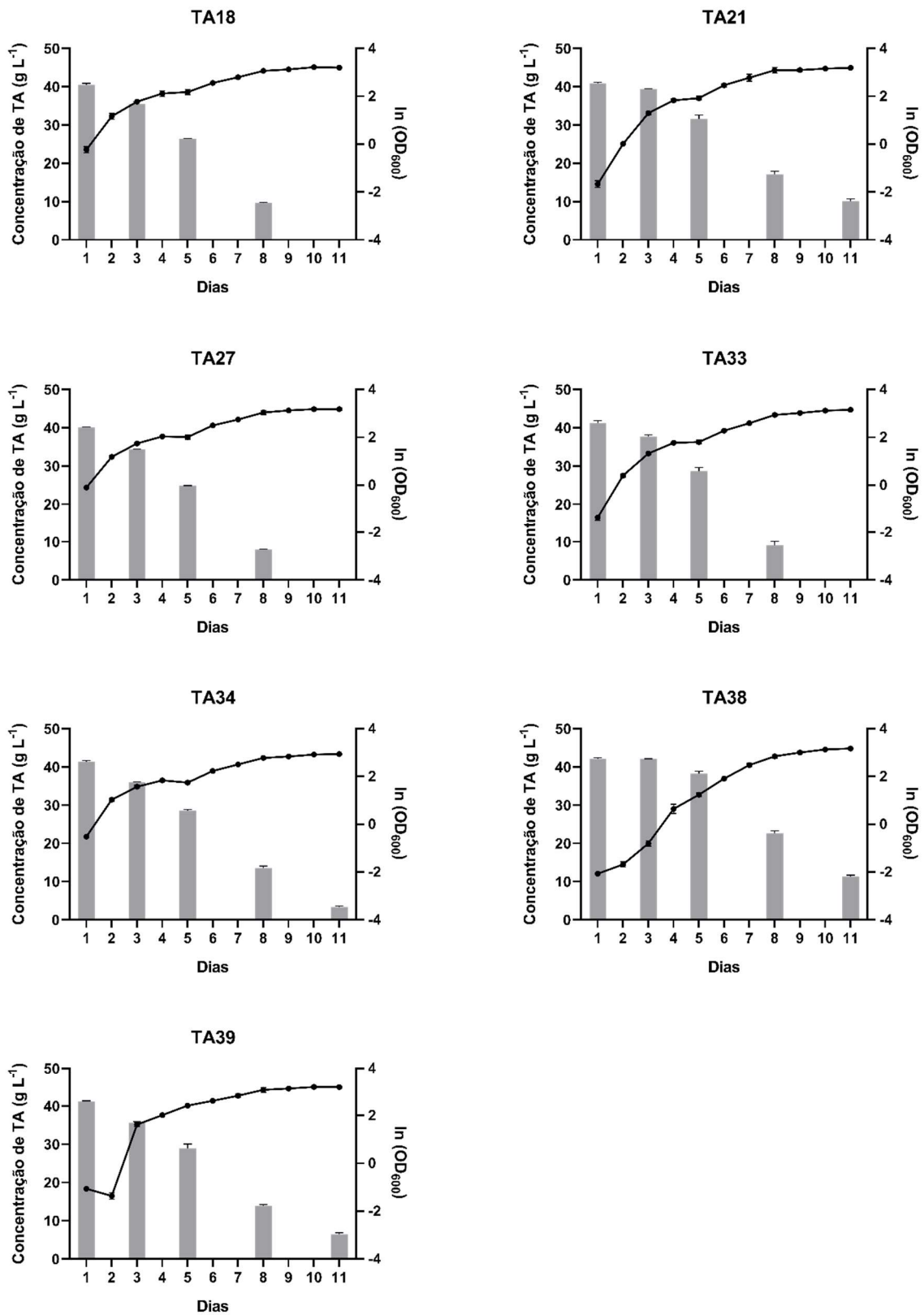


Figura 3: Crescimento dos isolados em MM contendo 40 g L⁻¹ de ácido tereftálico (TA) como fonte de carbono e energia. Os pontos representam a média dos valores de DO₆₀₀ após normalização por logaritmo neperiano. As barras representam a concentração de TA no sobrenadante da cultura e as quantificações foram realizadas para os dias 1, 3, 5, 8 e 11. Todas as análises foram realizadas com três repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias correspondentes.

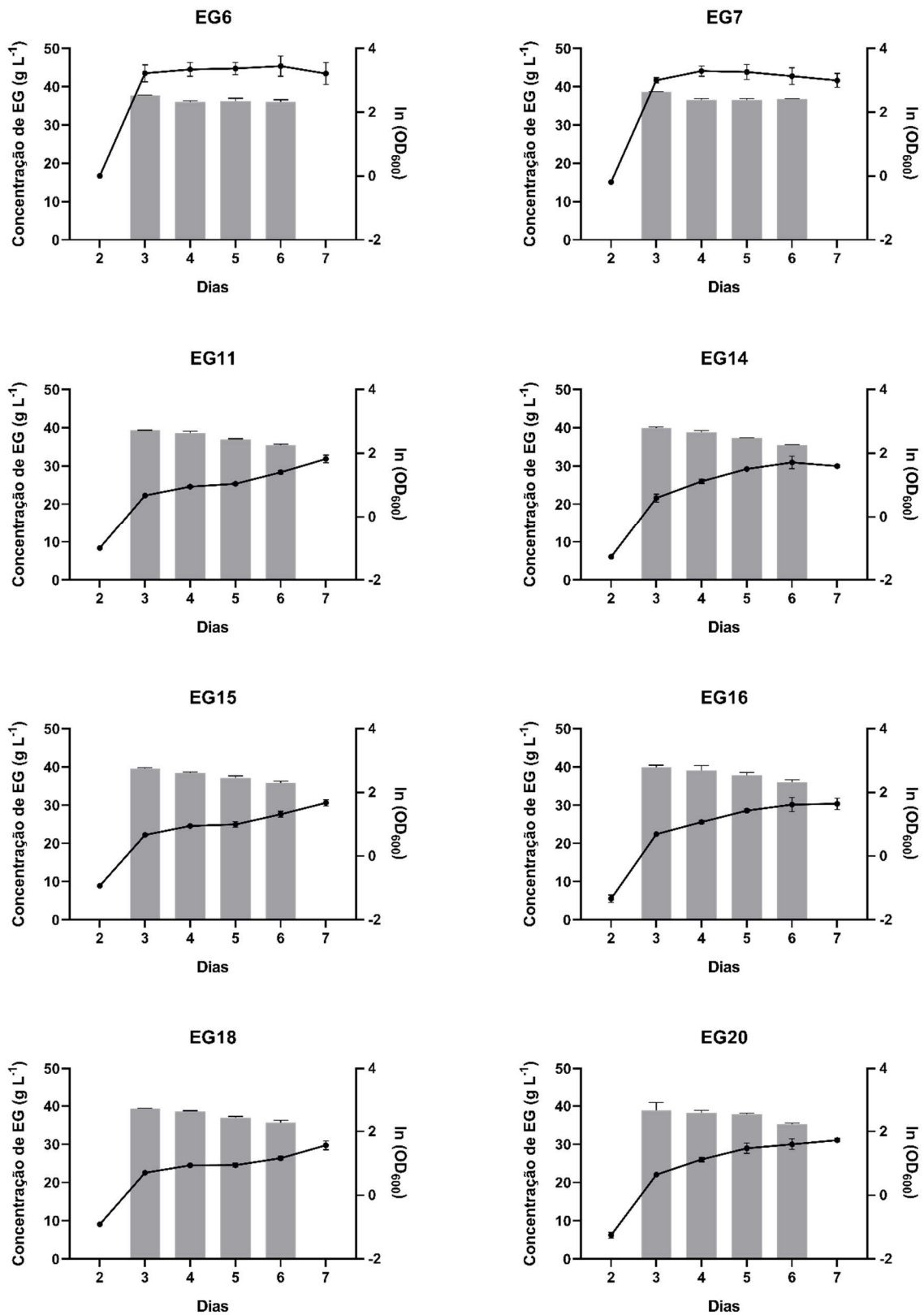


Figura 4: Crescimento dos isolados em MM contendo 40 g L⁻¹ de etilenoglicol (EG) como fonte de carbono e energia. Os pontos representam a média dos valores de DO₆₀₀ após normalização por logaritmo neperiano. As barras representam a concentração de EG no sobrenadante da cultura. Todas as análises foram realizadas com três repetições experimentais. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias correspondentes.

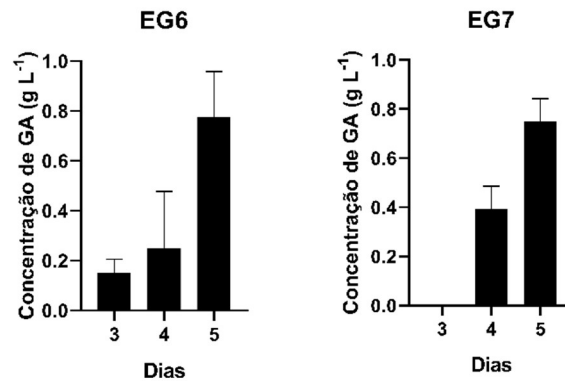


Figura 5: Concentração de ácido glicólico (GA) no sobrenadante das culturas em meio MM contendo 40 g L⁻¹ de EG. As barras de erro indicam o desvio padrão das médias correspondentes.

3.3.3. Identificação dos perfis de ácidos graxos e dendrograma

A Figura 6 mostra o dendrograma com as distâncias euclidianas dos perfis de ácidos graxos dos isolados gerado pelo sistema MIDI. Perfis com distâncias abaixo de 2,5 são considerados do mesmo isolado de acordo com o próprio sistema (MIDI Sherlock). Portanto, todos os isolados selecionados são considerados linhagens distintas.

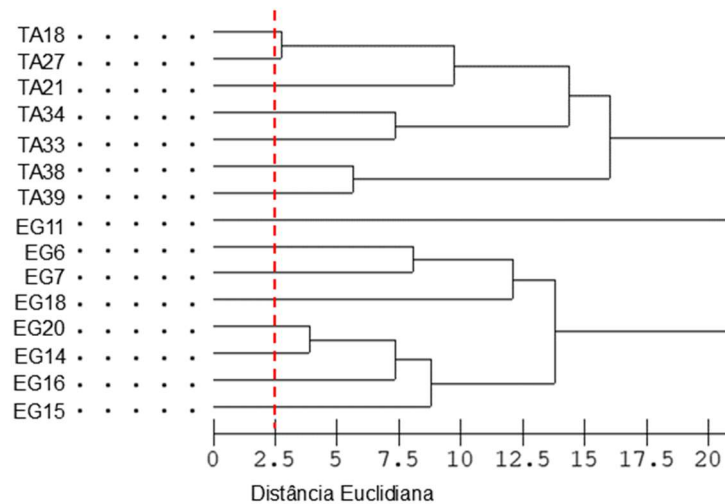


Figura 6: Dendrograma da Distância Euclidiana dos perfis de ácidos graxos dos isolados gerado pelo Microbial Identification System (MIDI).

3.3.4. Identificação dos isolados bacterianos por sequenciamento parcial do gene 16S

Os resultados do BLASTn do sequenciamento parcial do gene 16S indicaram que os isolados TA18, TA21, TA27, TA33, TA34, TA38 e TA39 se aproximam de *Rhodococcus pyridinivorans*; EG6 e EG7 de *Paracoccus pantotrophus*; EG11, EG15 e EG18 de *Stutzerimonas nitritolerans*; e EG14, EG16 e EG20 de *Stutzerimonas stutzeri*. Mesmo que o BLASTn do 16S rRNA não seja sempre suficiente para identificar a espécie do isolado, as árvores filogenéticas (Figura 7) sugerem que essas identificações são próximas da realidade.

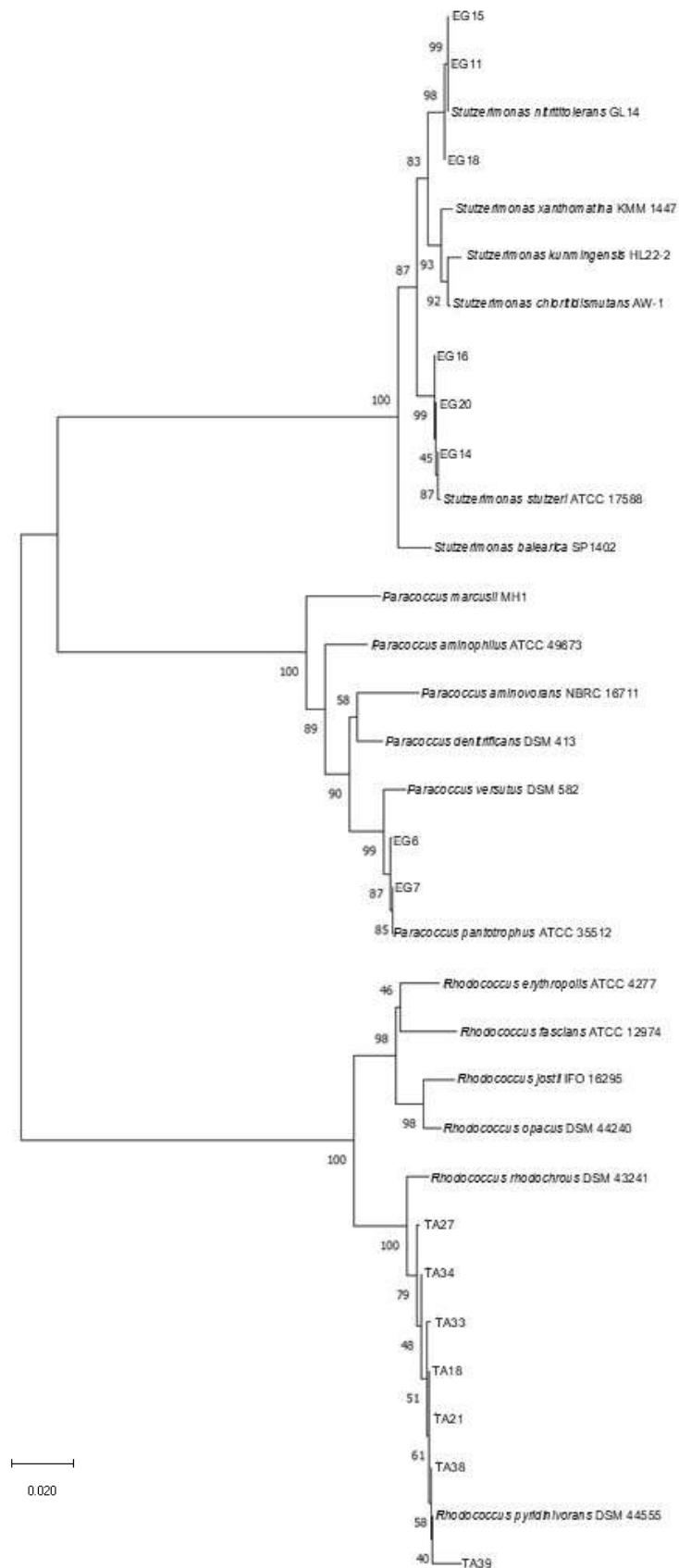


Figura 7: Árvore filogenética baseada no sequenciamento do gene de 16S rRNA comparando com outras espécies dos respectivos gêneros identificados por BLASTn. Número nos nós indica os graus de suporte da análise de bootstrap (em porcentagem) pelo método de neighbor-joining. Barra indica 0,02 substituições por sítio.

3.3.5. Produção de biossurfactantes pelos isolados selecionados

Não foi identificado nenhum resultado positivo no espalhamento de óleo para nenhum dos isolados nos meios TSB, MSM EG ou MSM TA (Tabela 5). No entanto, a produção de biossurfactantes nem sempre é constitutiva. Em algumas espécies (ou linhagens) bacterianas, ela é ativada pela presença de substratos hidrofóbicos no meio (Whyte et al., 1999). Portanto, os isolados foram cultivados em óleo de soja e hexadecano para avaliar esse possível efeito.

Tabela 5: Produção de biossurfactantes pelos isolados selecionados em meios de cultura diferentes.

Isolado	TSB	MSM EG	MSM TA	Óleo de soja	Hexadecano
<i>Paracoccus</i> EG6	-	-	sc	-	sc
<i>Paracoccus</i> EG7	-	-	sc	-	sc
<i>Stutzerimonas</i> EG11	-	-	sc	sc	sc
<i>Stutzerimonas</i> EG14	-	-	sc	+	sc
<i>Stutzerimonas</i> EG15	-	-	sc	sc	sc
<i>Stutzerimonas</i> EG16	-	-	sc	+	sc
<i>Stutzerimonas</i> EG18	-	-	sc	sc	sc
<i>Stutzerimonas</i> EG20	-	-	sc	+	sc
<i>Rhodococcus</i> TA18	-	sc	-	*	*
<i>Rhodococcus</i> TA21	-	sc	-	*	*
<i>Rhodococcus</i> TA27	-	sc	-	*	*
<i>Rhodococcus</i> TA33	-	sc	-	*	*
<i>Rhodococcus</i> TA34	-	sc	-	*	*
<i>Rhodococcus</i> TA38	-	sc	-	*	*
<i>Rhodococcus</i> TA39	-	sc	-	*	*

TSB: tryptic soy broth; MSM EG: meio de sais minerais contendo EG como única fonte de carbono e energia; MSM TA: meio de sais minerais contendo TA como única fonte de carbono e energia; óleo de soja: meio de sais minerais contendo óleo de soja como única fonte de carbono e energia; Hexadecano: meio de sais minerais contendo hexadecano como única fonte de carbono e energia. (-) sem produção; (+) produção de biossurfactantes excretados no meio; (*) produção de biossurfactantes aderidos à superfície celular; (sc) sem crescimento bacteriano no meio.

Os isolados EG14, EG16 e EG20 cresceram no meio contendo óleo, mas não em hexadecano, e produziram biossurfactantes liberados no meio. Como os isolados foram identificados como *Stutzerimonas stutzeri*, os surfactantes são possivelmente da classe dos ramnolipídeos, que são os biossurfactantes mais comumente produzidos por esta espécie (Araújo et al., 2024). Ainda que esses isolados não sejam capazes de produzir biossurfactantes a partir de EG, estratégias de engenharia genética podem ser empregadas para permitir essa produção. Beuker et al. (2016) substituíram o promotor nativo do operon *rhlAB* por um promotor sintético, possibilitando a produção constitutiva de ramnolipídeos por *Pseudomonas*

putida KT2440. De forma semelhante, a substituição de promotor pode ser utilizada para contornar o sistema nativo de regulação e permitir a expressão do sistema de produção de ramnolipídeos a partir de qualquer substrato metabolizado pelo isolado, além de potencialmente aumentar a produção do biossurfactante. No entanto, alguns subgrupos de *S. stutzeri* possuem sistemas que restringem modificações no DNA e outros mecanismos de correção de erro que impedem a incorporação de DNA exógeno no genoma (Berndt et al., 2003; Meier; Wackernagel, 2005). Portanto, as modificações genéticas representam uma possível estratégia para conectar a capacidade de consumo de EG à produção de ramnolipídeos, porém elas podem ser inviáveis para as linhagens isoladas neste trabalho.

Todos os isolados TA cresceram nos meios contendo óleo ou hexadecano, porém o resultado do teste de espalhamento de óleo foi negativo. No entanto, a mudança na interface óleo-meio sugeria a presença de alguma substância que modificava a tensão interfacial. Assim, foi suposto que algum biossurfactante estava aderido à célula, e essa hipótese foi testada realizando-se o teste de espalhamento de óleo sem a etapa de centrifugação, o que resultou na produção de halo, indicando um resultado positivo. A produção de biossurfactantes que permanecem aderidos à parede celular é comum em bactérias do gênero *Rhodococcus*, principalmente na presença de substratos hidrofóbicos, para aumentar a hidrofobicidade celular e permitir melhor adesão à fonte nutricional, aumentando sua disponibilidade (Capelletti et al., 2020). Esse grupo de bactérias produz principalmente glicolipídeos à base de trealose, os quais apresentam diversas aplicações potenciais em decorrência de sua baixa concentração micelar crítica e baixa toxicidade (Page et al., 1999; Kuyukina et al., 2001). No entanto, como se mantêm majoritariamente associados à superfície celular, a extração dessas moléculas é relativamente complexa, o que limita seus estudos e sua aplicação industrial. Além disso, *Rhodococcus* é um gênero pouco explorado em comparação com outros produtores de biossurfactantes, como *Bacillus* e *Pseudomonas*, e os mecanismos de produção e regulação desses lipídeos à base de trealose não estão consolidados, o que limita as intervenções fisiológicas e genéticas em suas vias de produção.

Algumas linhagens do gênero *Paracoccus* são capazes de produzir surfactantes principalmente do grupo dos glicolipídeos (Sahoo et al., 2019; Xu et al., 2020). Entretanto, os isolados EG6 e EG7 não produziram resultados positivos no teste de espalhamento de óleo em nenhum dos meios testados. Os isolados EG11, EG15 e EG18 também não mostraram resultado positivo, o que é coerente com o fato de não haver registros de produção de biossurfactantes por *Stutzerimonas nitrititolerans*.

3.3.6. Produção de exopolissacarídeos pelos isolados selecionados

Dos isolados de EG, somente EG6 e EG7 mostraram resultado positivo para o teste de produção de exopolissacarídeos (EPS), enquanto todos os isolados de TA apresentaram fluorescência sob luz UV (Figura 8), demonstrando que esses isolados são capazes de produzir EPS utilizando os respectivos substratos como única fonte de carbono e energia.

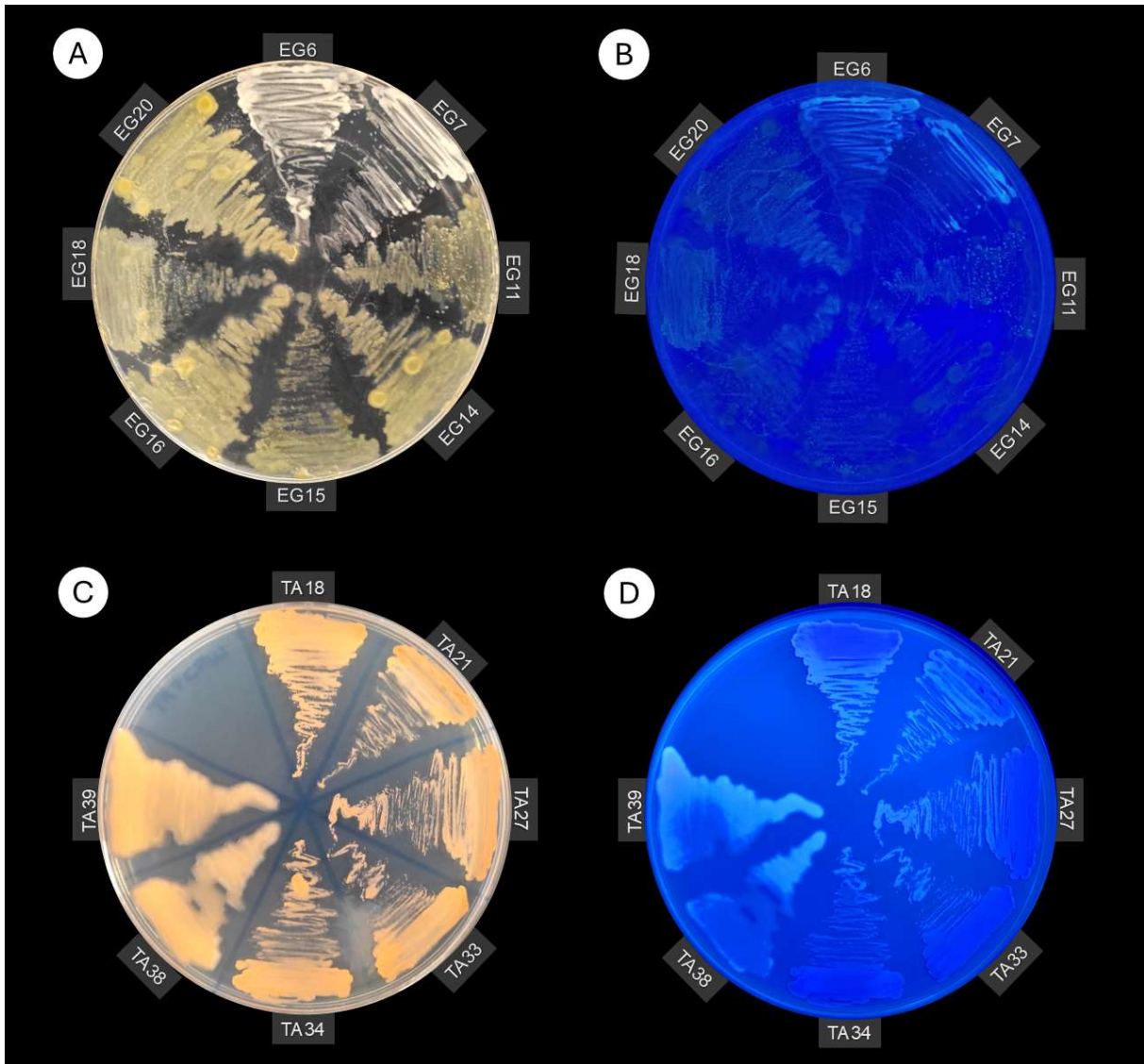


Figura 8: Teste de produção de exopolissacarídeos. Todos os meios foram suplementados com $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de calcofluor. A e B: MSM contendo 10 g L^{-1} de EG. C e D: MSM contendo 10 g L^{-1} de TA. A e C: placas em luz branca comum. C e D: placas sob luz ultravioleta (365 nm).

Nas condições testadas, apenas os isolados EG6 e EG7 foram capazes de produzir EPS a partir de etilenoglicol. O gênero *Paracoccus* é conhecido pela produção de biofilmes e por suas aplicações, principalmente no tratamento de água, dada a capacidade desnitrificante de algumas espécies (Kim et al., 2004). No entanto, as características e propriedades dos exopolissacarídeos que compõem esses biofilmes ainda são pouco exploradas, com os estudos focando no aumento do biofilme para aumentar sua capacidade de remoção de nitrato.

Algumas linhagens de *Stutzerimonas stutzeri* já foram relatados como produtoras de exopolissacarídeos (Maalej et al., 2014; Zhao et al., 2018). No entanto, os isolados EG14, EG16 e EG20 não apresentaram resultados positivos nas condições testadas. Os isolados identificados como *S. nitritolerans* (EG11, EG15 e EG18), também não apresentaram resultados positivos, coerente com o fato de não haver registros da produção de biofilme ou exopolissacarídeos por essa espécie.

Condições nutricionais são fatores significativos para a produção de biofilme por membros do gênero *Paracoccus*. Maiores concentrações de cátions bivalentes, succinato, nitrato e óxido nítrico induzem a formação de um biofilme mais espesso, enquanto o ferro mostrou efeito inibitório (Srinandan et al., 2010; Singh et al., 2015; Kumar; Spiro, 2017). Ao contrário de outras bactérias produtoras de biofilmes, o sistema de *quorum sensing* reprime a produção de exopolissacarídeos por *Paracoccus*, levando à formação de um biofilme pouco espesso. A deleção de genes produtores de sinais para *quorum sensing* promove o aumento da espessura do biofilme produzido por *Paracoccus denitrificans* (Morinaga et al., 2018). Portanto, a modificação da composição dos meios de cultura e a engenharia genética se mostram estratégias potenciais para se aumentar a produção de exopolissacarídeos por EG6 e EG7 a partir do consumo de EG.

Todos os isolados do grupo TA avaliados mostraram resultado positivo para a produção de exopolissacarídeos. Os EPS produzidos por *Rhodococcus* geralmente são heteropolissacarídeos de alto peso molecular com potenciais aplicações como biofloculantes, espessantes e emulsificantes (Czemierska et al., 2017; Li et al., 2022). Já os EPS produzidos pela linhagem ZZ47 de *R. pyridinivorans* exibem atividade antibiofilme, antiangiogênica e antioxidante, sem mostrar efeitos negativos em camundongos sob exposição aguda por via oral, mostrando potencial para tratamento de câncer (Güvensen et al., 2022; Taşkaya et al., 2023). No entanto, a produção de EPS por *Rhodococcus*, tanto em termos quantitativos quanto em termos de sua composição, é influenciada pelas condições de cultivo e pela fonte de carbono empregada (Rapp et al., 1979). Portanto, a caracterização dos EPS produzidos a partir de TA é necessária para se avaliar suas potenciais aplicações biotecnológicas.

3.3.7. Produção de polihidroxialcanoatos pelos isolados selecionados

Dos isolados selecionados, EG6, EG7, TA18, TA21, TA27, TA33, TA34, TA38 e TA39 apresentaram fluorescência sob luz UV após tratamento com o corante Azul de Nilo (Figura 9), indicando que esses isolados são capazes de acumular polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando os respectivos substratos como única fonte de carbono e energia.

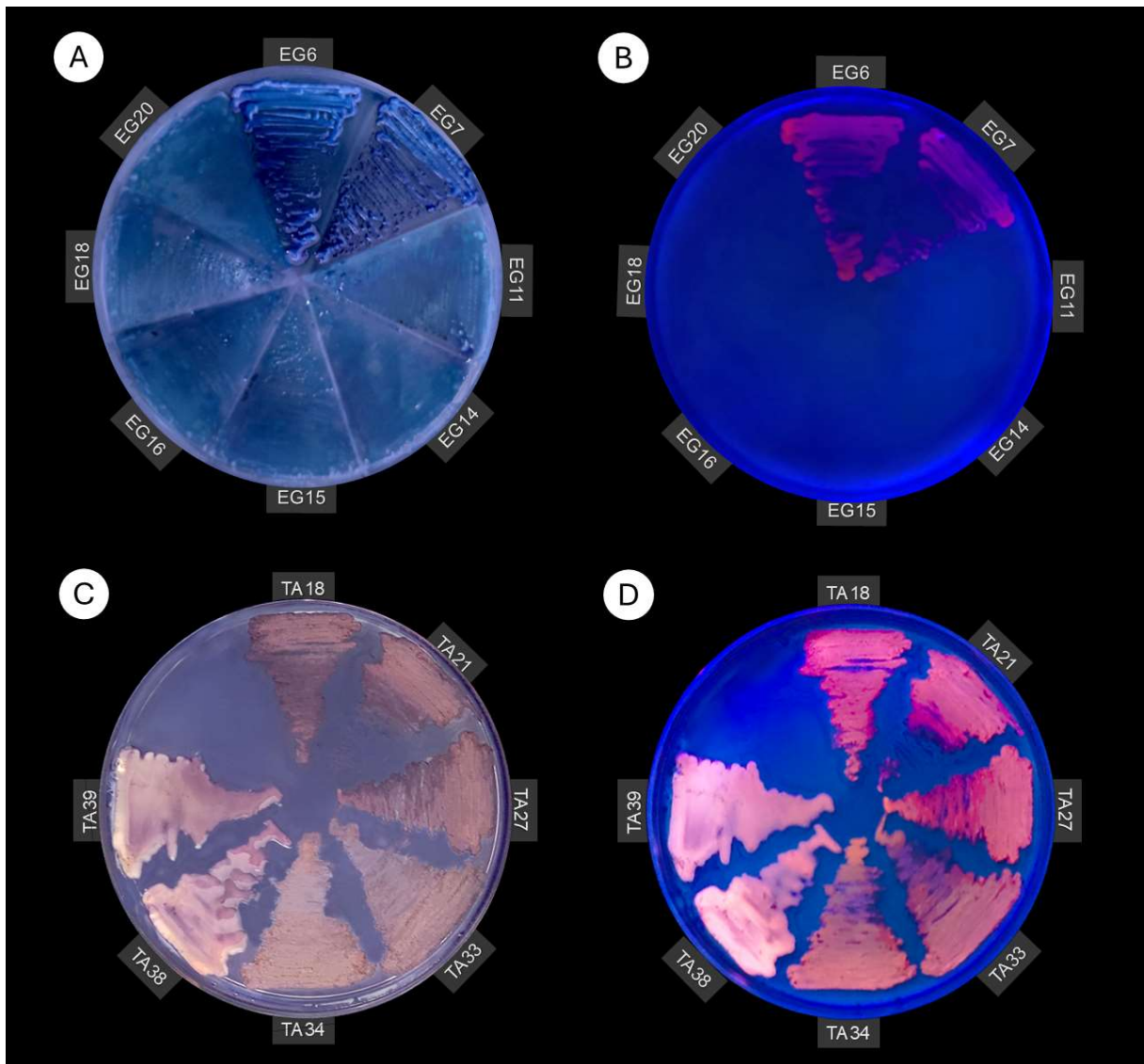


Figura 9: Teste de produção de polihidroxicanoatos. A solução de Azul de Nilo sulfato ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) foi adicionada sobre as colônias e as imagens foram obtidas após 20 minutos de tratamento. A e B: MSM contendo 10 g L^{-1} de EG. C e D: MSM contendo 10 g L^{-1} de TA. A e C: placas em luz branca comum. C e D: placas sob luz ultravioleta (365 nm).

A avaliação da quantidade de PHA produzida pelos isolados foi realizada pelo método proposto por Oishiki et al. (2011) e os resultados são apresentados na Tabela 6. Como TA18 apresentou maior média e foi o único que se diferenciou dos demais tratamentos, esse isolado foi escolhido para se verificar a composição de seus PHA produzidos a partir de TA por GC/MS.

A partir da comparação das relações massa-carga das substâncias analisadas em GC/MS. As substâncias mais abundantes na amostra derivatizada foram identificadas como os metil-ésteres de 3-hidroxipentanoato, hexadecanoato e 10-octadecenoato. Esses picos foram comparados ao banco de dados NIST14 e resultando em índices de correspondência de 88 %, 97 % e 96 %, respectivamente (Figura 10). Os demais picos foram identificados e reunidos no

material suplementar (Figura 14). A forma mais provável dos PHA produzidos por TA18 a partir de ácido tereftálico em meio mínimo são poli(3-hidroxipentanoatos), frequentemente referidos como poli (3-hidroxivaleratos) (PHV), uma vez que os ácidos hexadecanoico e octadecenoico não possuem formas poliméricas reportadas.

Tabela 6: Produção de PHA pelos isolados em MSM.

	EG6	EG7	TA18	TA21	TA27	TA33	TA34	TA38	TA39
Fluorescência	6,163c (±1,099)	5,701c (±1,000)	23,840a (±3,955)	21,870ab (±1,774)	19,430ab (±1,522)	18,850ab (±4,952)	17,192b (±2,046)	4,302c (±2,434)	2,520c (±0,889)

Produção de PHA medida a partir da fluorescência, representada pela média de quatro repetições biológicas, com seus respectivos desvios padrão. Médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

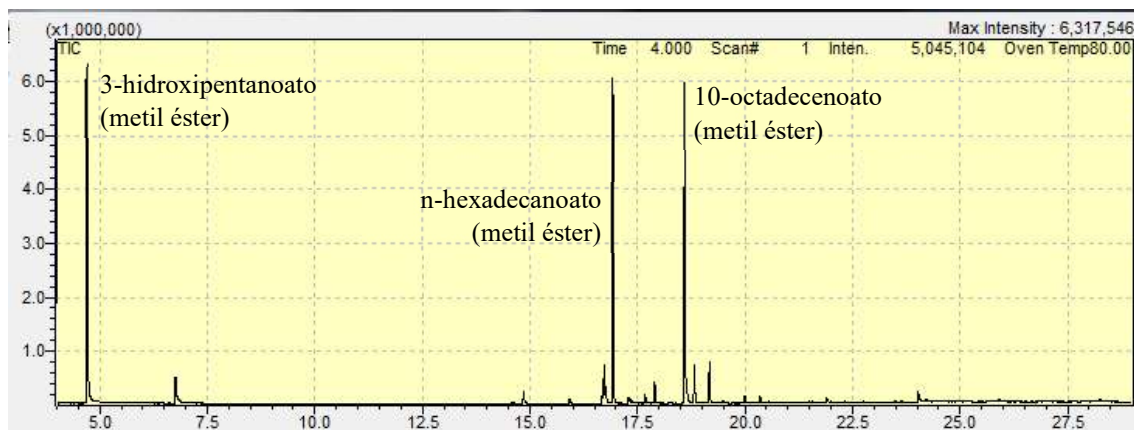


Figura 10: Cromatograma da GC/MS da biomassa metanolizada da bactéria TA18 cultivada em MSMTA.

O homopolímero PHV apresenta potencial como biopolímero para substituição de plásticos convencionais, embora ele receba menos atenção em comparação ao copolímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). O PHBV é mais utilizado pela indústria devido à sua maior versatilidade, já que suas propriedades físicas podem ser ajustadas conforme a necessidade, variando a proporção de seus monômeros. A produção de PHV puro só foi relatada em *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 a partir de ácidos orgânicos de 5 carbonos

(Haywood et al., 1991). Entre as linhagens de *R. pyridinivorans*, relatadas como produtoras de PHA, BSRT1-1 é capaz de produzir poli (3-hidroxi-butirato) e poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (Trakunjae et al., 2021; Trakunjae et al., 2022). Por outro lado, o monômero 3-hidroxi-valerato possui potencial para indústria de cosméticos e para produção de biocombustíveis (Zhang et al., 2009).

Mesmo não sendo o objetivo dessa análise, a GC/MS identificou a presença de ácido hexadecanoico e de ácido octadecenoico na amostra, sugerindo o acúmulo de lipídeos pelo isolado. O gênero *Rhodococcus* é conhecido pela sua capacidade de acumular triacilgliceróis (TAG) como fonte de reserva de carbono e energia, com algumas linhagens atingindo mais de 80 % da massa seca composta por lipídeos (Wältermann et al., 2000; Capelletti et al., 2020). A linhagem de *R. pyridinivorans* CCZU-B16 é capaz de acumular TAG durante a degradação de lignina alcalina, com um rendimento de conversão de 0,52 g g⁻¹ (Chong et al., 2018). Os ácidos graxos acumulados por esse isolado foram principalmente de 16 e 18 carbonos, incluindo os ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico e oleico, semelhante à composição dos lipídeos produzidos por TA18 a partir de TA. Embora os métodos de extração de PHA e TAG sejam diferentes, ambos seguem o mesmo princípio: a conversão de lipídeos em ésteres metílicos de ácidos graxos. Portanto, as identificações obtidas por meio da análise de GC/MS são válidas e indicam que o isolado testado apresenta um potencial não previsto.

O ácido hexadecanoico, popularmente conhecido como ácido palmítico (AP), é um ácido graxo saturado de 16 carbonos importante para o metabolismo de lipídeos de cadeia média, sendo precursor de outros ácidos graxos, como o palmitoleico, mirístico e esteárico. O próprio AP é uma substância com alto valor agregado, constituindo uma fração significativa do óleo de palma, amplamente utilizado na indústria alimentícia (Che Man et al., 1999). No entanto, a produção de óleo de palma está associada a diversas questões ambientais, como desmatamento, perda de biodiversidade e poluição do solo e da água decorrentes da adoção de práticas agrícolas intensivas (Hanafiah et al., 2021). A biossíntese de AP por microrganismos é, portanto, uma alternativa promissora para substituir o óleo de palma, mitigando os impactos ambientais gerados pelo cultivo intensivo de palmeiras. Além disso, compostos derivados do AP são empregados como agentes hidratantes, emulsificantes, estabilizantes e antioxidantes na indústria cosmética (Cort, 1974; Vilanova; Solans, 2015; Lestari et al., 2022). Ácidos graxos também são de interesse para a produção de biodiesel, especialmente aqueles com cadeias de 16 a 18 carbonos, que produzem combustíveis com maiores índices de cetano (Suastes-Rivas et al., 2020).

O ácido 10-octadecenoico é um ácido graxo monoinsaturado de 18 carbonos com uma

dupla ligação no carbono 10, isômero do ácido 9-octadecenoico (ácido oleico). Ambas as formas são interconversíveis por ação enzimática (Mortimer; Niehaus Jr., 1972). O ácido oleico, popularmente conhecido como ômega 9, é o principal componente do azeite de oliva e de outros óleos comestíveis (Orsavova et al., 2015; Jimenez-Lopez et al., 2020), e sua produção por microrganismos representa uma alternativa sustentável à produção desses óleos por vias não agrícolas, podendo reduzir a demanda por terras agricultáveis, água e insumos agrícolas. Além disso, o ácido oleico pode ser utilizado como suplemento por ajudar a reduzir o colesterol LDL, aumentar o HDL e reduzir a pressão arterial (Sales-Campos et al., 2013). Assim como o AP, os isômeros de ácido octadecenoico também podem ser utilizados para produção de biodiesel de alta qualidade.

Em suma, a análise da amostra por GC/MS indicou que o isolado TA18 é capaz de produzir lipídeos utilizando o TA como única fonte de carbono e apresenta diversas aplicações para produção de biopolímeros e matérias-primas para indústria de alimentos, cosméticos e de biocombustíveis. Embora não tenha sido realizada uma comparação quantitativa detalhada, estratégias para aumentar a produção de lipídeos podem ser sugeridas, como a otimização das condições de cultivo, superexpressão dos genes envolvidos e utilização de métodos de cultivo com alto rendimento de biomassa. Além disso, como essas substâncias utilizam não apenas o mesmo substrato, mas também vias metabólicas semelhantes, a redução da competição pela interrupção de vias específicas pode aumentar o acúmulo de uma dada substância de interesse, além de facilitar sua extração e purificação.

3.4. CONCLUSÃO

A cultura de enriquecimento demonstrou ser uma estratégia eficaz para o isolamento de microrganismos capazes de degradar ácido tereftálico (TA) e o etilenoglicol (EG), que são os monômeros constituintes do polietileno tereftalato (PET). Apesar de não terem sido isoladas bactérias que degradam ambos os compostos simultaneamente, os isolados obtidos são capazes de produzir substâncias com potenciais aplicações biotecnológicas.

Os isolados de *Stutzerimonas* EG14, EG16 e EG20 produzem biossurfactantes, mas não a partir de EG como única fonte de carbono. Já os isolados de *Paracoccus* demonstraram capacidade de converter EG em ácido glicólico durante a fase estacionária de cultivo em batelada, além de produzir exopolissacarídeos (EPS) e polihidroxialcanoatos (PHA), demonstrando versatilidade para produção de bioprodutos de valor econômico. De forma similar, os isolados de *Rhodococcus* produzem EPS e PHA a partir de TA, substâncias com amplos potenciais biotecnológicos, além de produzirem biossurfactantes associados à célula,

embora não a partir de TA como única fonte de carbono. Por fim, a linhagem TA18 mostrou capacidade de produção de biopolímeros e lipídios a partir de TA, inclusive com potencial para fermentação em alta densidade celular. Essas características tornam a linhagem uma candidata promissora para aplicações industriais, incluindo a produção em larga escala de lipídeos de alto valor.

As substâncias produzidas foram obtidas por meio do cultivo dos microrganismos em meio mínimo, o que diminui o custo do processo de bioconversão, visando melhorar sua viabilidade econômica. Além disso, os isolados, especialmente de TA, demonstraram capacidade de consumir concentrações elevadas de TA. Esses resultados evidenciam o potencial biotecnológico dos microrganismos isolados e abrem caminho para futuras investigações. A caracterização dos demais bioprodutos produzidos permitirá avaliar suas aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica. Além disso, abre oportunidade para se empregarem estratégias de otimização para aumentar a eficiência dos processos de bioconversão, tornando a reutilização de PET mais viável. Assim, os dados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis e economicamente viáveis para a destinação de resíduos plásticos.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. S.; SANTANA, L. A. R.; OTENIO, M. H.; NASCIMENTO, C. W.; CERQUEIRA, A. F. L. W.; RODARTE, M. P.. Biosurfactant Production by *Pseudomonas*: a systematic review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, [S.L.], 2024.

BERNDT, C.; MEIER, P.; WACKERNAGEL, W. DNA restriction is a barrier to natural transformation in *Pseudomonas stutzeri* JM300. *Microbiology*, v. 149, n. 4, p. 895–901, 2003.

BEUKER, J.; STEIER, A.; WITTEGNS, A.; ROSENAU, F.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. Integrated foam fractionation for heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. *AMB Express*, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.

CAPPELLETTI, M.; PRESENTATO, A.; PIACENZA, E.; FIRRINCIELI, A.; TURNER, R. J.; ZANNONI, D. Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S.L.], v. 104, n. 20, p. 8567-8594, 2020.

CHONG, G. G.; HUANG, X. J.; DI, J. H.; XU, D. Z.; HE, Y. C.; PEI, Y. N.; TANG, Y. J.; MA, C. L. Biodegradation of alkali lignin by a newly isolated *Rhodococcus pyridinivorans* CCZU-B16. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 41, n. 4, p. 501–510, 2018.

CHOPKOVA, V.; PETKOVA, M.; SHILEV, S. Uncovering Bacterial Diversity during Mesophilic and Thermophilic Phases of Biowaste Composting through Next-Generation Sequencing. *Applied Sciences*, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 3111, 28 fev. 2023. MDPI AG.

CORT, W. M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 51, n. 7, p. 321–325, 1974.

CZEMIERSKA, M.; SZCZES, A.; HOŁYSZ, L.; WIATER, A.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A. Characterisation of exopolymer R-202 isolated from *Rhodococcus rhodochrous* and its flocculating properties. *European Polymer Journal*, v. 88, p. 21–33, 2017.

GÜVENSEN, N. C.; ALPER, M.; TAŞKAYA, A. Evaluation of Biological Activities of Exopolysaccharide from *Rhodococcus pyridinivorans* In vitro. *The European Journal of Research and Development*, v. 2, n. 2, p. 491–504, 2022.

HANAFIAH, K. M.; MUTALIB, A. H. A.; MIARD, P.; GOH, C. S.; MOHD SAH, S. A.; RUPPERT, N. Impact of Malaysian palm oil on sustainable development goals: co-benefits and trade-offs across mitigation strategies. *Sustainability Science*, v. 17, n. 4, p. 1639–1661, 2022.

JIMENEZ-LOPEZ, C.; CARPENA, M.; LOURENÇO-LOPES, C.; GALLARDO-GOMEZ, M.; LORENZO, J. M.; BARBA, F. J.; PRIETO, M. A.; SIMAL-GANDARA, J. Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, p. 135–142, 2020.

KIM, I. S.; JANG, A.; IVANOV, V.; STABNIKOVA, O.; ULANOV, M.. Denitrification of Drinking Water Using Biofilms Formed by *Paracoccus denitrificans* and Microbial Adhesion. *Environmental Engineering Science*, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 283-290, maio 2004. Mary Ann Liebert Inc.

KITAMURA, Shiro; DOI, Yoshihara. Staining method of poly (3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnology Techniques*, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 345-350, 1994.

KUMAR, S.; SPIRO, S. Environmental and Genetic Determinants of Biofilm Formation in *Paracoccus denitrificans*. *Mosphere*, [S.L.], v. 2, n. 5, p. 1-11, 25 out. 2017.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *Journal Of Microbiological Methods*, [S.L.], v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.

LEIGH, J; SIGNER, E. R.; WALKER, G. C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proceedings Of the National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 82, n. 18, p. 6231-6235, 1985.

LESTARI, U.; SYAMSURIZAL; YAHYA, F.; FUDHOLI, A. Effectiveness of lotion preparations as emollients from pure palm oil and crude palm oil. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, v. 19, n. 1, p. 40, 2022.

LI, F.; HU, X.; LI, J.; SUN, X.; LUO, C.; ZHANG, X.; LI, H.; LU, J.; LI, Y.; BAO, M. Purification, Structural Characterization, Antioxidant and Emulsifying Capabilities of Exopolysaccharide Produced by *Rhodococcus qingshengii* QDR4-2. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 31, n. 1, p. 64–80, 2023.

MAALEJ, H.; RAGUENES, G.; MOPPERT, X.; RICHERT, L.; RATISKOL, J.; PAYRI, C.; COSTA, B.; GUEZENNEC, J. Purification and structural data of a highly substituted

exopolysaccharide from *Pseudomonas stutzeri* AS22. *Carbohydrate Polymers*, v. 112, p. 404–411, 2014.

MAN, Y. B. Che; HARYATI, T.; GHAZALI, H. M.; ASBI, B. A. Composition and thermal profile of crude palm oil and its products. *Journal Of the American Oil Chemists' Society*, [S.L.], v. 76, n. 2, p. 237-242, fev. 1999.

MEIER, P.; WACKERNAGEL, W. Impact of mutS inactivation on foreign DNA acquisition by natural transformation in *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 1, p. 143–154, 2005.

MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular and Cell Biology Of Lipids*, [S.L.], v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

MORINAGA, K.; YAMAMOTO, T.; NOMURA, N.; TOYOFUKU, M. *Paracoccus denitrificans* can utilize various long-chain N-acyl homoserine lactones and sequester them in membrane vesicles. *Environmental Microbiology Reports*, v. 10, n. 6, p. 651–654, 2018.

MORTIMER, C. E.; NIEHAUS, W. G. Enzymatic isomerization of oleic acid to trans- Δ 10-octadecenoic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 49, n. 6, p. 1650–1656, 1972.

OEHMEN, A.; KELLER-LEHMANN, B.; ZENG, R. J.; YUAN, Z.; KELLER, J. Optimisation of poly- β -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *Journal Of Chromatography A*, [S.L.], v. 1070, n. 1-2, p. 131-136, 2005.

OSHIKI, M.; SATOH, H.; MINO, T.. Rapid quantification of polyhydroxyalkanoates (PHA) concentration in activated sludge with the fluorescent dye Nile blue A. *Water Science And Technology*, [S.L.], v. 64, n. 3, p. 747-753, 2011.

ORSAVOVA, J.; MISURCOVA, L.; AMBROZOVA, J. V.; VICHA, R.; MLCEK, J. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 6, p. 12871–12890, 2015.

PAGE, C. A.; BONNER, J. S.; KANGA, S. A.; MILLS, M. A.; AUTENRIETH, R. L. Biosurfactant Solubilization of PAHS. *Environmental Engineering Science*, [S.L.], v. 16, n. 6, p. 465-474, 1999.

RAGUÉNÈS, G.; MOPPERT, X.; RICHERT, L.; RATISKOL, J.; PAYRI, C.; COSTA, B.; GUEZENNEC, J. A novel exopolymer-producing bacterium, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *payriae*, isolated from a “kopara” mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Current Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 145–151, 2004.

RAPP, P.; BECK, C. H.; WAGNER, F. Formation of exopolysaccharides by *Rhodococcus erythropolis* and partial characterization of a heteropolysaccharide of high molecular weight. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 67–78, 1979.

SAHOO, B.; NINGTHOUJAM, R.; CHAUDHURI, S. Isolation and characterization of a lindane degrading bacteria *Paracoccus* sp. NITDBR1 and evaluation of its plant growth promoting traits. *International Microbiology*, v. 22, n. 1, p. 155–167, 2019.

SALES-CAMPOS, H.; SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; SANTANA DA SILVA, J.; CARDOSO, C. R. An Overview of the Modulatory Effects of Oleic Acid in Health and Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 2, p. 201–210, 2013.

SINGH, S.; NERURKAR, A. S.; SRINANDAN, C. S. Nitrate levels modulate the abundance of *Paracoccus* sp. in a biofilm community. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 6, p. 951–958, 2015.

SRINANDAN, C. S.; JADAV, V.; CECILIA, D.; NERURKAR, A. S. Nutrients determine the spatial architecture of *Paracoccus* sp. biofilm. *Biofouling*, v. 26, n. 4, p. 449–459, 2010.

SUASTES-RIVAS, J. K.; HERNÁNDEZ-ALTAMIRANO, R.; MENA-CERVANTES, V. Y.; BARRIOS GÓMEZ, E. J.; CHAIREZ, I. Biodiesel production, through intensification and profitable distribution of fatty acid methyl esters by a microalgae-yeast co-culture, isolated from wastewater as a function of the nutrients' composition of the culture media. *Fuel*, v. 280, n. July, p. 118633, 2020.

TAŞKAYA, A.; GÜVENSEN, N. C.; GÜLER, C.; ŞANCI, E.; KARABAY YAVAŞOĞLU, N. Ü. Exopolysaccharide from *Rhodococcus pyridinivorans* ZZ47 Strain: Evaluation of Biological Activity and Toxicity. *Journal of Agricultural Production*, v. 4, n. 1, p. 63–71, 2023.

TRAKUNJAE, C.; BOONDAENG, A.; APIWATANAPIWAT, W.; KOSUGI, A.; ARAI, T.; SUDESH, K.; VAITHANOMSAT, P. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus* sp. strain BSRT1-1 using response surface methodology. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2021.

TRAKUNJAE, C.; SUDESH, K.; NEOH, S. Z.; BOONDAENG, A.; APIWATANAPIWAT, W.; JANCHAI, P.; VAITHANOMSAT, P. Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) Copolymers by a Newly Engineered Strain of *Cupriavidus necator* PHB-4/pBBR_CnPro-phaCRp for Skin Tissue Engineering Application. *Polymers*, v. 14, n. 19, 2022.

VILANOVA, N.; SOLANS, C. Vitamin A Palmitate- β -cyclodextrin inclusion complexes: Characterization, protection and emulsification properties. *Food Chemistry*, v. 175, p. 529–535, 2015.

WÄLTERMANN, M.; LUFTMANN, H.; BAUMEISTER, D.; KALSCHUEER, R.; STEINBÜCHEL, A. *Rhodococcus opacus* strain PD630 as a new source of high-value single-cell oil? Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids. *Microbiology*, v. 146, n. 5, p. 1143–1149, 2000.

XU, M.; FU, X.; GAO, Y.; DUAN, L.; XU, C.; SUN, W.; LI, Y.; MENG, X.; XIAO, X. Characterization of a biosurfactant-producing bacteria isolated from Marine environment: Surface activity, chemical characterization and biodegradation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v. 8, n. 5, p. 104277, 2020.

WHYTE, L. G.; SLAGMAN, S. J.; PIETRANTONIO, F.; BOURBONNIÈRE, L.; KOVAL, S. F.; LAWRENCE, J. R.; INNIS, W. E.; GREER, C. W. Physiological Adaptations Involved in Alkane Assimilation at a Low Temperature by *Rhodococcus* sp. Strain Q15. *Applied And Environmental Microbiology*, [S.L.], v. 65, n. 7, p. 2961-2968, 1999.

ZHANG, X.; LUO, R.; WANG, Z.; DENG, Y.; CHEN, G. Q. Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 4, p. 707–711, 2009.

ZHAO, F.; GUO, C.; CUI, Q.; HAO, Q.; XIU, J.; HAN, S.; ZHANG, Y. Exopolysaccharide production by an indigenous isolate *Pseudomonas stutzeri* XP1 and its application potential in enhanced oil recovery. *Carbohydrate Polymers*, v. 199, n. April, p. 375–381, 2018.

3.6. MATERIAL SUPLEMENTAR

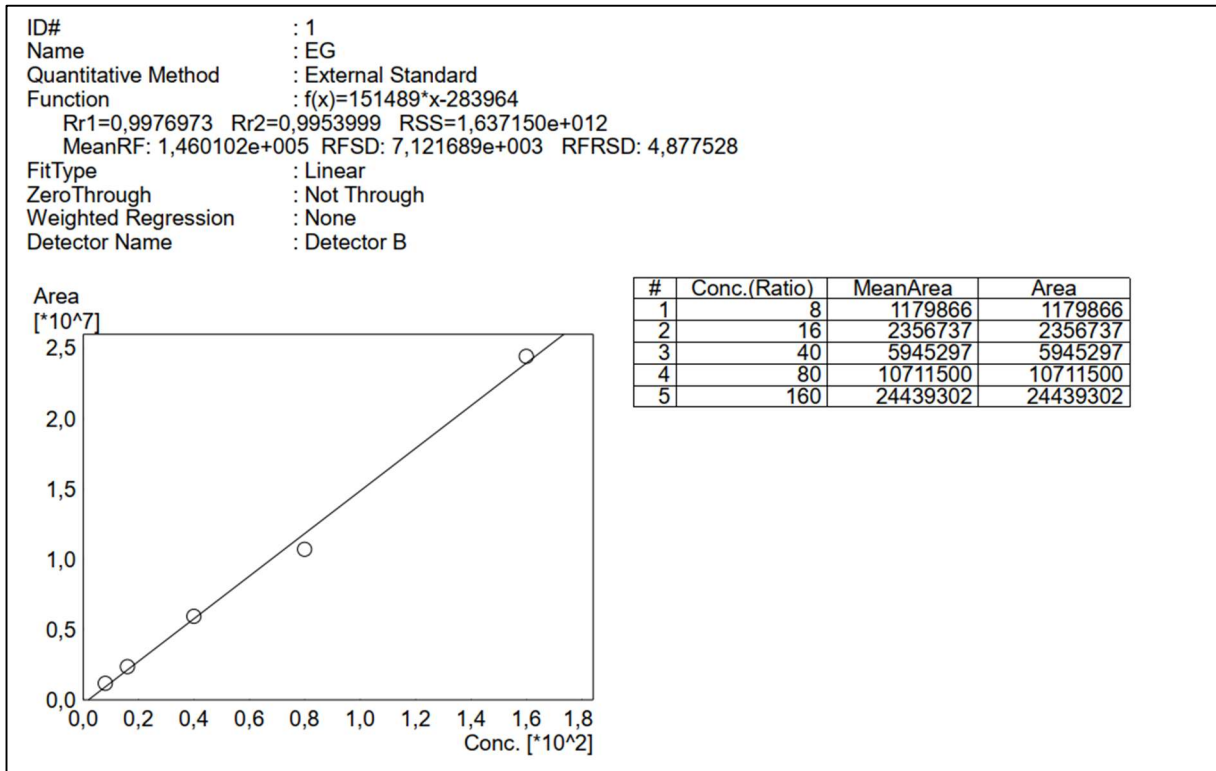


Figura 11: Curva padrão de etilenoglicol. Concentrações em $g L^{-1}$.

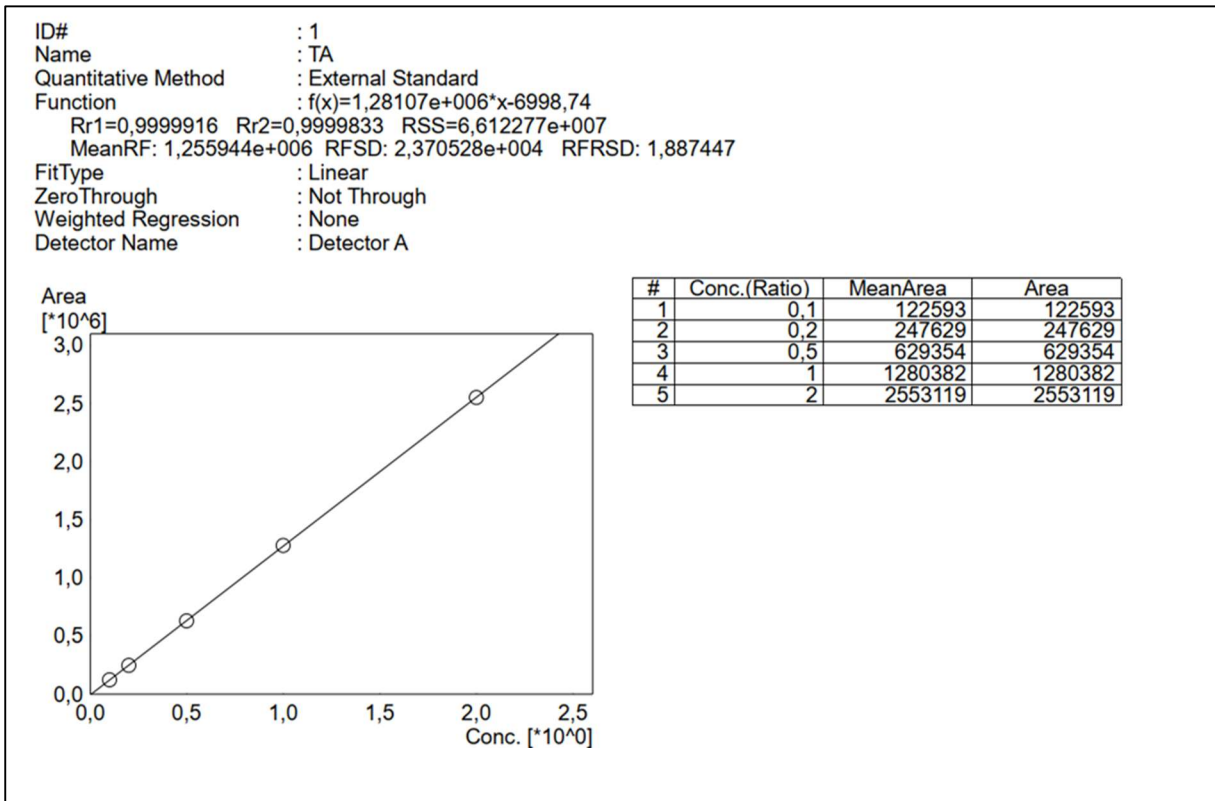


Figura 12: Curva padrão de ácido tereftálico. Concentrações em $g L^{-1}$.

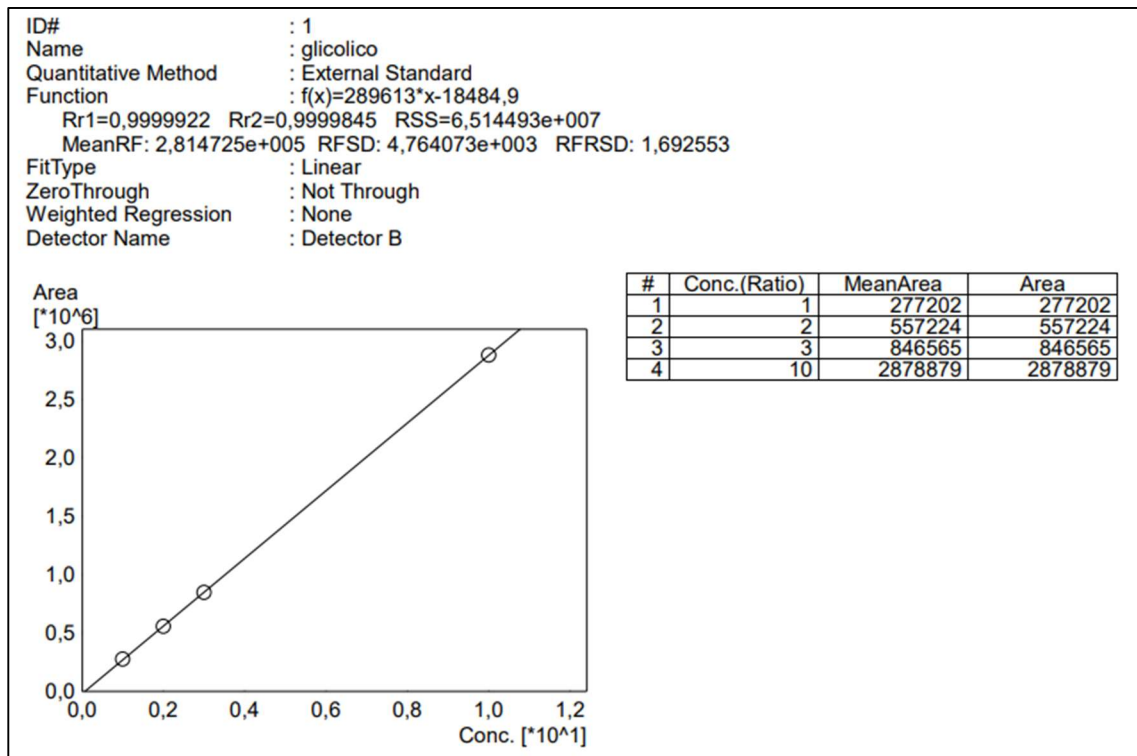


Figura 13: Curva padrão de ácido glicólico. Concentrações em $g L^{-1}$.

Peak#	Ret. Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	4.704	4.670	4.890	TIC	10251110	25.77	6276171	27.07	1.63		Pentanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester
2	4.957	4.890	5.035	TIC	144598	0.36	34278	0.15	4.22	V	Propane, 1,1-dimethoxy-
3	6.757	6.735	6.925	TIC	1202720	3.02	477551	2.06	2.52		Benzoic acid, methyl ester
4	14.849	14.820	14.915	TIC	392116	0.99	219051	0.95	1.79		Methyl tetradecanoate
5	15.917	15.890	15.975	TIC	164716	0.41	90555	0.39	1.82		Pentadecanoic acid, methyl ester
6	16.681	16.645	16.695	TIC	237276	0.60	148596	0.64	1.60		9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
7	16.721	16.695	16.745	TIC	1168248	2.94	705798	3.05	1.66	V	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
8	16.765	16.745	16.850	TIC	590386	1.48	297303	1.28	1.99	V	(Z)-Methyl hexadec-11-enoate
9	16.930	16.850	17.060	TIC	9362281	23.54	6022361	26.00	1.55	V	Hexadecanoic acid, methyl ester
10	17.292	17.260	17.330	TIC	217918	0.55	109733	0.47	1.99		n-Hexadecanoic acid
11	17.357	17.330	17.395	TIC	109073	0.27	56976	0.25	1.91	V	Octadecanoic acid, 10-methyl-, methyl ester
12	17.680	17.640	17.775	TIC	309186	0.78	156563	0.68	1.97		Cyclopropaneoctanoic acid, 2-hexyl-, methyl ester
13	17.898	17.860	17.970	TIC	649367	1.63	388299	1.68	1.67		Heptadecanoic acid, methyl ester
14	18.597	18.555	18.750	TIC	10977951	27.63	5921627	25.56	1.85		10-Octadecenoic acid, methyl ester
15	18.825	18.750	18.900	TIC	1082858	2.72	687121	2.97	1.58	V	Methyl stearate
16	19.176	19.130	19.240	TIC	1222776	3.07	773709	3.34	1.58		Octadecanoic acid, 10-methyl-, methyl ester
17	19.491	19.455	19.530	TIC	60193	0.15	31221	0.13	1.93		13-Docosenoic acid, methyl ester, (Z)-
18	19.995	19.955	20.055	TIC	235187	0.59	131605	0.57	1.79		1,2-Dodecanediol
19	20.355	20.315	20.395	TIC	175899	0.44	106665	0.46	1.65		cis-Methyl 11-eicosenoate
20	20.568	20.540	20.610	TIC	40028	0.10	23425	0.10	1.71		Hexadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester
21	21.501	21.470	21.525	TIC	43699	0.11	23075	0.10	1.89		Benzenesulphonic acid, 4-(5-decyl)-, methyl ester
22	21.555	21.525	21.585	TIC	32051	0.08	15263	0.07	2.10	V	Benzenesulphonic acid, 4-(5-decyl)-, methyl ester
23	21.905	21.865	21.960	TIC	179738	0.45	83332	0.36	2.16		Oleantirle
24	21.990	21.960	22.020	TIC	33095	0.08	15851	0.07	2.09	V	14-Octadecenoic acid, methyl ester
25	22.752	22.720	22.790	TIC	44357	0.11	24791	0.11	1.79		15-Tetracosenoic acid, methyl ester, (Z)-
26	24.029	23.990	24.120	TIC	485375	1.22	195877	0.85	2.48		13-Docosenamide, (Z)-
27	24.218	24.120	24.255	TIC	133099	0.33	49158	0.21	2.71	V	15-Tetracosenoic acid, methyl ester, (Z)-
28	25.815	25.785	25.875	TIC	48284	0.12	17611	0.08	2.74		9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester
29	25.910	25.875	25.965	TIC	96931	0.24	45701	0.20	2.12	V	15-Tetracosenoic acid, methyl ester, (Z)-
30	28.255	28.215	28.305	TIC	85656	0.22	34632	0.15	2.47		15-Tetracosenoic acid, methyl ester, (Z)-

Figura 14: Tabela de identificação dos picos encontrados por GC/MS da amostra de biomassa derivatizada de TA18 cultivada em MSM TA.

4. CONCLUSÃO GERAL

A principal substância convertida a partir de etilenoglicol por microrganismos é o ácido glicólico, processo também observado nos isolados EG6 e EG7 deste trabalho. Além disso, novos isolados foram capazes de produzir exopolissacarídeos, polihidroxicanoatos e lipídeos a partir dos monômeros de PET. A produção desses compostos pode ser melhorada utilizando métodos fermentativos de alta produção, otimizando as condições de cultivo e, quando possível, empregando modificações genéticas, como visto nos estudos da revisão. Portanto, o uso dessas estratégias pode aumentar a eficiência desses bioprocessos, contribuindo para alcançar soluções do tratamento desses resíduos, métodos de produção mais sustentáveis e uma economia ambientalmente circular e economicamente viável.