



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

LUANA LESSA RODRIGUES SANTOS

**BIODIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTEIRAS
MICROBIANAS PRESENTES NO COMPLEXO LAGUNAR E NAS SALINAS
DA REGIÃO DOS LAGOS: UMA ABORDAGEM METAGENÔMICA**

ARRAIAL DO CABO / RJ

2023

LUANA LESSA RODRIGUES SANTOS

**BIODIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTEIRAS
MICROBIANAS PRESENTES NO COMPLEXO LAGUNAR E NAS SALINAS
DA REGIÃO DOS LAGOS: UMA ABORDAGEM METAGENÔMICA**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Louisi Souza de Oliveira

**ARRAIAL DO CABO / RJ
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

S237b Santos, Luana Lessa Rodrigues
Biodiversidade e potencial biotecnológico de esteiras microbianas presentes no complexo lagunar e nas salinas da região dos lagos: uma abordagem metagenômica / Luana Lessa Rodrigues Santos. – Arraial do Cabo, 2023.

119 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Louisi Souza de Oliveira.

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

1. Esteiras microbianas. 2. Potencial biotecnológico. 3. Metagenômica.
I. Oliveira, Louisi Souza de. II. Título.

CDD:660.6

LUANA LESSA RODRIGUES SANTOS

BIODIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTEIRAS MICROBIANAS PRESENTES NO COMPLEXO LAGUNAR E NAS SALINAS DA REGIÃO DOS LAGOS: UMA ABORDAGEM METAGENÔMICA

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

COMISSÃO JULGADORA:

**Dr. Diogo Antonio Tschoeke – Titular Externo
(UFRJ)**

**Dr^a. Maria Helena Campos Baeta Neves - Titular Interno
(IEAPM)**

**Dr. Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira - Suplente
(UFF)**

**Dr^a. Louisi Souza de Oliveira
(IEAPM)**

Professora Orientadora – Presidente da Banca Examinadora

Arraial do Cabo, 15 de Setembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Às minhas médicas hematologistas, Renata Bulak e Marianne Landau e, toda equipe de enfermagem do Hospital Naval Marcílio Dias pela dedicação, cuidado e carinho no momento mais delicado da minha vida.

Aos meus pais, por serem meu porto seguro e por nunca desistirem de mim. Por me apoiarem e embarcarem comigo nessa loucura que foi minha jornada em Arraial do Cabo. Por lutarem comigo quando eu mesma já não tinha mais força. Por sempre acreditarem no meu potencial e no quanto eu poderia vencer cada degrau que a vida foi impondo no meu caminho.

Ao meu namorado, por compartilhar comigo momentos incríveis e embarcar nas minhas loucuras. Por ter escolhido ficar ao meu lado mesmo nos momentos de tempestade. Por apoiar, compreender e respeitar quando minhas ausências se fizeram necessárias.

Ao meu irmão, por ser compreensivo e não se deixar abater. Por se manter firme no meio da tempestade.

Ao Dr. Ricardo Coutinho e a Dr^a. Maria Helena, pela empatia e compreensão. Por me permitirem chegar até aqui.

Aos grandes amigos que fiz na Pós-Graduação em Biotecnologia Marinha, especialmente a Luana Portella, Simone Pacheco, Wladimir Faé, Isabel Cristina, Isis Ribeiro, Aline Câmara e ao Carlos. Vocês foram essenciais nesse caminho e o dia-a-dia tornava-se muito mais leve. Obrigado pelas trocas e por serem pessoas incríveis. Tenho orgulho de acompanhar a jornada individual de cada um e torço sempre pelo sucesso de vocês. São presentes que levo para vida.

Ao Daniel Campbell, *in memoriam*, por todos os conselhos e conversas que tivemos num momento tão delicado das nossas vidas. Por me tranquilizar e mostrar que o nosso tempo é mais importante do que qualquer cobrança. Por me compreender em situações que ninguém mais conseguiria.

Aos professores e profissionais do IEAPM e da Pós-Graduação por todos os ensinamentos e disponibilidade. O aprendizado foi enriquecedor.

Um agradecimento mais do que especial para Dr^a Louisi de Oliveira, por aceitar o desafio de me orientar depois da grande tempestade que a vida me proporcionou. Por compreender meu tempo e minha saúde. Por todo carinho e empatia com a pessoa que caiu de paraquedas no seu caminho. Palavras jamais serão suficientes para expressar tamanha gratidão que eu sinto. Você mais do que ninguém me fez ver que o fim estaria próximo e seria possível. Seus alunos tem sorte por ter alguém tão especial. Eu tive essa sorte. Até breve.

Aos profissionais do Laboratório de Microbiologia da UFRJ pelos dados concedidos e aprendizado adquirido.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e por terem aceito este convite.

As minhas meninas da Microbiologia/UFRJ, por serem minhas grandes incentivadoras e conselheiras. Por sentirem orgulho e acreditarem em mim mesmo quando não parecia mais ser possível.

Aos professores da UFRJ, Dr^a. Ana Bahia, Dr. Ednildo Machado e Dr^a Renata Campos pelo carinho e incentivo. Por acreditarem que eu poderia chegar ao fim.

A todos os meus familiares e amigos que torceram, me auxiliaram e por vezes me salvaram nesta etapa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão da bolsa.

“Enfrentando uma luta por dia, cheguei até aqui. Quando a vida pra mim foi Golias, eu virei um Davi. Foi tanto gigante que eu derrubei, batalha travada mais não desisti, pra hoje de cabeça erguida dizer: Eu venci”

(Ferrugem e Péricles – Davi)

RESUMO

A Lagoa de Araruama é o maior ecossistema lagunar hipersalino em estado permanente do mundo e encontra-se localizado no estado do Rio de Janeiro. Sua hipersalinidade está associada principalmente, a fatores climáticos característicos da Região dos Lagos e padrões específicos de circulação. Nessa região, são encontradas esteiras microbianas caracterizadas como biofilmes sedimentares laminados verticalmente e conhecidas por serem precursoras de estromatólitos e importantes modelos para o estudo de interações microbianas. No presente estudo, foi utilizada abordagem metagenômica para conhecer a diversidade taxonômica e funcional de esteiras microbianas coletadas, em duas estações do ano de 2013, a partir de oito locais na Lagoa e em salinas próximas. A análise das sequências possibilitou a identificação de *Proteobacteria* e *Cyanobacteria* como filos mais abundantes. Do ponto de vista funcional, os genes mais abundantes estão relacionados ao metabolismo de carboidratos e proteínas, fundamentais para a sobrevivência dos microrganismos formadores dessas esteiras. Por fim, foram identificados genes e microrganismos potencialmente envolvidos na precipitação de carbonato de cálcio bioinduzida e na síntese de biopolímeros utilizados para a produção de bioplástico, reforçando o potencial biotecnológico associado ao repertório gênico disponível nas esteiras microbianas presentes no complexo Lagunar de Araruama.

Palavras-chave: Esteiras Microbianas; Salinas; Lagoa de Araruama; Metagenômica; Diversidade Microbiana; Potencial Biotecnológico; Precipitação; PHA.

ABSTRACT

Araruama Lagoon is the largest permanent hypersaline lagoon ecosystem in the world and is located in the state of Rio de Janeiro. Its hypersalinity is mainly associated with climatic factors characteristic of the Lagos Region and specific circulation patterns. In this region, microbial mats are found, characterized as vertically laminated sedimentary biofilms and known to be precursors of stromatolites and important models for the study of microbial interactions. In the present study, a metagenomic approach was used to understand the taxonomic and functional diversity of microbial mats collected, in two seasons of the year 2013, from eight locations in lagoon and in nearby salt pans. Sequence analysis enabled the identification of *Proteobacteria* and *Cyanobacteria* as the most abundant phylum. From a functional point of view, the most abundant genes are related to the metabolism of carbohydrates and proteins, essential for the survival of microorganisms that form these mats. Finally, genes and microorganisms potentially involved in the bioinduced precipitation of calcium carbonate and in the synthesis of biopolymers used for the production of bioplastic were identified, reinforcing the biotechnological potential associated with the gene repertory available in the microbial mats in the Lagunar Araruama complex.

Keywords: Microbial Mats; Salt pans; Araruama Lagoon; Metagenomics; Microbial Diversity; Biotechnological Potential; Precipitation; PHA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Esteiras microbianas presentes em salinas da Região dos Lagos sob diferentes estruturas morfológicas. (A) Salina Cisne; (B;D) Salina Mossoró e (C) Salina Br..... 20
- Figura 2. Microrganismos que podem ser encontrados em esteiras microbianas e que interagem através de seus metabolismos..... 21
- Figura 3. Mapa da Lagoa de Araruama e municípios da Região dos Lagos localizados ao seu redor..... 22
- Figura 4. Estruturas encontradas comumente em salinas, onde é possível observar formações de esteiras microbianas e estruturas rígidas indicativas de precipitação mineral (Salina BR – Região do Lagos, RJ)..... 24
- Figura 5. Análise de palavras-chaves baseada em artigos científicos no período de 2005 a 2015 referente a estudos na área de metagenômica, sendo as mais presentes: humano, não-humano e bactéria..... 25
- Figura 6. Etapas gerais a serem seguidas numa abordagem de pesquisa envolvendo metagenômica. Após a coleta da amostra são feitas a extração de DNA, o sequenciamento para obtenção de dados metagenômicos e por fim, as análises que podem ser funcionais ou taxonômicas..... 26
- Figura 7. Principais aplicações biotecnológicas relacionadas ao campo da biotecnologia marinha..... 27
- Figura 8. Principais aplicações e potenciais biotecnológicos que são alvo de estudo em esteiras microbianas..... 28

METODOLOGIA

- Figura 9. Pontos de coleta ao longo do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas encontradas na Região dos Lagos, RJ..... 30
- Figura 10. Exemplares de esteiras microbianas coletadas em 2018 em (A) Sal Cisne; (B) Silva; (C) BR e (D) Mossoró, usando como ponto de referência as coordenadas geográficas disponibilizadas..... 31
- Tabela 1. Parâmetros físico-químicos medidos nos diferentes locais de coleta no verão e no inverno do ano de 2013..... 32

CAPÍTULO 1

- Figura 1. (A) Distribuição de microrganismos nas esteiras microbianas de acordo com suas exigências fisiológicas. (B) Visualização a olho nu da estratificação de esteiras microbianas encontradas na Lagoa Vermelha, Região dos Lagos – RJ..... 36
- Figura 2. Tipos de estruturas de esteiras microbianas que podem ser encontradas na Lagoa de Pitanguinha - Região dos Lagos, RJ – Brasil. Elas podem ser do tipo (A) Coloforme; (B) Poligonal e (C) Pustular..... 37
- Tabela 1. Características do sequenciamento e processamento das sequências que foram utilizadas para as análises taxonômicas e funcionais via *MG-RAST* (V- verão; I - inverno)..... 38
- Figura 3. Abundância relativa referente aos principais filios Domínios presentes em esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos, em duas estações (S - *summer* e W - *winter*) no ano de 2013..... 39
- Figura 4. Abundância relativa referente aos principais filios bacterianos presentes em esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos, em duas estações (S - *summer* e W - *winter*) no ano de 2013..... 40
- Tabela 2. Proteobactérias mais abundantes nas amostras de acordo com sua classe/gênero e suas aplicações biotecnológicas descritas na literatura..... 42
- Tabela 3. Gêneros mais abundantes de cianobactérias presente nas amostras e suas aplicações biotecnológicas descritas na literatura..... 44
- Figura 5. Potenciais aplicações biotecnológicas para cianobactérias descritas na literatura..... 45
- Figura 6. Abundância relativa dos filios de arqueas presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos, em duas estações (S - *summer* e W- *winter*) do ano de 2013..... 46
- Tabela 4. Gêneros mais abundantes do Domínio *Arquea* presentes nas amostras e suas aplicações biotecnológicas descritas na literatura..... 48
- Figura 7. Abundância relativa referente a Ordem Vírus presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta de (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - *summer* e W- *winter*), no ano de 2013..... 49

Figura 8. Abundância relativa referente ao <i>SEED</i> 1 para os processos metabólicos de esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - <i>summer</i> e W - <i>winter</i>), no ano de 2013.....	51
Figura 9. Abundância relativa referente ao <i>SEED</i> 2 de Carboidratos presentes em esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S- <i>summer</i> e W- <i>winter</i>), no ano de 2013.....	53
Figura 10. Abundância relativa referente ao <i>SEED</i> 2 de Virulência e Defesa presentes em esteiras microbianas dos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - <i>summer</i> e W- <i>winter</i>), no ano de 2013.....	55
Tabela 5. Gêneros mais abundantes identificados em três perfis de resistência a antibióticos em esteiras microbianas.....	56
Figura 11. Abundância relativa referente ao <i>SEED</i> 2 de Ácidos Graxos, Lipídeos e Isoprenoides presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S- <i>summer</i> e W - <i>winter</i>), no ano de 2013.....	59

CAPÍTULO 2

Figura 1. A mineralização biologicamente induzida depende de interações entre microrganismos, seus metabolismos e condições ambientais.....	64
Figura 2. Morfogênese de estromatólitos e a influência biológica e ambiental exercida sobre suas diferentes etapas de crescimento.....	65
Figura 3. Principais enzimas envolvidas no metabolismo de Degradação da Ureia: allophanato hidrolase (EC 3.5.1.54); urease (EC 3.5.1.5) e urea carboxilase (EC 6.3.4.6).....	69
Figura 4. (1) A enzima urease decompõe ureia em carbamato e amônia; (2) Espontaneamente, o carbamato sofre uma hidrólise gerando amônia e ácido carbônico que serão equilibrados em água para auxiliar no aumento do pH do meio.....	70
Figura 5. Reações químicas dependente de ATP envolvendo a Urea Amidoliase.....	71
Figura 6. Genes associados ao metabolismo da Redução Dissimilatória de Nitrato a Amônia (DNRA) (Nap/Nar - nitrato redutase; Nrf/Nir - nitrito redutase).....	73

Figura 7. Vias fermentativas e respiratórias envolvidas na DNRA interferem diretamente na indução da precipitação de carbonato de cálcio através do consumo e produção de compostos como H^+ , HCO_3^- e NH_4^+ 75

Figura 8. Equação referente a via de Desnitrificação..... 76

Figura 9. Vias de Desnitrificação e DNRA. As nitrato redutases Nar/Nap são comuns em ambas, porém, após a formação de nitrito, outras enzimas dão continuidade ao processo, sendo elas identificadas como Nir, Nor e Nos..... 76

CAPÍTULO 3

Figura 1. Vias metabólicas envolvidas na biossíntese de PHA e as principais enzimas utilizadas neste metabolismo. Destacado em preto está a via do P3HB que começa pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA em uma de acetoacetil-CoA (AcAc-CoA) que é catalisada a 3-hidroxiacetil-CoA (3-HA-CoA). Na etapa final da via, a PhaC (PHA sintase) sintetiza o biopolímero poli-3-hidroxiacetirato (P3HB)..... 83

Figura 2. Abundância relativa referente ao *SEED* 3 do Metabolismo de Polihidroxiacetirato e suas principais enzimas presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - *summer* e W - *winter*), no ano de 2013. Em “Outros”, encontram-se as sequências que representam menos de 1,50% das sequências totais. Marcado em vermelho, verde e roxo encontram-se as enzimas PhaA, PhaC e PhaB, respectivamente..... 85

Tabela 1. Gêneros mais abundantes relacionados a enzima PHA sintase (PhaC) nas amostras de esteiras microbianas e principais referências de estudos relacionando esses gêneros a produção de PHA/PHB..... 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
PHA	Polihidroxialcanoato
PCC	Precipitação de Carbonato de Cálcio
PSU	<i>Practical Salinity Unit</i> (Unidade de Salinidade Prática)
SDS	Sulfato de Dodecil Sódico
MG-RAST	<i>Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
PB	Pares de Base
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
REFSEQ	<i>Reference Sequence</i>
SEED	<i>Subsystem Techonology</i>
RJ	Rio de Janeiro
PKS	Policetídeo Sintase
NRPS	Peptídeo Sintase Não Ribossomal
PHB	Polihidroxibutirato
OMS	Organização Mundial da Saúde
MBI	Mineralização Biologicamente Induzida
RDS	Redução Dissimilatória do Sulfato
DNRA	Redução Dissimilatória do Nitrato a Amônia
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
NR	Nitrato Redutase
NiR	Nitrito Redutase
NO	Óxido Nítrico
N ₂ O	Óxido Nitroso
N ₂	Dinitrogênio
P3HB	Poli-3-Hidroxibutirato

LISTA DE SÍMBOLOS

CO_2	Dióxido de carbono
C	Carbono
N	Nitrogênio
S	Enxofre
'S	Sul
'O	Oeste
Km^2	Quilômetros Quadrados
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius
g	Gramas
%	Por cento (porcentagem)
PO_4^{-3}	Fosfato
NO_3^-	Nitrato
NO_2^-	Nitrito
NH_4^+	Amônia
μMol	Micromol
mg	Miligramas
<	Menor que
\leq	Menor ou igual
\geq	Maior ou igual
O_2	Oxigênio
H_2S	Sulfeto de hidrogênio
α	Alfa
γ	Gamma
δ	Delta
CaCO_3	Calcita/Carbonato de Cálcio
$\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$	Dolamita
Ca^{2+}	Cálcio
NH_3	Amônio
OH^-	Hidroxila
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	Ureia
NH_2COOH	Carbamato

H_2CO_3

Ácido Carbônico

HCO_3^-

Bicarbonato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1 ESTEIRAS MICROBIANAS.....	19
1.2 COMPLEXO LAGUNAR DE ARARUAMA.....	22
1.3 METAGENÔMICA.....	24
1.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ESTEIRAS MICROBIANAS.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
3. HIPÓTESE.....	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 COLETA.....	30
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	32
4.3 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO.....	32
4.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	33

Capítulo 1. DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DAS ESTEIRAS MICROBIANAS DO COMPLEXO LAGUNAR DA LAGOA DE ARARUAMA E SALINAS PRÓXIMAS

INTRODUÇÃO.....	35
METODOLOGIA.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
1. ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS.....	38
2. ANÁLISES TAXONÔMICAS E POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS.....	38
2.1 DOMÍNIO BACTÉRIA.....	39
2.1.1 Filo Proteobacteria.....	41
2.1.2 Filo Cyanobacteria.....	43
2.2 DOMÍNIO ARQUEA.....	46
2.3 DOMÍNIO VÍRUS.....	48
3. ANÁLISE FUNCIONAL DAS ESTEIRAS MICROBIANAS.....	50
3.1 SEED 1.....	50
3.2 SEED 2.....	52
3.2.1 Carboidratos.....	52
3.2.2 Virulência e Defesa.....	54
3.2.3 Ácidos Graxos, Lipídeos e Isoprenoides.....	59

CONCLUSÃO.....	62
Capítulo 2. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ESTEIRAS MICROBIANAS ASSOCIADO À PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO	
INTRODUÇÃO.....	64
METODOLOGIA.....	66
RESULTADOS EDISCUSSÃO.....	67
1.AMONIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	67
2.HIDRÓLISE DE UREIA.....	69
3.REDUÇÃO DISSIMILATÓRIA DE NITRATO A AMÔNIA (DNRA).....	72
4.DESNITRIFICAÇÃO.....	75
CONCLUSÃO.....	79
Capítulo 3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ESTEIRAS MICROBIANAS ASSOCIADO À SÍNTESE DE BIOPLÁSTICO (PHA/PHB)	
INTRODUÇÃO.....	81
METODOLOGIA.....	84
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
1. ANÁLISE FUNCIONAL.....	84
2. ANÁLISE TAXONÔMICA.....	87
CONCLUSÃO.....	89
5. CONCLUSÃO GERAL.....	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
7. ANEXOS.....	118
7.1 MATERIAL COMPLEMENTAR.....	118

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ESTEIRAS MICROBIANAS

As esteiras microbianas são caracterizadas como biofilmes sedimentares laminados verticalmente e estabilizados pela presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Seus microrganismos formadores possuem diferentes atividades metabólicas que interagem e dão características a cada uma de suas camadas (DUPRAZ; VISSCHER, 2005; GERDES, 2010). Podendo ser encontradas na interface líquido-sólido em diversos habitats aquáticos, como lagoas, fontes termais, rios de água doce, lagos hipersalinos e zonas costeiras entre marés, essas esteiras são consideradas ecossistemas bentônicos autossustentáveis e resilientes, sendo importantes modelos para a investigação das interações microbianas e biogeoquímicas (DUPRAZ et al., 2009; PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018). São consideradas elementos importantes para evolução da superfície da terra desde a litosfera até a atmosfera, no início do período Pré-cambriano, ao adotarem condições redox acopladas biologicamente, que levaram ao processo de fotossíntese oxigenada (EHRlich, 1998; DUPRAZ et al., 2009). O ciclo do cálcio (deposição e dissolução) foi sustentado por procariotos, que desempenharam papel fundamental no surgimento da biosfera, influenciando o destino do carbono inorgânico e a remoção do dióxido de carbono (CO₂) da atmosfera primitiva (ZAVARZIN, 2002).

Essas estruturas são parte do estágio de desenvolvimento dos estromatólitos (GOMES, 2011), que pertencem a uma categoria maior denominada microbialitos e que também englobam trombólitos, dendrólitos e leiólitos, todos depósitos minerais de origem microbiana (FAIRCHILD; SALLUN FILHO, 2004). Os estromatólitos são estruturas biossedimentares litificadas, que crescem através do acréscimo de lâminas de sedimento, aprisionadas pela precipitação de minerais, provenientes da interação entre comunidades microbianas e o meio que estão inseridos (SILVA et al, 2008). Na literatura, existem trabalhos que relatam a existência de diferentes tipos de estromatólitos e esteiras microbianas, mas, não existe um critério bem estabelecido para sua classificação e identificação (Figura 1) (SRIVASTAVA, 2002; JAHNERT;

COLLINS, 2012; PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018; RIDING, 2000; SILVA et al., 2013). O consenso é que as diferenças morfológicas ocorrem devido ao tipo de comunidade microbiana, tipo de metabolismo e ao tipo de ambiente em que se encontram, pois são as diferenças desses fatores que determinam ou não a ocorrência da litificação das esteiras em estromatólitos.

Figura 1. Esteiras microbianas presentes em salinas da Região dos Lagos sob diferentes estruturas morfológicas. (A) Salina Cisne; (B; D) Salina Mossoró e (C) Salina Br



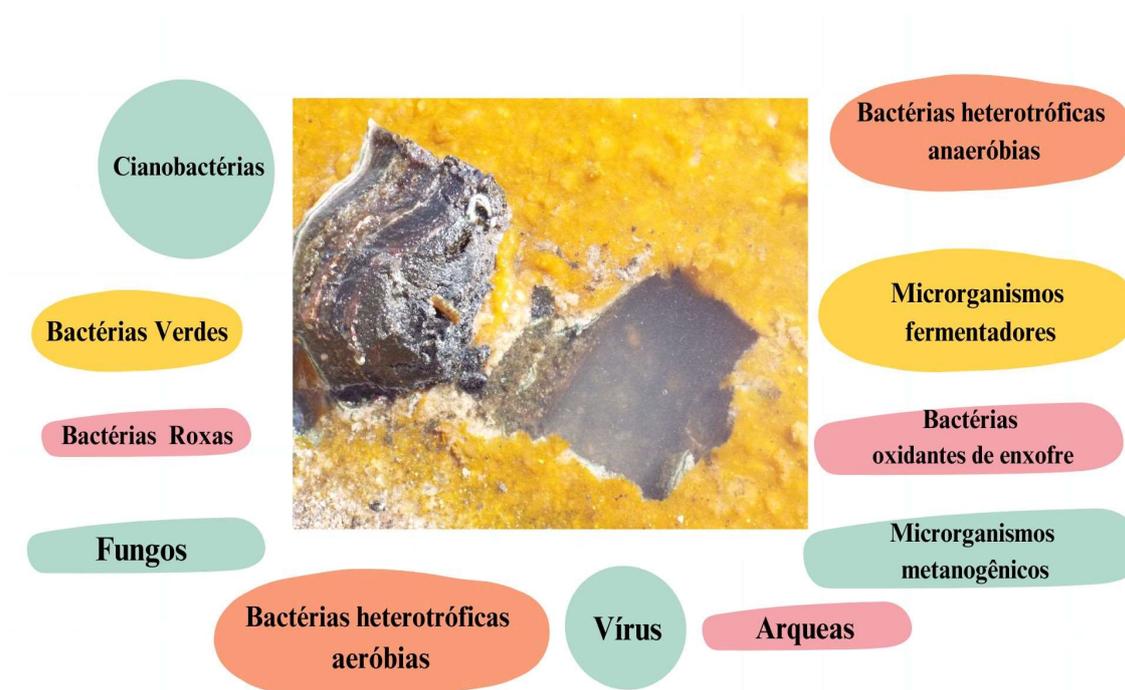
Fonte: Fotos retiradas pela autora do trabalho no ano de 2018, seguindo as coordenadas geográficas disponibilizadas pela equipe de coleta.

As comunidades das esteiras microbianas são compostas principalmente por bactérias, porém, também são encontradas arqueas e fungos (PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018). Menos estudado são os vírus, que desempenham papel importante no ciclo do carbono (C) e de nutrientes, além de contribuírem para as trocas genéticas dentro das esteiras (Figura 2) (BOLHUIS; CRETOIU; STAL, 2014).

Além da diversidade taxonômica, as esteiras microbianas destacam-se pela grande diversidade metabólica, sendo frequentemente compostas por microrganismos fototróficos oxigênicos (cianobactérias, em sua maioria),

fototróficos anoxigênicos (bactérias verdes e roxas), heterotróficos aeróbios/anaeróbios, fermentadores, oxidantes de enxofre e metanogênicos (DUPRAZ et al., 2009; DUPRAZ; VISSCHER, 2005; PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018; VAN GEMERDEN, 1993). Dependendo do tipo de tapete, cinco ou sete grupos chaves desses microrganismos operam em conjunto para realizar os ciclos do nitrogênio (N), enxofre (S) e carbono.

Figura 2. Microrganismos que podem ser encontrados em esteiras microbianas e que interagem através de seus metabolismos.



Fonte: Fotografia e esquema idealizado pela autora do trabalho. A foto refere-se a um recorte de uma esteira microbiana localizada na Salina Br, em que possível visualizar sua estrutura em camadas e a presença de biofilme (cor amarela) no local de amostragem no ano de 2018

Atualmente, esteiras microbianas encontram-se distribuídas globalmente e são bem documentadas em áreas costeiras e ambientes extremos (CARDOSO et al., 2019). A versatilidade de ambientes em que as esteiras se encontram permite que aspectos relacionados à sua estrutura e composição sejam estudados (RASUK et al., 2016; ROESELERS et al., 2007). As estruturas encontradas em *Shark Bay*, na Austrália, e em *Guerrero Negro*, no México, são as mais conhecidas e utilizadas como modelo para estudo em ambientes hipersalinos (LEY et al., 2006; RUVINDY et al., 2016). No Brasil, as mais estudadas e conhecidas encontram-se no estado do Rio de Janeiro (RJ),

destacando-se a Lagoa Salgada, que fica no município de Campos dos Goytacazes e a Lagoa Vermelha, localizada na Região dos Lagos (ALMEIDA et al., 2022; CARVALHO et al., 2018).

1.2 COMPLEXO LAGUNAR DE ARARUAMA

A Lagoa de Araruama é o maior ecossistema lagunar hipersalino em estado permanente do mundo, tendo importância fundamental no desenvolvimento econômico e social da região em que se encontra, devido à atividade da extração de sal (RIBEIRO, 2013). Situa-se no Estado do Rio de Janeiro, na Região dos Lagos (latitudes de 22°50'S e 22°57'S e longitudes de 42°00'O e 42°44'O), estendendo-se pelos municípios de Saquarema, Araruama, Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia, Cabo Frio e Arraial do Cabo (Figura 3) (MARINHO, 2022).

Figura 3. Mapa da Lagoa de Araruama e municípios da Região dos Lagos localizados ao seu redor



Fonte: Google Earth, 2022

Trata-se de uma laguna com idade estimada entre 5 e 7 mil anos com uma superfície de 220km². A bacia hidrográfica da Lagoa de Araruama abrange cerca de 404km² dos quais, aproximadamente 60km² são de salinas e 6km² correspondem às lagoas situadas em sua periferia. A lagoa se comunica com o mar exclusivamente através do canal de Itajurú, localizado em Cabo Frio, porém, este canal passou por um estreitamento que levou a redução da entrada e da renovação de suas águas (PRIMO; BIZERRIL, 2002).

A hipersalinidade de suas águas é associada a diferentes fatores, tais como, o clima de transição tropical-semiárido, o pequeno aporte de água doce dos rios, a elevada evaporação, a reduzida precipitação, a pequena troca de águas com o oceano, a lenta renovação da água e a forte ação de ventos (COSTA; SEABRA, 2021). A ressurgência também é sugerida na literatura como fator contribuinte, pois reduz a ocorrência de chuvas na região, levando ao aumento da evaporação e, conseqüentemente, da salinidade (VALLE, 2021). A temperatura das águas superficiais costumam variar de 20°C a 32°C em função das estações do ano e do local (PRIMO; BIZERRIL, 2002). Além disso, o aumento da visitação turística em feriados e no verão tem elevada influência sobre a qualidade da água.

Em torno da lagoa, as construções de salinas datam de 1929 e persistem até os dias atuais (COSTA et al., 2022). As salinas são áreas de produção de sal onde ocorre captação da água do mar ou de lagos hipersalinos para locais onde haja evaporação da água e decantação do sal (LEITE, 2023). Estes locais são tanques denominados evaporadores, concentradores e cristalizadores. Ao longo das etapas de produção, as concentrações de sal são diferentes entre os tanques pois, cada um deles apresenta uma determinada função no processo. Começando pelos evaporadores, a água utilizada para produção é concentrada para passar pelo processo de evaporação. Em seguida, nos concentradores ocorrerá a concentração de sais marinhos para que, nos cristalizadores, o sal marinho esteja em seu estado sólido (ARAÚJO, 2017). Muitos destes locais possuem uma impermeabilização natural através de uma fina camada de algas que se formam naturalmente com o tempo (PRIMO; BIZERRIL, 2002).

Ao observar as salinas que se encontram ativas e as que já foram desativadas na Região dos Lagos, é possível visualizar a presença de esteiras microbianas e de estruturas rígidas laminadas que indicam a capacidade desse ecossistema de precipitar minerais (Figura 4).

Figura 4. Estruturas encontradas comumente em salinas, onde é possível observar formações de esteiras microbianas e estruturas rígidas indicativas de precipitação mineral. (Salina BR – Região do Lagos, RJ)



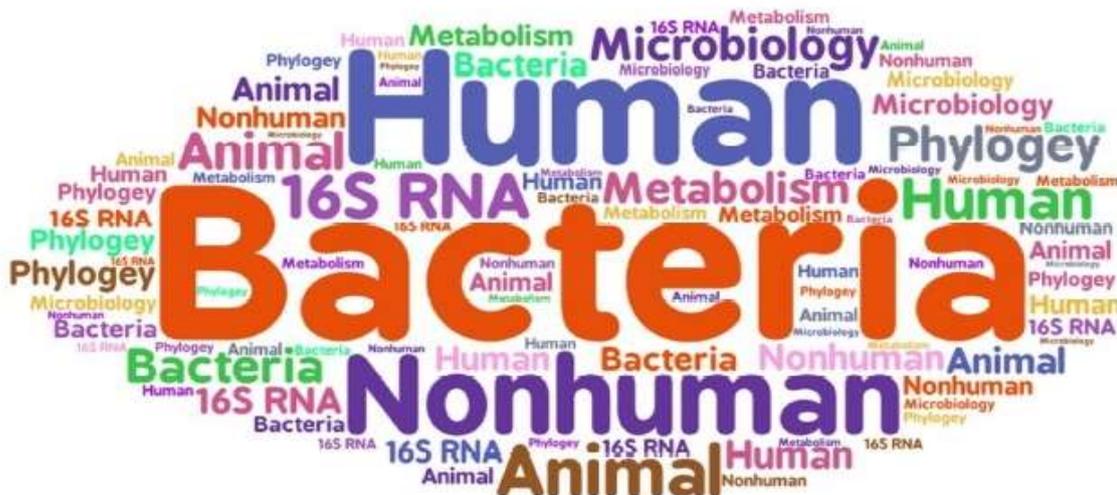
Fonte: Fotografia tirada pela autora do trabalho na Salina Br, seguindo as coordenadas geográficas disponibilizadas pela equipe de coleta, 2018

1.3 METAGENÔMICA

A metagenômica nasceu da necessidade de uma técnica ou um conjunto de técnicas que permitissem o estudo da diversidade microbiana de um ambiente a partir da extração do seu material genético, sem depender do cultivo de microrganismos (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004 ;GARRIDO-CARDENAS; MANZANO-AGUGLIARO, 2017). Logo, define-se como uma abordagem independente de cultivo, baseada na análise de sequências de DNA de uma mistura de populações microbianas, ou seja, é a análise genômica do DNA microbiano total extraído diretamente de uma amostra ambiental, clínica ou industrial (MEIRELLES et al, 2020). Desenvolveu-se com a descoberta de que a diversidade microbiana é maior do que se imaginava e um recurso significativo para aplicações biotecnológicas (Figura 5) (STEELE; STREIT, 2005). É um campo diverso e em rápido

crescimento, voltado para a obtenção de conhecimento sobre genomas de microrganismos, bem como de comunidades inteiras.

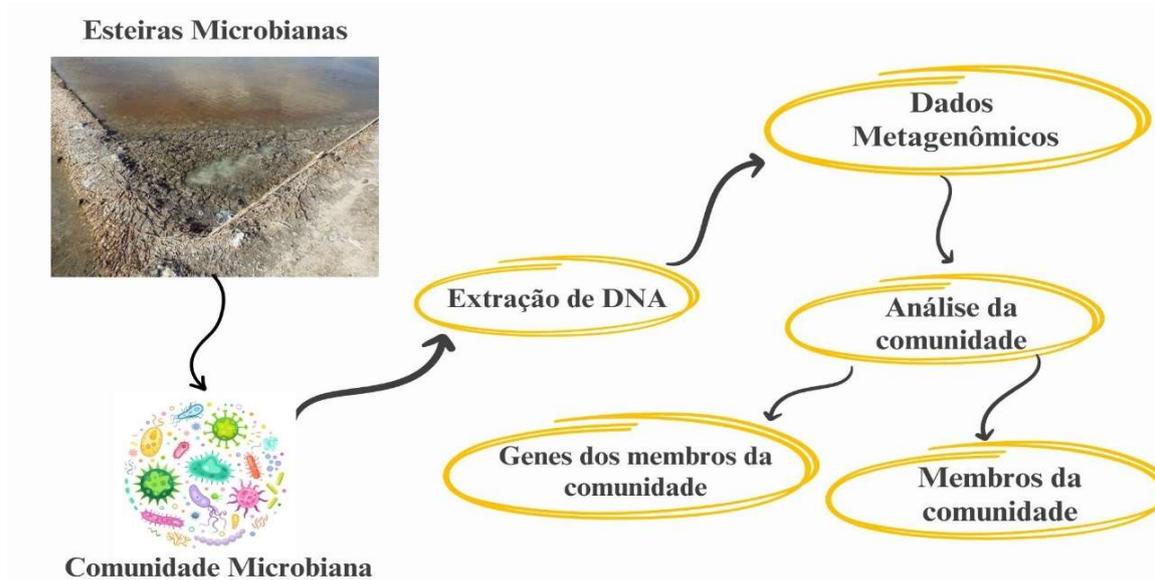
Figura 5. Análise de palavras-chaves baseada em artigos científicos no período de 2005 a 2015 referente a estudos na área de metagenômica, sendo as mais presentes: humano, não-humano e bactéria



Fonte: Adaptado de GARRIDO-CARDENAS; MANZANO-AGUGLIARO, 2017

É um tipo de abordagem significativa para biotecnologia, pois, permite explorar a taxonomia de microrganismos não cultiváveis com a finalidade de descobrir novos genes e potenciais vias metabólicas de interesse socioeconômico (CHISTOSERDOVA, 2010). Muitos ambientes tem sido o foco da metagenômica incluindo o solo, cavidade oral, fezes, ambientes hipersalinos, microbiota e diversos habitats aquáticos, uma vez que, as técnicas de cultura padrão permitem o estudo de menos de 1% da diversidade microbiana na maioria das amostras ambientais. Com os avanços na tecnologia do sequenciamento, expandiram-se as abordagens e as perguntas a serem respondidas devido ao acesso a uma grande quantidade de informações genômicas (RIESENFELD; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2004). Entretanto, para desenvolver um estudo com abordagem metagenômica, algumas etapas devem ser seguidas, como a coleta de amostras ambientais, a extração de DNA, o sequenciamento e as análises de bioinformática (Figura 6).

Figura 6. Etapas gerais a serem seguidas numa abordagem de pesquisa envolvendo metagenômica. Após a coleta da amostra são feitas a extração de DNA, o sequenciamento para obtenção de dados metagenômicos e por fim, as análises que podem ser funcionais ou taxonômicas



Fonte: Adaptado de MEIRELLES et al, 2020

Ao estudar as interações que ocorrem dentro das estruturas presentes em ambientes hipersalinos, como as esteiras microbianas, é possível explorar modelos ecológicos e funcionais das interações que ali existem a fim de se investigar adaptações e evoluções ao ambiente extremo (WONG; AHMED-COX; BURNS, 2016). Devido aos constantes avanços da tecnologia, ao sequenciamento de alto rendimento e a integração das ômicas, o conhecimento sobre as esteiras microbianas vem sendo revelado. Diferentes nichos, novas espécies e diferentes linhagens de microrganismos e caminhos metabólicos são descritos, nos mostrando que a compreensão que se tinha sobre esses ecossistemas está em constante evolução devido a utilização de novas abordagens, como a metagenômica (RINKE et al., 2013).

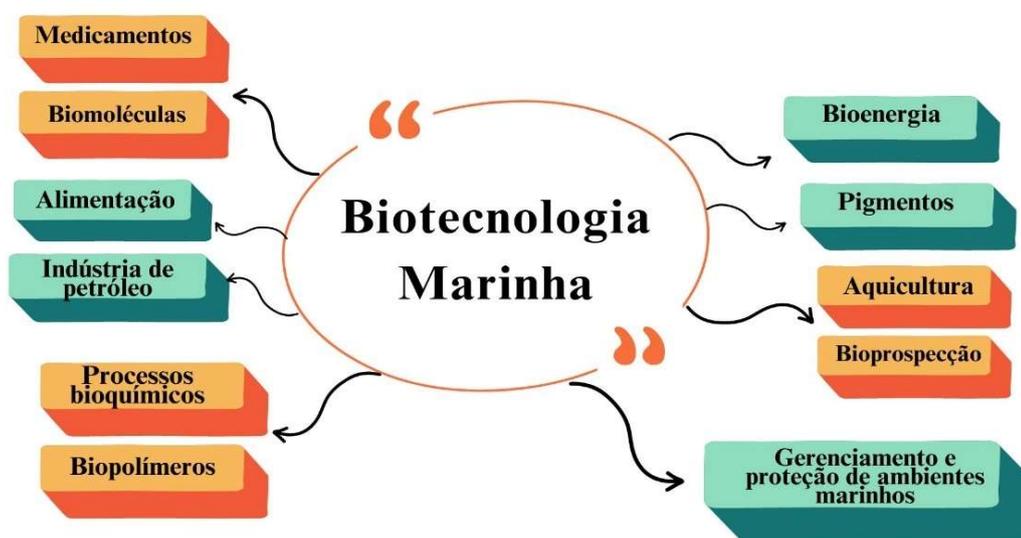
1.4 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ESTEIRAS MICROBIANAS

Nos últimos anos, com o surgimento e a aplicação de novas tecnologias moleculares, o conhecimento e as descobertas sobre o potencial metabólico e a diversidade de microrganismos presentes nas esteiras microbianas aumentou. Grupos de pesquisa buscam entender melhor sobre essa complexa

interação entre os microrganismos e as possibilidades de novos potenciais e aplicações biotecnológicas.

A biotecnologia tem sido reconhecida como uma das tecnologias mais promissoras para o século XXI e neste ramo, a biotecnologia marinha estuda os organismos marinhos e seus compostos para aplicações em diversos setores que possam beneficiar a sociedade (Figura 7) (ROTTER et al., 2021).

Figura 7. Principais aplicações biotecnológicas relacionadas ao campo da biotecnologia marinha



Fonte: Esquema idealizado pela autora do trabalho, 2022

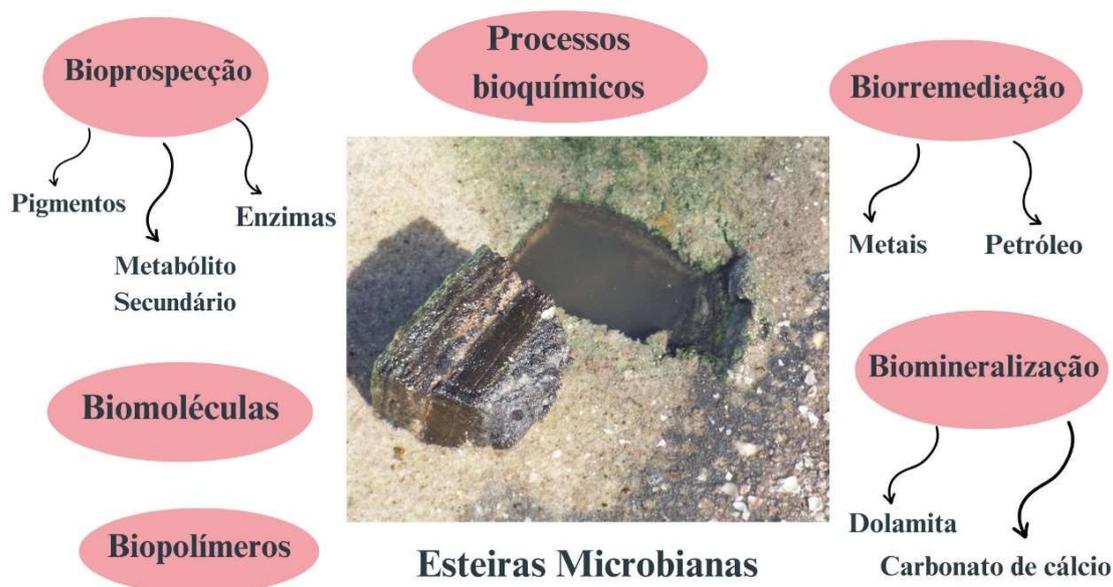
A vida originou-se no mar e, devido às grandes variações ambientais que podem ser encontradas associadas a temperatura, luz, salinidade e pressão, os organismos marinhos desenvolveram-se sob diferentes espectros de formas, funções e estratégias que foram fundamentais para sua sobrevivência. Neste contexto, os ambientes extremos têm despertado o interesse da comunidade científica, pois, são locais que apresentam parâmetros como pressão, temperatura, pH, salinidade, estresse oxidativo, radiação, metais e produtos químicos considerados desafiadores para a sobrevivência da maioria dos organismos. Nesses ambientes são encontrados os organismos extremófilos, capazes de se adaptar e prosperar nessas condições devido ao seu metabolismo flexível (TRINCONE, 2017).

O entendimento e o estudo de locais como os ambientes hipersalinos, em especial as estratégias funcionais e a versatilidade fisiológica desenvolvida

pelos microrganismos encontrados nas esteiras microbianas, apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas (Figura 8) (HAYASHIDA et al., 2017; NGUYEN et al., 2022; SALLOTO et al., 2012; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ et al., 2018; SUBASHCHANDRABOSE et al., 2011). A exploração de vias metabólicas associadas à produção de bioplástico – como o polihidroxicanoato (PHA) – e à precipitação de carbonato de cálcio (PCC), são exemplos de potenciais que podem ser investigados em esteiras microbianas (BERLANGA et al., 2006 ; VASCONCELOS et al., 2006).

Nesse estudo, utilizaremos a metagenômica para conhecer a diversidade taxonômica e funcional dos microrganismos presentes em esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas, bem como seus potenciais biotecnológicos.

Figura 8. Principais aplicações e potenciais biotecnológicos que são alvo de estudo em esteiras microbianas



Fonte: Fotografia e esquema idealizado pela autora do trabalho. A foto refere-se a um recorte de uma esteira microbiana localizada na Salina Br, em que possível visualizar sua estrutura em camadas no local de amostragem no ano de 2018

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e de salinas próximas na Região dos Lagos, através de abordagem metagenômica

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Capítulo 1: Analisar a diversidade metabólica e taxonômica das esteiras microbianas;

→ Capítulo 2: Analisar e Explorar o potencial biotecnológico das esteiras microbianas associado à precipitação de carbonato de cálcio através dos metabolismos relacionados ao ciclo do nitrogênio;

→ Capítulo 3: Identificar genes que estejam relacionados ao processo da síntese de bioplástico (PHA)

3. HIPÓTESE

A Lagoa de Araruama com seu complexo lagunar e suas salinas, tratando-se de um ambiente extremo, abriga uma diversidade de microrganismos com potencial biotecnológico associados as esteiras microbianas presentes nestes locais.

4. METODOLOGIA

4.1 COLETA

As amostras das esteiras microbianas foram coletadas em 8 locais, sendo eles: Brejo de Espinho, BR, Lagoa Vermelha, Monte Alto, Mossoró, Queira, Sal Cisne e Silva, localizados próximos à Lagoa de Araruama e em salinas da mesma região (Figura 9). A amostragem foi feita em duas estações do ano, sendo uma no verão (janeiro) e outra no inverno (junho) do ano de 2013 – com exceção de Queira, BR e Lagoa Vermelha, que só foram coletados no inverno - a fim de possibilitar uma representação mais ampla do perfil taxonômico e funcional das comunidades microbianas nesses locais.

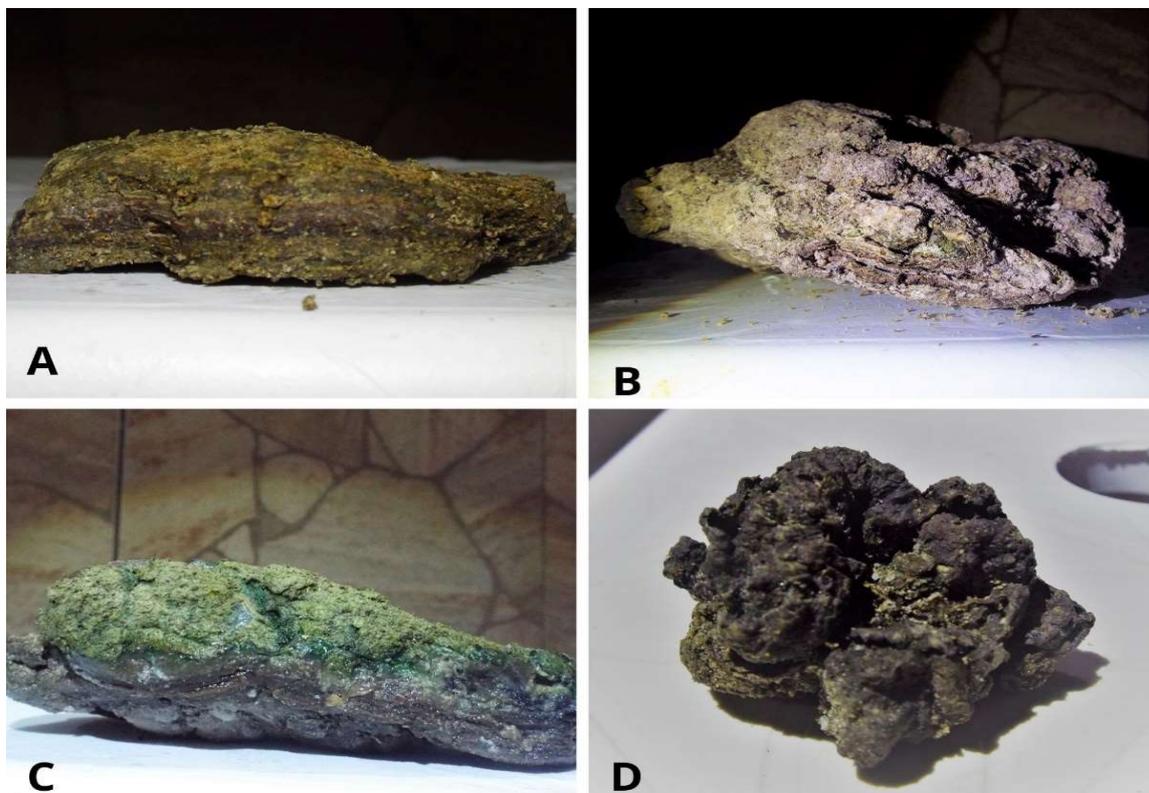
Figura 9. Pontos de coleta ao longo do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas encontradas na Região dos Lagos, RJ



Fonte: Google Earth, 2022

As esteiras foram retiradas em diferentes estágios de maturidade e estratificação (Figura 10). As amostras compreendiam uma mistura das diferentes camadas presentes nessas estruturas e suas coletas foram feitas utilizando pá e espátulas de metal, previamente esterilizadas por flambagem e etanol. Para cada amostra, aproximadamente 75g foram adicionados em tubos de polipropileno estéreis em campo e, armazenados em nitrogênio líquido.

Figura 10. Exemplos de esteiras microbianas coletadas em 2018 em (A) Sal Cisne; (B) Silva; (C) BR e (D) Mossoró, usando como ponto de referência as coordenadas geográficas disponibilizadas



Fonte: Fotografia tirada pela autora do trabalho em diferentes salinas utilizadas para amostragem, seguindo as coordenadas geográficas disponibilizadas pela equipe de coleta em 2018

No momento da coleta das amostras, foram medidos parâmetros físico-químicos referentes a temperatura ($^{\circ}\text{C}$), salinidade (PSU), fosfato (PO_4^{3-}), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e amônia (NH_4^+) de cada um dos locais em ambas as estações (verão/inverno) (Tabela 1). As medições de fosfato, nitrato, nitrito e amônia foram feitas através de espectrofotometria, uma vez que, essas moléculas apresentam diferentes níveis de absorvância. O preparo das amostras de água para medição destes nutrientes foi feito de acordo com as metodologias de PARANHOS, 1996; FAO, 1975 e STRICKLAND; PARSONS, 1972. Para a medição de temperatura e salinidade foram utilizados termômetro e refratômetro, respectivamente.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos medidos nos diferentes locais de coleta no verão e no inverno do ano de 2013

Locais de Coleta	Salinidade (PSU)		Temperatura (°C)		Fosfato (PO_4^{3-}) [μ Mol]		Nitrito (NO_2^-) [μ Mol]		Nitrato (NO_3^-) [μ Mol]		Amônia (NH_4^+) [μ Mol]	
	V	I	V	I	V	I	V	I	V	I	V	I
Salina Silva	-	66	-	27°	0,41	10,93	0,22	0,82	177,6	0,23	2,07	21,4
Salina Mossoró	-	120	-	27°	0,53	0,76	0,45	0,74	72,79	0,43	3,3	24,1
Salina Sal Cisne	-	150	-	27°	0,58	0,48	0,49	0,45	34,88	1,46	5,21	6,23
Salina Monte Alto	-	96	-	27°	0,6	0,1	0,51	0,16	42,52	1,63	4,47	8,08
Salina Brejo do Espinho	-	78	-	27°	0,24	0,38	0,16	0,16	5,19	1,95	4,91	6,29
Salina Lagoa Vermelha	-	56	-	27°	0,29	0,29	0,08	0,16	1,88	1,13	4,57	4,81
Salina BR	-	54	-	27°	0,24	>lim	0,07	0,94	1,09	0,01	2,47	>lim

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

Previamente, todo o material utilizado foi lavado com detergente SDS (Sulfato de Dodecil Sódico), embebido por 30 min numa solução de hipoclorito de sódio (10%) e autoclavado entre o processamento das amostras. As amostras foram maceradas, separadamente, em nitrogênio líquido com o auxílio de pistilos e pilões de cerâmica. Foram usados aproximadamente 200mg de cada amostra para extração de DNA com o kit *DNeasy PowerSoil* (Qiagen). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% (*GelRed™*, Biotium, Inc.) e a pureza, avaliada através do espectrofotômetro *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific). A quantificação do DNA foi feita através do fluorímetro *Qubit 3.0* (Life Technologies Invitrogen) (WALTER et al, 2021).

4.3 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO

As bibliotecas metagenômicas foram preparadas com o kit de DNA *Nextera XT* (Illumina) e a distribuição de tamanho dos fragmentos gerados foi avaliada através do *2100 Bioanalyzer* (Agilent). A quantificação foi realizada pelo sistema *7500 PCR Real-Time* (Applied Biosystems) com a utilização do kit

KAPA Library Quantification (Kapa Biosystems) e o sequenciamento de extremidades pareadas (*paired-end* - 2x300pb) foi feito através do *Miseq System (Illumina)*.

4.4 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

A qualidade das sequências geradas – denominadas *reads* - foi avaliada através do software *FASTQC v0.11.2* (ANDREWS, 2010). As sequências passaram por um pré-processamento pelo software *PRINSEQ V0.20.4* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) para remover sequências duplicadas, curtas (<35pb) ou que apresentaram baixa qualidade (*Phred score* < 20).

A montagem das sequências resultantes foi realizada através do software *MIRA* utilizando os parâmetros padrões do programa (CHEVREUX; WETTER, SUHAI, 1998). As sequências já montadas - agora denominadas *contigs* - foram então anotadas via *Metagenome Rapid Annotation using Subsystem Technology (MG-RAST)* com os seguintes parâmetros de corte: *e-value* $\leq 1e^{-5}$, 60% de identidade mínima e comprimento de alinhamento de ≥ 15 pb (MEYER et al, 2008).

As anotações taxonômicas e funcionais e as análises subsequentes seguiram metodologias específicas que serão descritas em cada capítulo. De maneira geral, a anotação taxonômica foi realizada utilizando dois bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*: o *GenBank* e o *Reference Sequence (RefSeq)*. Já para a anotação funcional, foi utilizado o bancos de dados *SEED Subsystem*.

CAPÍTULO 1

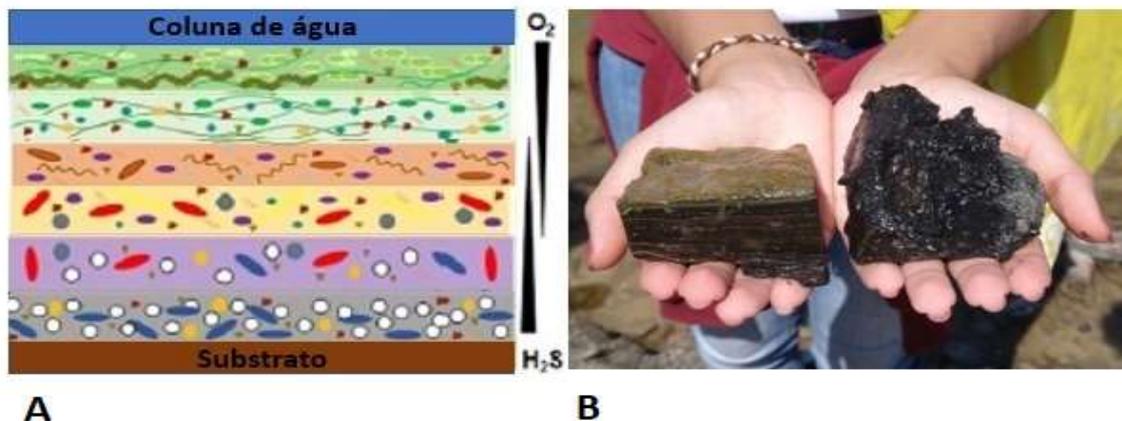
**DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DAS ESTEIRAS
MICROBIANAS DO COMPLEXO LAGUNAR DA LAGOA DE ARARUAMA E
SALINAS PRÓXIMAS**

INTRODUÇÃO

Esteiras microbianas são ecossistemas naturais onde o desenvolvimento dos processos evolutivos microbianos, a diversidade taxonômica/metabólica e a adaptação a diferentes condições ambientais podem ser observadas (WONG; AHMED-COX; BURNS, 2016). Encontram-se presentes em diferentes regiões e em ambientes considerados extremos, como aqueles com alta concentração de sal, radiação, baixo pH e alta pressão (PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018). Com relação a sua composição, destacam-se principalmente bactérias autotróficas/heterotróficas e as arqueas, mas, podem abrigar também eucariotos e vírus (CARREIRA et al., 2020; FRANKS; STOLZ, 2009). Algumas esteiras são conhecidas pelo predomínio de cianobactérias (STOLZ, 2000), entretanto, esteiras de ambientes hipersalinos podem possuir outros tipos de dominância, como a de fototróficos anoxigênicos (STAL; BOLHUIS; CRETOIU, 2017).

As esteiras microbianas possuem diferentes grupos funcionais que se organizam de forma verticalmente estratificada (Figura 1) (SEVERIN; STAL, 2010). Essa estratificação é muitas vezes visível a olho nu e trata-se de uma resposta dos microrganismos às exigências fisiológicas como a disponibilidade de luz, oxigênio (O_2), potencial redox, sulfeto e pH (GUÉZENNEC et al., 2011). Normalmente, começa por uma camada superior oxigênica exposta à luz, onde é possível encontrar microalgas e cianobactérias, seguida de uma zona anóxica, onde microrganismos heterotróficos utilizam nitrato, sulfato e o CO_2 como aceptores finais de elétrons para gerar produtos reduzidos. No fundo de algumas dessas estruturas, podem ser encontradas camadas mais escuras em tons de preto e cinza, resultantes da redução de sulfato (CARREIRA et al., 2020).

Figura 1. (A) Distribuição de microrganismos nas esteiras microbianas de acordo com suas exigências fisiológicas. (B) Visualização a olho nu da estratificação de esteiras microbianas encontradas na Lagoa Vermelha, Região dos Lagos – RJ



Fonte: Adaptado de PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018 e GEOPARQUE COSTÕES E LAGUNAS DO RIO DE JANEIRO, 2023

Do ponto de vista morfológico, as esteiras microbianas podem ser do tipo tufo, coliforme, lisa, poligonal, pustular, entre outras (Figura 2) (DAMAZIO; SILVA E SILVA, 2006; ROCHA; BORGHI, 2018; SILVA et al., 2013). O trabalho de SAMPAIO; DAL' BÓ; BORGHI, 2015 caracterizou as estruturas sedimentares presentes na Lagoa Vermelha (Região dos Lagos - RJ) e como resultado, 11 tipos diferentes de estruturas formadas por influência de microrganismos foram identificadas, como por exemplo, as estruturas laminadas, as gretas de dessecação, os estromatólitos e outras. Este trabalho permitiu uma melhor compreensão sobre a morfologia dessas formações sedimentares, visto que, até o momento, a maioria dos estudos referentes às esteiras microbianas da Região do Lagos têm como foco as cianobactérias.

Através da abordagem metagenômica, este capítulo vem apresentar e discutir dados referentes à diversidade taxonômica e funcional de esteiras microbianas coletadas na Região dos Lagos, considerando o potencial biotecnológico dos principais grupos identificados.

Figura 2. Tipos de estruturas de esteiras microbianas que podem ser encontradas na Lagoa de Pitanguinha - Região dos Lagos, RJ – Brasil. Elas podem ser do tipo (A) Coloforme; (B) Poligonal e (C) Pustular



Fonte: Adaptado de ROCHA; BORGHI, 2018

METODOLOGIA

Os métodos de coleta das esteiras microbianas, extração de DNA, sequenciamento e montagem das sequências foram descritos na seção de Metodologia Geral. Para as análises abordadas no presente capítulo, os contigs gerados foram anotados via *MG-RAST* com os seguintes parâmetros de corte: $e\text{-value} \leq 1e^{-5}$, 60% de identidade mínima e comprimento de alinhamento de $\geq 15\text{pb}$. Para a anotação taxonômica, foram utilizados o banco de dados *GenBank* e o *RefSeq* e para a anotação funcional, o banco de dados *SEED*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Após o sequenciamento das amostras, foram gerados 12,69 milhões de *reads*. Todos os *reads* passaram por um controle de qualidade e após isso, as sequências foram montadas. Os *contigs* gerados, foram utilizados para realizar as anotações taxonômicas e funcionais via *MG-RAST* (Tabela 1).

Tabela 1. Características do sequenciamento e processamento das sequências que foram utilizadas para as análises taxonômicas e funcionais via *MG-RAST* (V- verão; I - inverno)

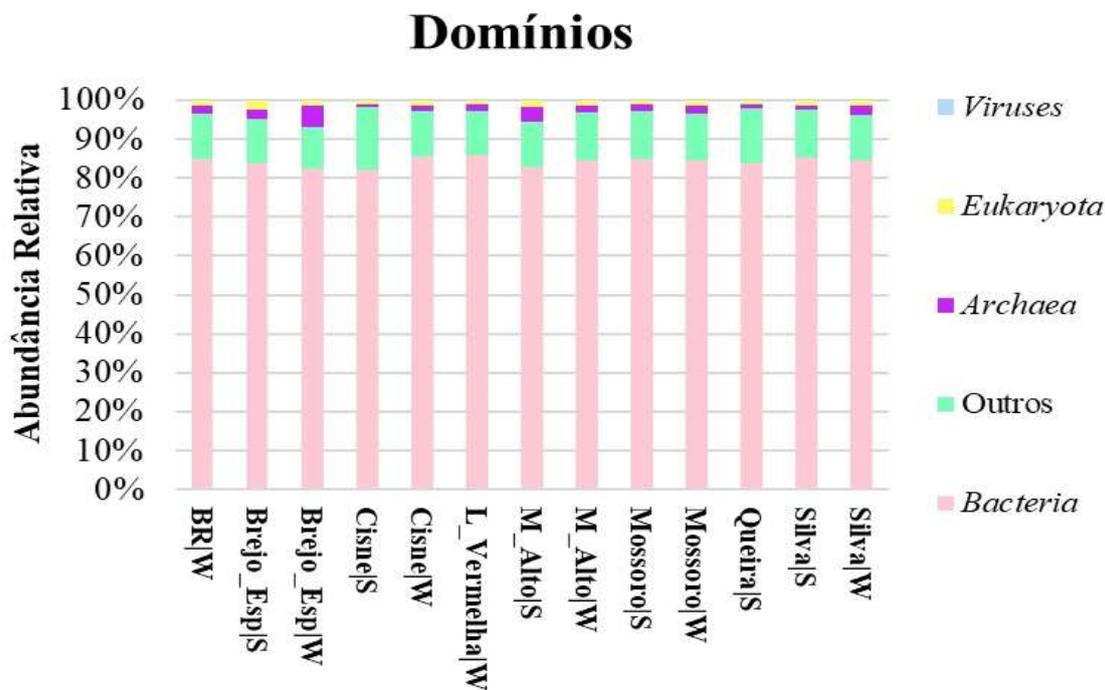
<i>Metagenoma</i>	<i>Nº de sequências</i>	<i>Nº de sequências após controle de qualidade</i>	<i>Nº de sequências montadas</i>
Brejo do Espinho V	653.686	578.239	192.530
Brejo do Espinho I	1.176.295	945.015	377.975
Monte Alto V	1.396.511	1.204.019	636.979
Monte Alto I	1.231.528	1.110.004	380.659
Mossoró V	317.239	300.523	167.792
Mossoró I	892.599	797.471	418.036
Sal Cisne V	1.961.966	1.856.780	1.140.943
Sal Cisne I	155.276	153.231	36.860
Silva V	678.359	644.104	289.430
Silva I	1.054.328	957.287	399.736
Queira V	1.404.748	1.284.214	486.043
BR I	1.281.029	1.231.445	649.467
Lagoa Vermelha I	487.728	424.905	223.730

Fonte: Adaptado de WALTER et al, 2021

2. ANÁLISES TAXONÔMICAS E POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS

Ao analisar a abundância relativa nas anotações taxonômicas, em todos os locais de coleta houve o predomínio do domínio *Bacteria* (22,67% - 0,35%), seguido por *Arqueas* (0,38% - 0,01%), *Eucariotos* (0,30% - 0,01%) e *Vírus* (0,01% - 0%) (Figura 3). Essa observação condiz com estudos que apontam esses domínios como os principais formadores das esteiras microbianas em ambientes hipersalinos (MAZA-MÁRQUEZ; LEE; BEBOUT, 2022). É importante esclarecer que o percentual de “Outros” na tabela, refere-se as sequências não classificadas e não atribuídas a nenhum grupo taxonômico.

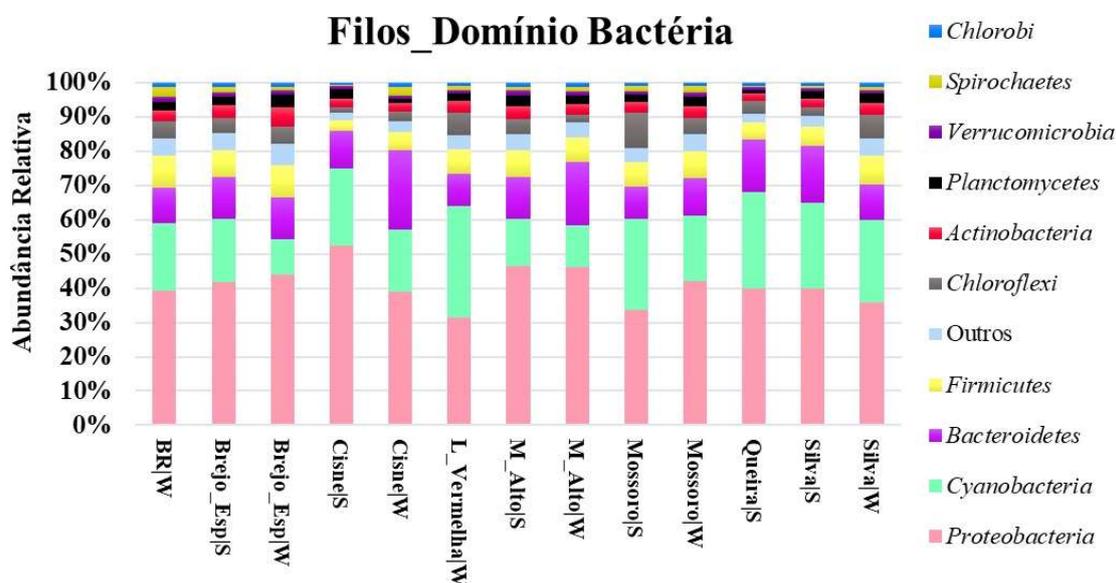
Figura 3. Abundância relativa referente aos principais Domínios presentes em esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos, em duas estações (S - *summer* e W - *winter*) no ano de 2013



2.1 DOMÍNIO BACTÉRIA

Em relação ao domínio *Bacteria* (Figura 4), foram identificados 28 filos, com predominância de *Proteobacteria* (44,02%) e *Cyanobacteria* (20,83%), que juntas correspondem a mais de 60% do valor total de sequências. Com exceção da Lagoa Vermelha, em que ocorre o predomínio de cianobactérias, em todos os locais é possível constatar a dominância de proteobactérias. Os filos *Bacteroidetes* (12,33%), *Firmicutes* (6,36%) e *Chloroflexi* (3,77%) também foram detectados no material de estudo e são comumente encontrados e avaliados em esteiras microbianas (BERLANGA; PALAU; GUERRERO, 2022; URIBE-LORÍO et al., 2019). Já na categoria “Outros”, estão agrupados filos que representam < 1% das sequências totais.

Figura 4. Abundância relativa referente aos principais filos bacterianos presentes em esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos, em duas estações (S - *summer* e W - *winter*) no ano de 2013



As esteiras microbianas podem variar em relação à sua composição e dominância. É comum encontrar esteiras dominadas por cianobactérias, principalmente as que possuem caráter fototrófico e alta produção de EPS, porém, este tipo de perfil não é uma regra. Existem trabalhos na literatura que demonstram esteiras dominadas por proteobactérias, chloroflexi e bacteroidetes. Essa diferença no perfil de dominância está atrelada às diferentes condições ambientais às quais as esteiras são expostas, como por exemplo, salinidade (REID et al., 2003; STUART et al., 2016; WONG; AHMED-COX; BURNS, 2016). WALTER et al., 2021 comparou as esteiras microbianas dos mesmos locais utilizados neste estudo com outros 11 locais em diferentes partes do mundo e, mesmo com a similaridade entre as estruturas, a composição bacteriana diferiu, sendo as cianobactérias as maiores responsáveis por essa variação. Metagenomas de esteiras microbianas de ambientes hipersalinos localizados no México, relacionados principalmente a Guerrero Negro e Cuatro Ciénegas, foram os que apresentaram maior semelhança com os dados apresentados neste estudo.

É interessante ter a percepção de que são poucos os trabalhos presentes na literatura que utilizam a abordagem metagenômica para estudos na região e, principalmente, os relacionados às esteiras microbianas (WALTER

et al., 2021). Logo, este trabalho pode contribuir de maneira relevante para o entendimento e aplicação dos principais e mais abundantes microrganismos presentes nesta estrutura. Serão apresentadas, a seguir, as possíveis aplicações biotecnológicas relacionadas aos filos mais abundantes presentes nas amostras para o domínio *Bacteria*.

2.1.1 Filo *Proteobacteria*

É o mais abundante entre as amostras e o que possui bactérias com a maior diversidade fisiológica, capaz de abranger todas as formas conhecidas de metabolismo microbiano. Nesse filo encontramos bactérias anaeróbias, microaerófilas e aeróbias facultativas, além das bactérias fototróficas anoxigênicas (MADIGAN et al, 2016). Devido à estratificação presente nas esteiras, a distribuição dos microrganismos ao longo de suas camadas está associada à presença de luz, oxigênio e sulfeto de hidrogênio (H₂S) e sua estruturação fica sob efeito da formação de diferentes gradientes químicos (PRIETO-BARAJAS; VALENCIA-CANTERO; SANTOYO, 2018). Logo, com exceção da primeira camada que comumente é dominada por cianobactérias, as proteobactérias podem ser encontradas ao longo de toda a estrutura devido à sua versatilidade fisiológica.

Considerando a abundância deste filo nas amostras e a ausência de estudos relacionados ao seu potencial biotecnológico na Região do Lagos, é pertinente realizar um levantamento sobre este tópico associado a seus gêneros e classes mais abundantes. Das 6 classes que formam o filo, destacam-se entre as sequências mais abundantes nas amostras α (alfa) - proteobactéria, γ (gamma) - proteobactéria e δ (delta) - proteobactéria, respectivamente. Juntas, elas correspondem a mais de 90% do total das sequências. Devido à grande quantidade de gêneros identificados, os cinco mais abundantes relacionados às três classes mais representativas citadas acima, foram investigados em busca de potenciais biotecnológicos (Tabela 2).

Tabela 2. Proteobactérias mais abundantes nas amostras de acordo com sua classe/gênero e suas aplicações biotecnológicas descritas na literatura.

Classe	Gênero	Aplicações	Referência
α-proteobactéria	<i>Ruegeria</i> sp.	Biorremediação Antimicrobiano	Ganesh Kumar et al. (2014) Gram et al. (2010)
	<i>Roseobacter</i> sp.	Antimicrobiano Biorremediação	Cude et al. (2012) Barboza et al. (2016)
	<i>Rhodobacter</i> sp.	Biopolímero (PHA) Biorremediação Bioenergia	Ciesielski (2010) Oberoi et al. (2015) Tiang et al. (2020)
	<i>Jannaschia</i> sp.	-	-
	<i>Dinoroseobacter</i> sp.	Biopolímero (PHB)	Xiao et al. (2015)
γ-proteobactéria	<i>Allochromatium</i> sp.	Tratamento de águas residuais Biopolímero (PHA)	Hülßen et al. (2019) Singh et al. (2018)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Biopolímero (PHA) Biorremediação Biofloculação	Ciesielski (2010) Hussein (2004) Azzam et al. (2015)
	<i>Congregibacter</i> sp.	-	-
	<i>Unclassified</i>	-	-
	<i>Nitrosococcus</i> sp.	Tratamento de águas residuais	Cui et al. (2016)
δ-proteobactéria	<i>Desulfovibrio</i> sp.	Biorremediação Nanopartículas	Shin et al. (2019) Capeness et al. (2015)
	<i>Geobacter</i> sp.	Tratamento de águas residuais Biorremediação Eleto biossíntese	Yamamura et al. (2021) Pous et al. (2018) Shi et al. (2019)
	<i>Desulfatibacillum</i> sp.	Biorremediação	Wang et al. (2021) Abbasian et al. (2016)
	<i>Syntrophobacter</i> sp.	Biorremediação Tratamento de águas residuais	Shigematsu et al. (2006) Janssen et al. (2009)
	<i>Desulfococcus</i> sp.	Biopolímero (PHA) Biorremediação	Hai et al. (2004) Schink et al. (2000)

A maioria dos gêneros destacados possuem aplicações biotecnológicas que vem sendo foco de estudos, com exceção dos gêneros *Jannaschia* sp. e *Congregibacter* sp., que ainda são pouco explorados por este viés. Outra consideração importante é o fato de sequências não identificadas (*unclassified derived from Gammaproteobacteria*) encontrar-se entre os cinco gêneros mais abundantes da classe γ -proteobactéria. Isso nos mostra o quão limitado podem ser os bancos de dados ao classificar as sequências depositadas.

O trabalho de TIMMERMANS; PAUDEL; ROSS, 2017 descreveu o potencial biomédico de proteobactérias através da descoberta de novas biomoléculas com atividades antineoplásica, antiviral, antimicrobiana, imunossupressora e neuroprotetoras para doença de Alzheimer. São vários os gêneros citados no trabalho, sendo alguns deles identificados nas amostras, porém, em baixa abundância. Destaca-se o gênero *Roseobacter sp.* capaz de produzir ácido tropoditiético, um composto com atividade antimicrobiana, usado como agente de biocontrole na aquicultura e com potencial aplicação contra células neoplásicas. Já WATANABE, 2001 e WANG et al, 2021 relatam a relevância das proteobactérias na biorremediação de diferentes compostos químicos, destacando principalmente os gêneros *Pseudomonas sp.*, *Geobacter sp.* e *Desulfatibacillum sp.* identificados nas amostras. Além disso, o trabalho de MAMLOUK; GULLO, 2013 demonstrou a aplicação de proteobactérias na indústria para conversão de etanol em ácido acético - utilizado na produção de vinagre, porém, os gêneros relatados no artigo ocorrem em baixa abundância nas amostras analisadas.

Na Região dos Lagos, o que vem sendo documentado relacionado às proteobactérias são estudos com bactérias magnetostáticas. Essas bactérias possuem estruturas denominadas magnetossomos, que contém em seu interior minerais de ferro sintetizados pela própria bactéria que permitem sua movimentação de acordo com o campo magnético local (KEIM et al., 2007; MARTINS; SILVEIRA, 2009). Os magnetossomos vem sendo explorados com possível viés biotecnológico, uma vez que, as partículas magnéticas podem ser ancoradas a proteínas, moléculas, células, vírus ou genes de interesse e depois passar por um processo de separação através de campo magnético externo. Logo, vem sendo utilizados para aplicações biomédicas, como em biosensores e na biorremediação de metais pesados (ARAUJO et al., 2015; GAREEV et al., 2021; YAN et al., 2012).

2.1.2 Filo Cyanobacteria

Foram identificados 65 gêneros de cianobactérias nas amostras. Os gêneros *Coleofasciculus sp.*, *Cyanothece sp.*, *Nostoc sp.*, *Synechococcus sp.* e *Anabaena sp.* correspondem juntos a mais de 60% das sequências totais

relacionadas a este filo nas esteiras microbianas analisadas. Considerando a grande quantidade de gêneros identificados, as esteiras microbianas possuem um grande potencial para a bioprospecção biotecnológica de cianobactérias (Tabela 3).

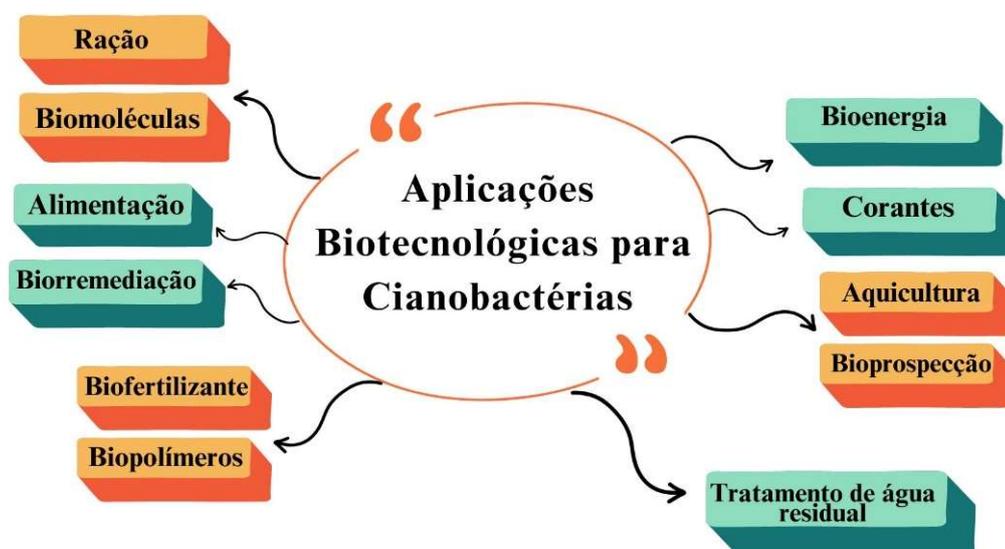
Tabela 3. Gêneros mais abundantes de cianobactérias presente nas amostras e suas aplicações biotecnológicas descritas na literatura.

Gênero	Aplicações	Referência
<i>Coleofasciculus sp.</i>	Antimicrobiano Antiincrustação Biofloculação	Sudha et al. (2013) Almeida et al. (2015) Parwani et al. (2021)
<i>Cyanothece sp.</i>	Antineoplásico Biolubrificante	El Semary e Fouda (2015) Borah et al. (2018)
<i>Nostoc sp.</i>	Antiincrustação Biofertilizante Antineoplásico Biorremediação Alimentação	Fusetani (2011) Zahra et al. (2020) Han et al. (2013)
<i>Synechococcus sp.</i>	Tratamento de águas residuais Biopolímero (PHB) Antimicrobiano	Srimongkol et al. (2019) Nishioka et al. (2002) Do Amaral et al. (2020)
<i>Anabaena sp.</i>	Biofertilizante Biocombustível Tratamento de águas residuais Biofloculação	González López et al. (2009) Clares et al. (2015) Garlapati et al. (2019)

O potencial biotecnológico das cianobactérias vem aos poucos sendo descoberto. Sua capacidade de crescer em diferentes habitats, inclusive extremos, permitiu o desenvolvimento de adaptações e mecanismos de defesa contra diversos estressores (Figura 5) (GREWE; PULZ, 2012). KUMAR et al., 2019 e ŚLIŻEWSKA; ŻYMAŃCZYK-DUDA, 2021 relataram as diferentes aplicações biotecnológicas relacionadas a este filo. Nestes trabalhos, os gêneros apresentados na Tabela 4 são descritos por seus potenciais na produção de antimicrobianos, enzimas de interesse industrial, biorremediação,

biofertilizantes, produção de toxinas, biocombustível, produção de alimentos, bioplásticos e produção de EPS para uso médico e industrial. Logo, os gêneros mais abundantes identificados nas amostras, possuem diferentes aplicabilidades dentro da biotecnologia. KATAYAMA; IJIMA; OSANAI, 2018 publicaram uma revisão sobre a capacidade de cianobactérias, como algumas espécies encontradas no gênero *Synechococcus sp.*, de produzirem biopolímeros como polihidroxibutirato (PHB) através de diferentes tipos de substratos e manipulação genética. Considerando que o uso excessivo de plástico é um dos grandes problemas ambientais atualmente, a identificação de cianobactérias produtoras de bioplástico torna a discussão relevante e atual, visto que, elas possuem características vantajosas para produção em escala industrial.

Figura 5. Potenciais aplicações biotecnológicas para cianobactérias descritas na literatura



Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2019

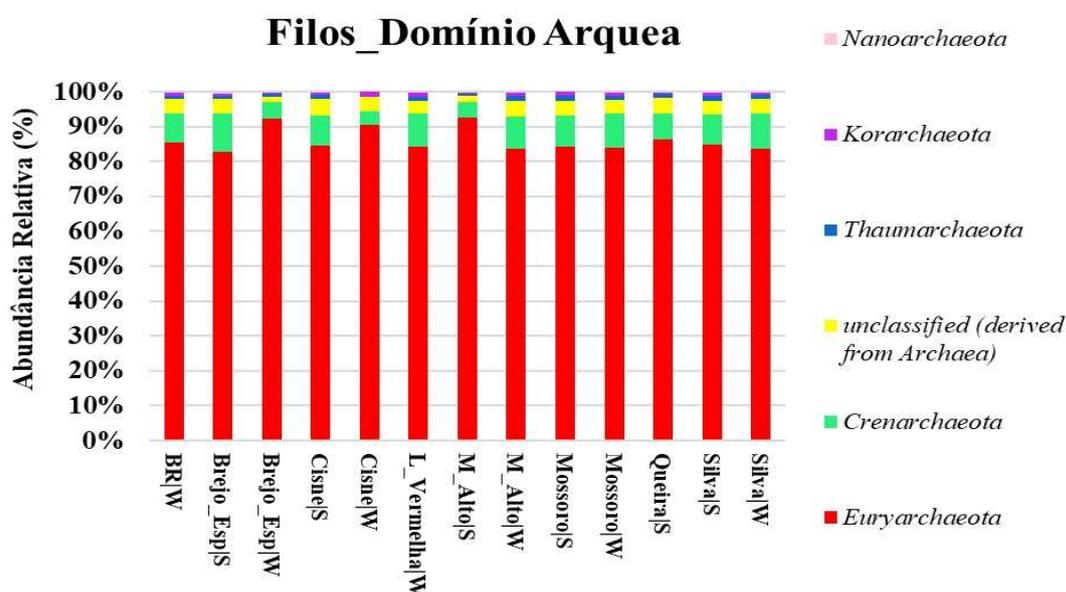
As cianobactérias associadas às esteiras microbianas da Região dos Lagos são frequentemente alvo de estudos, principalmente ecológicos e sedimentares (DAMAZIO; SILVA E SILVA, 2006; DAMAZIO; SENRA, 2005; FEDER et al., 2013; IESPA; IESPA, 2009; RAMOS et al., 2017; SILVA E SILVA; DAMAZIO-IESPA; IESPA, 2007). LOPES et al, 2020 descreveu o potencial antineoplásico de cianobactérias do gênero *Oscillatoria sp* e

Phormidium sp presentes na Região dos Lagos, porém, os trabalhos que exploram o potencial biotecnológico das cianobactérias nesta região ainda são escassos. Com relação à análise dos demais domínios, considerando o ponto de vista biotecnológico e as interações que ocorrem dentro das esteiras microbianas, os Domínios *Arquea* e *Vírus* serão explorados com maiores detalhes.

2.2 DOMÍNIO ARQUEA

Ao analisar o domínio *Arquea*, 6 filios foram identificados sendo o *Euryarchaeota* o mais abundante (19,33% - 0,27%), correspondendo sozinho a mais de 80% do total das sequências (Figura 6). Além disso, dos 78 gêneros identificados, os cinco mais abundantes pertencem a este filo.

Figura 6. Abundância relativa dos filios de arqueas presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos, em duas estações (S - summer e W- winter) do ano de 2013



No filo *Euryarchaeota* encontram-se os microrganismos mais diversos fisiologicamente e os mais adaptados a uma diversidade de ambientes extremos, como aqueles com diferentes temperaturas, pH e concentrações de sal (CASTRO-FERNÁNDEZ et al, 2017). Destacam-se as arqueas metanogênicas e halofílicas, comumente isoladas de ambientes extremos e sedimentos marinhos (HUBER, 2006). Por este motivo, as arqueas são alvo para a bioprospecção de novas espécies, enzimas e outras moléculas que

possam sofrer pouca ou nenhuma variação ao longo de um processo industrial, visto que, o mesmo demanda condições especiais que nem todo microrganismo consegue suportar.

Com base nos gêneros mais abundantes identificados nas amostras, foi realizada uma busca por potenciais aplicações biotecnológicas presentes na literatura (Tabela 4). Dentre os trabalhos, o de CARR; BUAN, 2022 relata o potencial de microrganismos metanogênicos, incluindo o gênero *Methanosarcina sp.* para aplicações na área médica através da produção de biomoléculas e lipídeos. Já KARRAY et al., 2021 e BEN ABDALLAH; SAYADI; KARRAY, 2023 destacam o gênero *Haloarcula sp.* como um promissor produtor de PHB, considerando seu metabolismo acerca da utilização de fontes de carbonos baratas e renováveis. Além disso, a revisão de MOOPANTAKATH et al., 2023 relata a diversidade de biomoléculas produzidas por arqueas e cita entre suas aplicações a biorremediação, o tratamento de águas residuais, o uso de carotenoides com atividade antimicrobiana, antineoplásicos e antioxidantes, a biodegradação de polímeros e a produção de nanopartículas de prata, sendo algumas delas atreladas aos gêneros *Haloarcula sp.* e *Halogeometricum sp.*

Com relação ao estudo deste domínio na Região dos Lagos, SALLOTO et al., 2012 revisou a biologia das arqueas halofílicas presentes na Lagoa Vermelha, um dos locais utilizados para amostragem de esteiras microbianas neste estudo. O trabalho avaliou as aplicações e o potencial biotecnológico do domínio Arquea que vai desde estabilização de processos industriais, produção de bioplástico, uso na indústria farmacêutica e cosmética, na indústria alimentícia até seus potenciais usos clínicos, como adjuvante de vacinas.

Tabela 4. Gêneros mais abundantes do Domínio *Arquea* presentes nas amostras e suas aplicações biotecnológicas descritas na literatura.

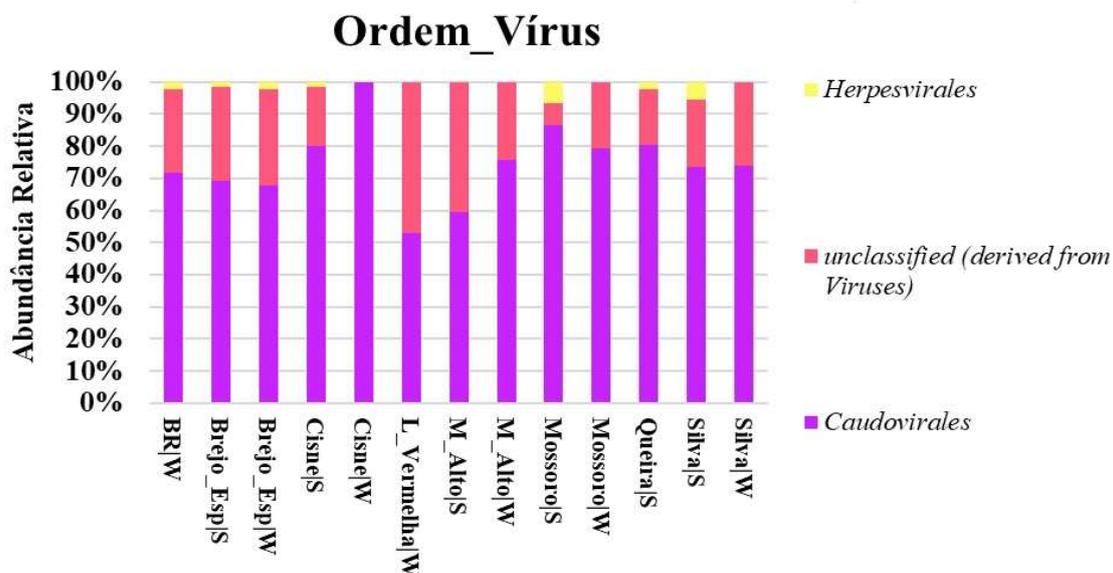
Gênero	Aplicações	Referência
<i>Methanosarcina sp.</i>	Biodigestão Biofertilizante Biorremediação	Ziganshina et al. (2014) Toumi et al. (2015) Chang et al. (2006)
<i>Thermococcus sp.</i>	Engenharia genética Biomoléculas Biologia Molecular	Sinha et al. (2016) Dumina et al. (2021) Shi et al. (2023)
<i>Haloarcula sp.</i>	Biomoléculas Biopolímero (PHA) Biosurfactante Biocombustível	Siroosi et al. (2020) Poli et al. (2011) Kebbouche-Gana et al (2009) Li e Yu (2014)
<i>Pyrococcus sp.</i>	Biomoléculas Biodegradação	Cabrera et al. (2018) Amin et al. (2021) Kanoksilapatham et al. (2017)
<i>Halogeometricum sp.</i>	Nanopartícula Biopolímero (PHA) Pigmentos	Abdollahnia et al. (2020) Salgaonkar et al. (2017) Sahli et al. (2022)

2.3 DOMÍNIO VÍRUS

A ordem *Caudovirales* apresentou abundância de 73,27% do total de sequências referente às ordens identificadas para vírus (Figura 7). Sua interação e importância dentro das esteiras microbianas vem sendo desvendada, inclusive na região de estudo. O trabalho de PENNAFIRME et al., 2019 caracteriza esteiras microbianas e partículas virais encontradas na Lagoa Vermelha através de associações entre a interação de bactérias, vírus e a precipitação de minerais. Os vírus foram identificados através de sua morfologia e classificados de acordo com a ordem, sendo a maioria deles, membros da ordem *Caudovirales* e especificamente de três famílias: *Myoviridae*, *Podoviridae* e *Siphoviridae*. PACTON et al., 2014, também utilizou amostras de esteiras microbianas da Lagoa Vermelha para demonstrar o potencial dos vírus na precipitação de minerais, porém em sua metodologia além da metagenômica, também utilizou a microscopia. Seus achados incluem, principalmente vírus de DNA devido ao protocolo utilizado e, majoritariamente a

mesma ordem do estudo anterior, com a diferença de que *Mimiviridae* apareceu de forma relevante. Ambos os trabalhos e os dados apresentados neste estudo, confirmam a abundância de *Caudovirales* não só na Lagoa Vermelha, mais em todos os demais locais de amostragem.

Figura 7. Abundância relativa referente a Ordem Vírus presente nas esteiras microbianas nos locais de coleta de (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - *summer* e W- *winter*), no ano de 2013.



No contexto ambiental, os vírus da ordem *Caudovirales* parecem ter um importante papel na precipitação de minerais em esteiras microbianas, porém, aplicações biotecnológicas de vírus, principalmente os que se encontram em ambientes extremófilos ainda é um assunto pouco explorado. GIL et al., 2021 publicou uma revisão sobre o potencial biotecnológico de vírus encontrados em ambientes extremos oferecendo um panorama geral sobre os tipos encontrados, seus hospedeiros e potenciais aplicações na biologia molecular, nanomedicina e biotecnologia industrial.

A análise por gênero deste domínio é restritiva uma vez que, entre os 5 gêneros mais abundantes, 4 deles são classificados como *unclassified* e correspondem a mais de 50% das sequências totais. Logo, abordagens moleculares como a metagenômica e a utilização de protocolos voltados para o enriquecimento viral das amostras, pode nos levar a gerar novos dados e descobertas envolvendo a biotecnologia e/ou a ecologia desses vírus dentro das esteiras microbianas.

Os vírus *T4-like*, listados entre os mais abundantes representando 19,63% das sequências totais, são bacteriófagos, ou seja, vírus que infectam bactérias. Na literatura, é possível encontrar trabalhos que avaliam seu potencial biotecnológico como alternativa para antimicrobianos (ZHANG et al., 2013); terapia fágica e controle de patógenos (DĄBROWSKA et al., 2014; LIAO et al., 2021); seu papel ecológico na biomineralização (WEI et al., 2021); na transmissão de genes de resistência a antibióticos (ZHANG et al., 2021) e nos ciclos biogeoquímicos (GAZITÚA et al., 2021).

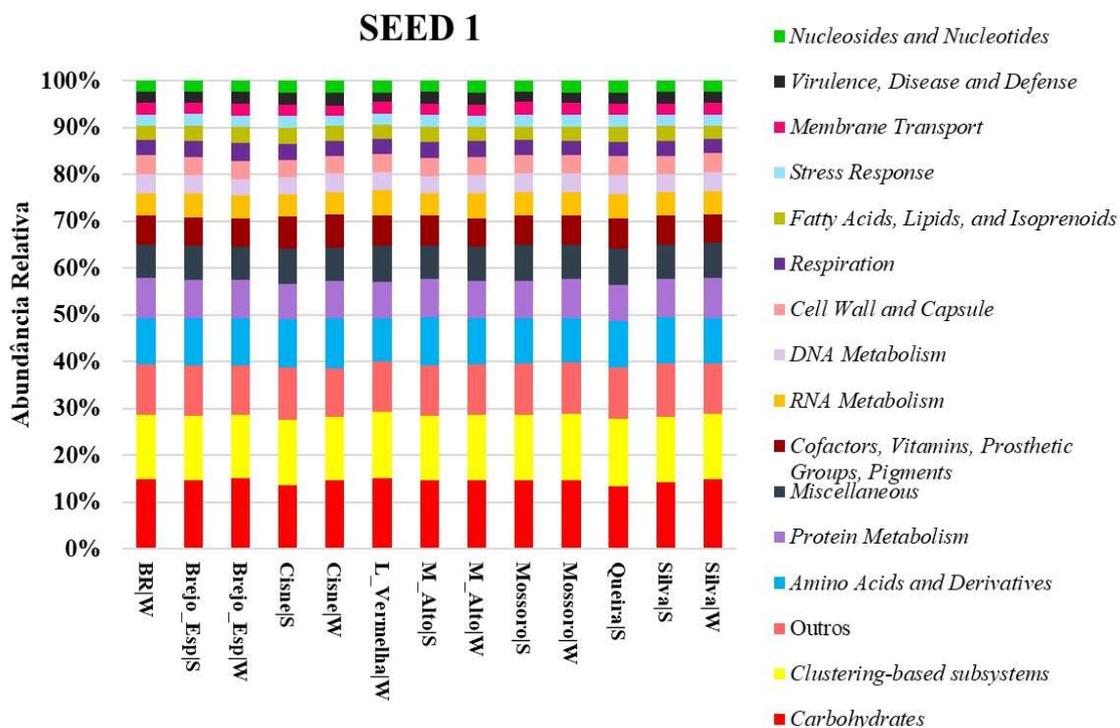
3. ANÁLISE FUNCIONAL DAS ESTEIRAS MICROBIANAS

Com relação a análise funcional das amostras de esteiras microbianas, foram identificados 28 subsistemas (*SEED 1*) relacionados a processos metabólicos. Para facilitar a compreensão, as anotações funcionais são feitas agrupando os metabolismos de forma hierárquica, partindo do processo metabólico (*SEED 1*) à via metabólica (*SEED 3*).

3.1 *SEED 1*

Entre os processos metabólicos mais abundantes no *SEED 1* para a microbiota estudada destacam-se os relacionados a Carboidratos (14,31%), Aminoácidos (10%) e Proteínas (7,95%). Eles apresentam vias essenciais para a sobrevivência e o desenvolvimento dos microrganismos e estão envolvidos principalmente em processos nutricionais, de biossíntese, de degradação e de fixação de compostos que fazem a maquinaria celular funcionar. Os perfis *Clustering-Based Subsystem* (13,95%), Outros (10,99%) e *Miscellaneous* (7,44%) também se encontram entre os perfis mais abundantes, porém, agrupam metabolismos diversos em um mesmo subsistema. Em *Clustering-Based Subsystem* são agrupados genes semelhantes com funções desconhecidas, logo, eles não podem ser atribuídos a perfis mais específicos (HU et al., 2010), enquanto em *Miscellaneous* estão sequências identificadas, porém não classificadas. Já a categoria “Outros”, corresponde ao agrupamento de perfis metabólicos que representam menos de 2% das sequências totais, incluindo a fotossíntese que corresponde a 0,31% (Figura 8).

Figura 8. Abundância relativa referente ao SEED 1 para os processos metabólicos de esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - summer e W - winter), no ano de 2013



Normalmente, uma esteira microbiana é composta por metabolismos-chaves derivados de microrganismos como os fototróficos oxigênicos, os fixadores de nitrogênio, os fototróficos anoxigênicos, os redutores de sulfato, os oxidantes de sulfeto, os metanogênicos e os fermentadores (VISSCHER; STOLZ, 2005). É relatado que a principal fonte de energia e nutrição das esteiras microbianas é a fotossíntese (AUBÉ et al., 2020). Ao analisar os principais metabolismos presentes nos dados referentes às amostras, a fotossíntese não se enquadra entre os mais abundantes, porém, isto não diminui sua importância como fonte de energia para as esteiras microbianas. Observando os perfis metabólicos e sua abundância, é possível atribuir a abundância de um perfil heterotrófico, relacionado principalmente a quimiotrofia, frente ao autotrófico. Este resultado, possivelmente, deve-se ao fato de as análises terem envolvido a mistura de camadas das esteiras microbianas, reunindo diferentes zonas metabólicas, desde a superficial onde dominam microrganismos fotossintetizantes, até à mais profunda, que abriga microrganismos anaeróbios estritos.

Como são muitos metabolismos e conseqüentemente muitas vias a se considerar, serão analisados a nível de *SEED* 2 e 3 apenas aquelas com viés biotecnológico ou que apresentam alguma relevância ecológica. WALTER et al., 2021 utilizando a mesma amostragem, realizou em seu trabalho atribuições taxonômicas associadas aos metabolismos de nitrogênio, enxofre e fotossíntese e sua potencial influência na precipitação de carbonato de cálcio nas esteiras microbianas. Também foram feitas atribuições relacionadas ao estresse osmótico devido ao ambiente hipersalino no qual as esteiras microbianas encontram-se inseridas. Dada a versatilidade metabólica presente, análises voltadas para novos potenciais biotecnológicos são de grande interesse.

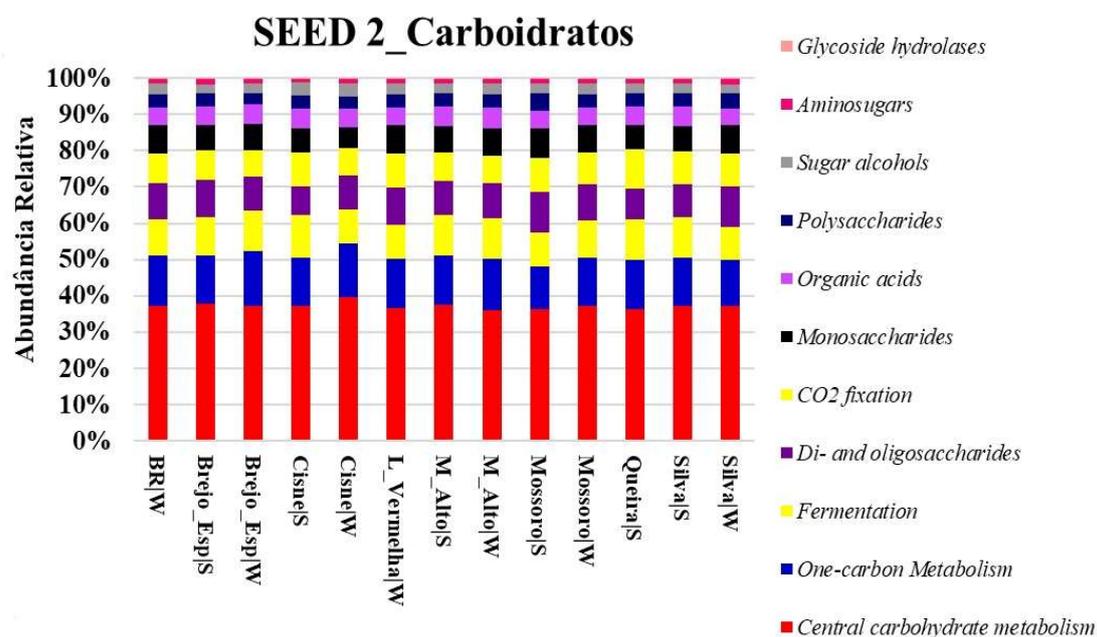
3.2 *SEED* 2

3.2.1 Carboidratos

Analisando os dados através do *SEED* 2 referente aos carboidratos (Figura 9), destaca-se o metabolismo central de carboidratos que corresponde sozinho a mais de 33% das sequências totais. O metabolismo de um carbono e a fermentação, juntos, correspondem a mais de 24% das sequências totais e configuram entre os três metabolismos mais abundantes de carboidratos.

As vias que pertencem ao metabolismo central são responsáveis pela geração e o armazenamento de energia, além da formação de precursores metabólicos que servem como ponto de partida para a biossíntese de constituintes essenciais para os microrganismos (ROMANO; CONWAY, 1996). Logo, dentro os três metabolismos mais abundantes apresentados, a nível de *SEED* 3, serão explorados o metabolismo de um carbono (*one-carbon metabolism*) e da fermentação por possuírem viés para aplicações biotecnológicas.

Figura 9. Abundância relativa referente ao SEED 2 de Carboidratos presentes em esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S- *summer* e W- *winter*), no ano de 2013



O ciclo serina-glioxilato corresponde a 85,46% do total de sequências atribuídas ao **metabolismo de um carbono**. Compostos orgânicos com um átomo de carbono (C1) são usados por bactérias metilotróficas como única fonte de carbono para obtenção de energia em processos biossintéticos (BUT et al., 2019). Para as bactérias metilotróficas obterem o acetil-coA necessário para o ciclo de *Krebs* são utilizadas vias alternativas, como a via da serina. Nesta via, a partir da formação da serina ocorre uma série de reações levando à formação final de acetil-coA e glioxilato, onde a primeira é utilizada em processos biossintéticos através do ciclo do glioxilato e a segunda é transaminada em glicina para fechar o ciclo (SÁ, 2007). A abundância deste metabolismo nas amostras, nos apresenta parte da flexibilidade metabólica que os microrganismos presentes nas esteiras microbianas podem apresentar.

Como potencial biotecnológico, microrganismos capazes de converter C1 estão sendo foco de estudo para conversão de gases residuais antropogênicos em moléculas de alto valor industrial, como o gás natural e para produção de polihidroxibutirato (PHB) (LEIBETSEDER, 2022; NGUYEN et al., 2022). KOROTKOVA et al., 2022 propõem em seu trabalho, novos intermediários para a regeneração do glioxilato, tornando muitas enzimas desta

via, comuns à via de PHB. Além disso, um grupo de pesquisa na Holanda estuda aplicações deste metabolismo para a produção de blocos de construção químicos (SOUSA, 2023).

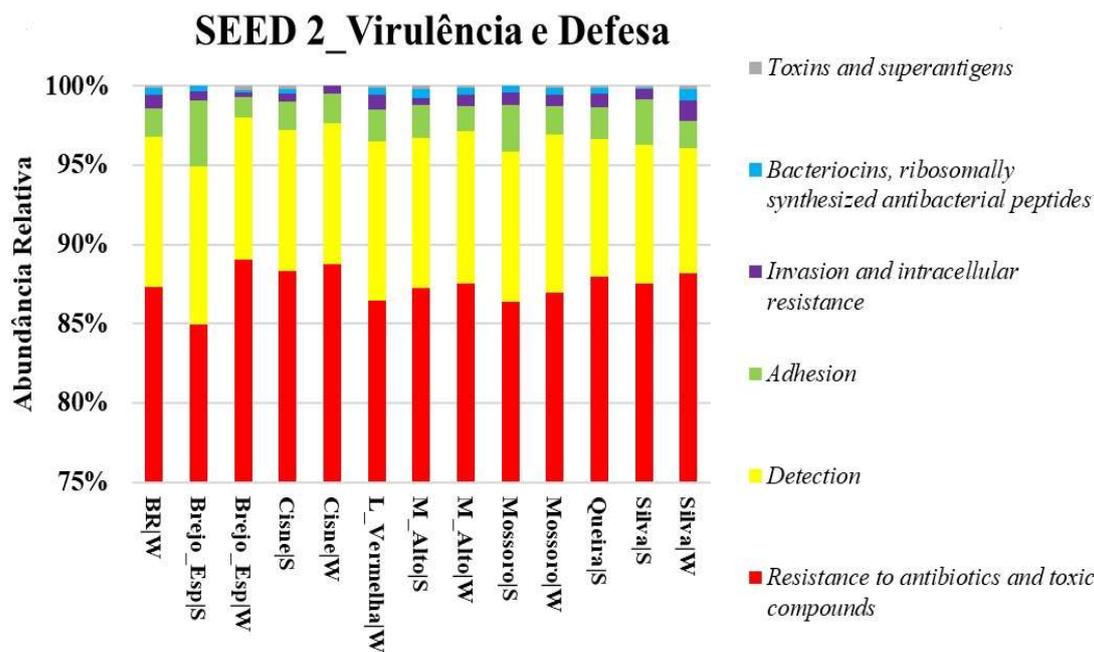
Na **fermentação**, destacam-se as fermentações de Acetyl-CoA a Butirato (26,41%) e a Síntese de Acetona-Butanol-Etanol (20,86%), correspondendo juntas a mais de 47% das sequências totais relacionadas ao metabolismo de carboidratos. Ambas as vias de fermentação estão associadas e são comumente realizadas por espécies do gênero *Clostridium*, podendo gerar produtos como acetato, acetona, butanol, etanol e butirato que possuem interesse da indústria, principalmente a de biocombustível (TASHIRO et al., 2013). Essas vias possuem como precursor a acetyl-CoA, mas possuem enzimas específicas para cada produto final e a “troca” de vias é feita pelas bactérias de acordo com sua necessidade e as condições do meio (MÜLLER, 2001). Devido a esta versatilidade fermentativa e ao interesse econômico que os produtos finais apresentam, o potencial biotecnológico dessas vias vem sendo explorado através de engenharia metabólica para otimizar, melhorar e descobrir novas fontes de açúcar para utilizar microrganismos fermentadores como possíveis fonte de biocombustível e moléculas orgânicas (COOKSLEY et al., 2012; HENSTRA et al., 2007; KATAOKA et al., 2017; LI et al., 2019; SUO et al., 2018). Um fator interessante é que as enzimas acetoacetyl-CoA thiolase e a 3-hydroxybutyryl-CoA desidrogenase além de estarem presentes nestas vias fermentativas, também são parte importante da via de produção de PHA/PHB.

3.2.2 Virulência e Defesa

As principais vias metabólicas associadas a virulência e defesa nas esteiras microbianas se referem à resistência a antibióticos e componentes tóxicos, correspondendo a 77,13% das sequências totais desta categoria (Figura 10). Os fatores de virulência são diferentes produtos, estruturas ou estratégias que alguns microrganismos possuem e que contribuem para aumento da sua capacidade de infectar um organismo (GUASTALLI, 2010). Entre os fatores de virulência destacam-se a adesão, invasão, produção de toxinas e a resistência a antibióticos/componentes tóxicos (WU; WANG; JENNINGS, 2008).

A nível de *SEED* 3 dentro de resistência a antibióticos e componentes tóxicos serão explorados os mais abundantes e os que apresentam maior preocupação médica/ambiental.

Figura 10. Abundância relativa referente ao *SEED* 2 de Virulência e Defesa presentes em esteiras microbianas dos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - summer e W- winter), no ano de 2013.



Dos perfis de resistência encontrados, 16 estão relacionados a **antibióticos**, sendo dois deles encontrados entre os perfis mais abundantes desta categoria. São eles o Complexo Cobalto-Zinco-Cádmio (25,55%), Bombas de Efluxo de Resistência a Múltiplas Drogas (16,33%) e a Resistência a Fluoroquinolonas (16,02%). Mesmo não estando entre os perfis mais abundantes, é importante ressaltar também as Beta-Lactamases (5,49%). Tendo em vista que a maioria dos perfis estão relacionados aos antibióticos, é importante relatar a relevância e a preocupação desses achados. Com relação a análise taxonômica dos perfis de resistência citados, os cinco gêneros mais abundantes são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Gêneros mais abundantes identificados em três perfis de resistência a antibióticos em esteiras microbianas

Resistência	Gênero
Bombas de efluxo a múltiplas drogas	<i>Shewanella</i> sp. <i>Magnetococcus</i> sp. <i>Cyanothece</i> sp. <i>Dinoroseobacter</i> sp. <i>Saccharophagus</i> sp.
Fluoroquinolonas	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Congregibacter</i> sp. <i>Synechocystis</i> sp. <i>Ruegeria</i> sp. <i>Dinoroseobacter</i> sp.
Beta-lactamases	<i>Cyanothece</i> sp. <i>Flavobacterium</i> sp. <i>Robiginitalea</i> sp. <i>Desulfococcus</i> sp. <i>Anabaena</i> sp.

Os antibióticos vêm sendo encontrados como micro contaminantes em diferentes ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo a descarga de efluentes tida como a principal fonte de antibióticos no meio aquático (FERNANDES, 2019). Sua utilização de forma indevida e em excesso tem acelerado o processo de desenvolvimento de bactérias multirresistentes, afetando negativamente a saúde humana e animal e a produção de alimentos (GRENNI; ANCONA; BARRA CARACCILO, 2018; REGEA, 2018). Os mecanismos de resistência são variados e podem ser fruto de mutação ou de elementos genéticos móveis, destacando-se principalmente, os que alteram o sítio-alvo da droga (fluoroquinolona), os que reduzem a permeabilidade da membrana, as bombas de efluxo (resistência a múltiplas drogas) e os que destroem ou modificam o quimioterápico (beta-lactamase) (BASTOS, 2007). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista de patógenos prioritários para o desenvolvimento de medidas e pesquisas para descoberta de novos antibióticos e, dos doze patógenos alertados, cinco são resistentes a antibióticos do grupo de beta-lactâmicos e três aos de fluoroquinolonas (WHO, 2017). Nas análises, foram identificadas em todos os locais de coleta a presença de ambas as resistências que são motivo de preocupação para a OMS.

CORRÊA et al., 2019 consta como o primeiro estudo realizado na Lagoa de Araruama visando a pesquisa de microrganismos susceptíveis a antibióticos. Dos microrganismos isolados, foram identificadas bactérias dos gêneros *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Cryseobacterium* sp., *Sphigomonas* sp., *Micrococcus* sp. e *Vibrio* sp., resistentes a 9 dos 28 antibióticos testados no estudo tendo, algumas delas apresentado múltiplos perfis de resistência a diferentes classes de antibióticos, entre eles, os beta-lactâmicos e as fluoroquinolonas. Com relação as análises realizadas, é importante ressaltar que nenhum dos gêneros identificados neste estudo é citado no trabalho acima. Dois gêneros de cianobactérias se encontram entre os mais abundantes, sendo eles *Cyanothece* sp. e *Anabaena* sp e alguns estudos já vem apontando a capacidade deste filo de servir como reservatórios de genes de resistência, principalmente em épocas de *bloom* (WANG et al., 2020; ZHANG et al., 2020). No contexto das esteiras microbianas, sabendo da existência dos vírus neste sistema e do importante papel que eles desempenham na troca gênica, é interessante considerar a interação que ocorre entre os microrganismos presentes nessa estrutura. Com isso, o papel ecológico da resistência e como isso afeta as esteiras e o ambiente em que estão inseridas ainda deve ser explorado.

Estudos apontam a introdução de efluentes na Lagoa de Araruama desde 1950, devido principalmente, ao crescimento demográfico em seu entorno (BERTUCCI et al., 2016; LAUT et al., 2019; SCHUINDT; DACO; OLIVEIRA, 2018; PEREIRA, 2004; SOUZA; AZEVEDO, 2020). Considerando que atualmente, mesmo que ocorra um tratamento eficaz dos antibióticos nos efluentes despejados na Lagoa, uma vez que os genes de resistência estejam presentes no meio ambiente, os mesmos podem ser mantidos e disseminados entre as comunidades microbianas que ali se encontram. Logo, estudos que avaliem a concentração de antibióticos no ambiente, a presença de mecanismos de resistência, às dinâmicas de transferências e mutações e o papel dos microrganismos neste contexto, são de extrema importância para o entendimento a nível de saúde pública e ecologia. Estudos sobre a presença de genes de resistência em diferentes meios aquáticos no Estado do Rio de Janeiro, já vem sendo realizados (FERNANDES, 2019; CHAGAS, 2011; BARRUETO, 2018; BRANCO et al., 2021; COUTINHO et al., 2014; DE

ARAUJO et al., 2016; FISTAROL et al., 2015), porém, este assunto é novo quando consideramos a Região dos Lagos e as esteiras microbianas. A Lagoa de Araruama e suas salinas são locais ainda utilizados para uso recreativo e comercial, logo, este assunto aciona um alerta e desperta a necessidade de pesquisas relacionadas à resistência nesta localidade.

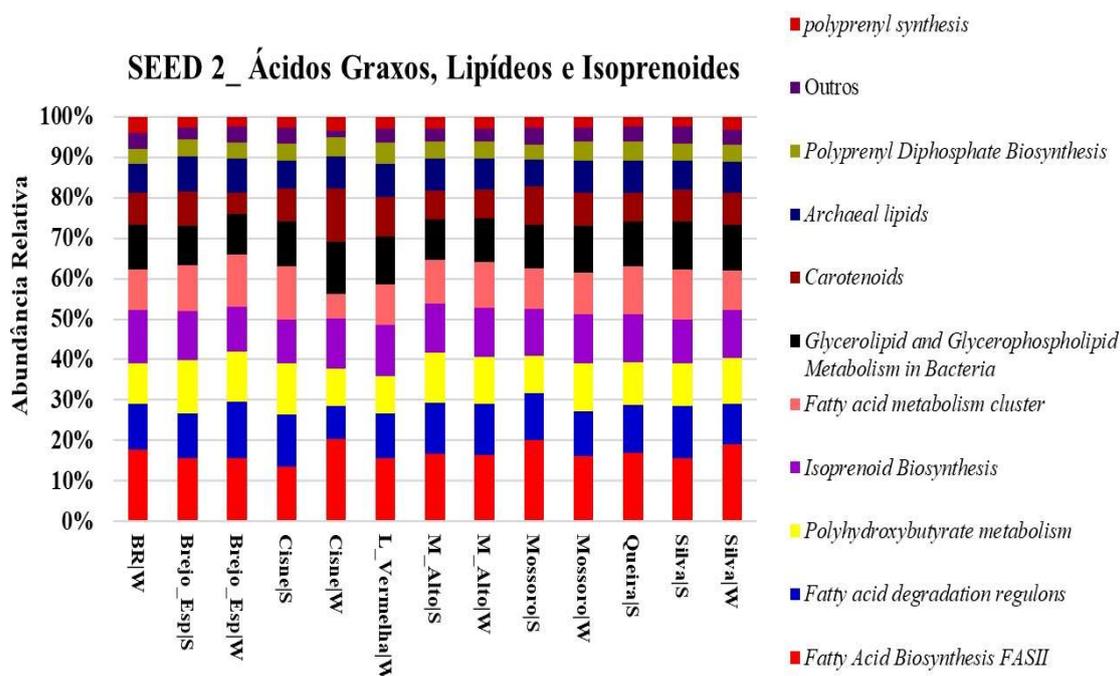
A abundância de genes de resistência ao **complexo cobalto-zinco-cadmio** (25,55%) é interessante, visto que, os metais não estão sujeitos a degradação e encontram-se por mais tempo e em níveis maiores do que os antibióticos no meio ambiente (BAKER-AUSTIN et al., 2006). Estudos sugerem que uma co-seleção de resistência a metais e antimicrobianas auxilia na manutenção dos genes de resistência no ambiente, mesmo na ausência de antimicrobianos (PAL et al., 2015; LI; XIA; ZHANG, 2017). A co-seleção ocorre quando genes de resistência a metais e antibióticos são encontrados juntos na mesma célula ou em um único mecanismo de resistência (PAL et al., 2017). Para além disso, estudos também tem demonstrado que a indução de biofilme pode auxiliar na resistência e tolerância de microrganismos a metais e antimicrobianos (HARRISON; CERI; TURNER, 2007; OLSEN, 2015). Neste contexto, as esteiras microbianas podem servir como modelo de estudo para investigar a dinâmica de transferências gênicas e de permanência desses genes num contexto ambiental/médico.

Do ponto de vista biotecnológico, microrganismos resistentes a metais vêm sendo utilizados para biorremediação de ambientes contaminados por essas moléculas (PRABHAKARAN; ASHRAF; AQMA, 2016; DEFALCO, 2022; FARIAS, 2016; AGUILAR, 2018; BRAVO, 2018). Os estudos na Região dos Lagos sobre poluição por metais estão restritos à presença de mercúrio em lençóis freáticos e na cadeia trófica (SPINOLA, 2004; SILVA, 2006; KUTTER, 2011). Logo, abordagens envolvendo a co-seleção e seu papel na saúde e ecologia são ausentes, assim como, a seleção de microrganismos resistentes a metais para uso na biorremediação.

3.2.3 Ácidos Graxos, Lipídeos e Isoprenoides

Nas análises de dados através do *SEED 2* para Ácidos Graxos, Lipídeos e Isoprenoides (Figura 11), constam entre os metabolismos mais abundantes em relação ao total de sequências desta categoria, a Biossíntese de Ácidos Graxos (FASII) (15,78%), a Degradação de Ácidos Graxos (12,19%) e o Metabolismo de Polihidroxitirato (PHB) (11,71%). Os dois primeiros referem-se a metabolismos comuns dos microrganismos e estão envolvidos na síntese e degradação de ácidos graxos. Entretanto, a via de biossíntese conhecida como FASII tem sido alvo de estudos sobre seu potencial para o desenvolvimento de novos antibióticos. Isto porque, algumas bactérias possuem mecanismos para incorporar ácidos graxos exógenos e com isso, contornar a inibição da FASII (YAO; ROCK, 2017). Por este mecanismo diferir do que está presente em mamíferos, tornou-se uma promissora fonte antimicrobiana (BIBENS et al., 2023). Ao analisar outros potenciais biotecnológicos, o metabolismo mais interessante e estudado é o de polihidroxitirato, que consta entre os mais abundantes e por este motivo será discutido e analisado.

Figura 11. Abundância relativa referente ao *SEED 2* de Ácidos Graxos, Lipídeos e Isoprenoides presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S- summer e W - winter), no ano de 2013.



Dentro do **metabolismo de polihidroxiбутирато**, foi possível identificar a rota sintética para produção de PHB. O Poli-3-Hidroxiбутирато é o produto deste metabolismo e um polímero pertencente à família dos polihidroxiálcanoatos (PHA). Ele possui características físico-químicas que garantem sua semelhança com as propriedades dos plásticos convencionais e tornou-se uma alternativa para a atual produção de bioplástico (NANDA et al., 2022). É a forma mais comum de PHA sintetizado por microrganismos e seu acúmulo ocorre na presença de fatores limitantes, como forma de armazenar carbono e energia através de grânulos intracelulares (SINGH; PARMAR, 2011).

O PHB é comumente sintetizado a partir do acetil-CoA através de três etapas enzimáticas, sendo a PHA sintase a principal enzima envolvida na conversão deste polímero e a PHA despolimerase, a enzima envolvida no seu processo de degradação. Nos metagenomas analisados, consta a presença completa desta rota metabólica, o que nos permite inferir o grande potencial que as esteiras microbianas apresentam para bioprospecção de microrganismos produtores de PHB (Anexos – Material Complementar). A produção de PHB já foi reportada em proteobactérias, bactérias roxas não sulfurosas, cianobactérias, arqueas e fungos (LEE et al., 2021; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ et al., 2019; SAKTHISELVAN; MADHUMATHI, 2019). Esta rota por via marinha vem ganhando destaque por suas vantagens com relação a produção, uma vez que, apresentam menores gastos com fermentação e recuperação do produto, além dos microrganismos produtores sobreviverem a altas concentrações de sal, reduzindo o risco de contaminação (NANDA et al., 2022).

PINTO et al., 2015 fez o sequenciamento completo do genoma da arquea *Haloferax gibbonsii* isolada da Lagoa Vermelha na Região do Lagos e identificou esse microrganismo como potencial produtor de PHA. Na literatura, já existem trabalhos relatando o potencial e a presença desta rota em esteiras microbianas de ambientes hipersalinos (LÓPEZ-CORTÉS; LANZ-LANDÁZURI; GARCÍA-MALDONADO, 2008; MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ et al., 2018), porém, estudos sobre este assunto em nossa região são raros.

Foram descritas diferentes possíveis aplicações de PHB na indústria biomédica, farmacêutica, agrícola e alimentar (LUENGO et al., 2003; KAVITHA; RENGASAMY; INBAKANDAN, 2018). Sua produção a nível

comercial ainda é desvantajosa devido ao alto custo, porém, pesquisas vêm sendo realizadas para buscar novas alternativas para este problema através de fontes renováveis como biomassa, CO₂ e resíduos, além da modificação genética de microrganismos produtores para melhoria na produtividade e qualidade, tornando a produção mais econômica (TISO et al., 2022; NARANJO et al., 2013; STAŚCZAK et al., 2022; SIROHI et al., 2020). Os achados aqui apresentados apontam para o elevado potencial das esteiras microbianas da Região do Lagos como fonte de microrganismos e genes relacionadas a produção de PHA/PHB.

CONCLUSÃO

A abordagem metagenômica, mesmo com suas limitações nos permite conhecer a composição taxonômica e o potencial metabólico de comunidades microbianas complexas. As esteiras microbianas aqui analisadas, possuem um perfil metabólico misto com a presença abundante de microrganismos autotróficos e heterotróficos. Destacam-se metabolismos com alto potencial de aplicações biotecnológicas, como o de polihidroxi butirato e as fermentações, além de apresentarem uma grande diversidade e versatilidade metabólica. Com relação a sua composição taxonômica, destaca-se a dominância de proteobactérias incluindo diversos gêneros para os quais são descritas aplicações biotecnológicas, especialmente nos campos da biorremediação, biomoléculas, bioplástico, tratamento de águas residuais, bioenergia e alimentação.

A análise metagenômica revelou também a presença de genes de resistência a antibióticos e metais, que possuem alta relevância em assuntos relacionados à saúde pública. Nesse contexto, o presente trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento acerca dos microrganismos e genes encontrados no complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas, servindo de base para novos estudos voltados à sua bioprospecção e aplicação biotecnológica.

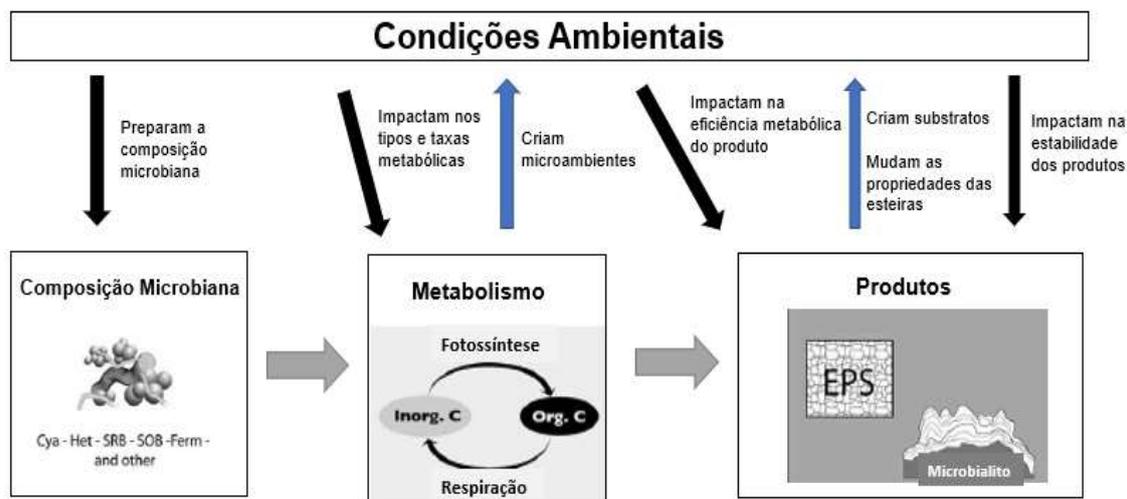
CAPÍTULO 2

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ESTEIRAS MICROBIANAS ASSOCIADO À PRECIPITAÇÃO DE CARBONATO DE CÁLCIO

INTRODUÇÃO

A precipitação de carbonato de cálcio (PCC) é um fenômeno comum em ambientes marinhos, de água doce e ecossistemas terrestres e, faz parte do ciclo global do carbono. A calcita (CaCO_3) e a dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) são os carbonatos mais abundantes encontrados na Terra (JANSSON; NORTHEN, 2010; SÁNCHEZ-ROMÁN et al., 2007). DUPRAZ et al., 2009 usa o termo mineralização biologicamente induzida (MBI) para descrever o processo de precipitação de minerais que resulta das atividades metabólicas microbianas e sua interação com o meio através do aumento do pH, da disponibilidade de CO_2 e da saturação de cátions minerais como o cálcio (Ca^{2+}), por exemplo (Figura 1).

Figura 1. A mineralização biologicamente induzida depende de interações entre microrganismos, seus metabolismos e as condições ambientais



Fonte: Adaptado de DUPRAZ et al., 2009

CASTANIER; MÉTAYER-LEVREL; PERTHUISOT, 2000 relatam que, na natureza, a PCC pode ocorrer como resultado de processos abióticos, através de ambientes saturados ou bióticos, com influência metabólica de eucariotos e procariotos. As esteiras microbianas, por sua grande diversidade de microrganismos, são consideradas locais de transformações elementares, sendo a capacidade metabólica de suas interações maior do que as dos componentes de forma individual (STOLZ, 2000). Não existe um único metabolismo ou via metabólica específica relacionada diretamente à PCC. São as dinâmicas metabólicas que ocorrem dia e noite, juntamente com os fatores

ambientais, que ditam a capacidade de precipitação. Inclusive, é o equilíbrio entre os metabolismos, o sistema precipitação-dissolução de carbonato e as propriedades do EPS que influenciam uma esteira microbiana “macia” a tornar-se um estromatólito, ou seja, na sua capacidade de litificar ou não (WHITE; VISSCHER; BURNS, 2020; VISSCHER; STOLZ, 2005). Essas esteiras são consideradas precursoras dos estromatólitos (Figura 2), estruturas abundantes na Terra entre 3,5 milhões e 500 milhões de anos e que são estudadas como registros fósseis da interação de fatores biológicos e processos geológicos (VISSCHER et al., 1998).

Figura 2. Morfogênese de estromatólitos e a influência biológica e ambiental exercida sobre suas diferentes etapas de crescimento.



Fonte: Adaptado de SUOSAARI; REID; ANDRES, 2019

As bactérias autotróficas e heterotróficas desempenham um importante papel na litificação de esteiras microbianas, destacando-se como principais metabolismos: a fotossíntese oxigênica/anoxigênica; a fixação de CO₂; a metanogênese; a hidrólise de ureia; a redução dissimilatória de nitrato a amônia (DNRA); a desnitrificação; a amonificação de aminoácidos e a redução dissimilatória do sulfato (RDS) (CASTRO-ALONSO et al., 2019; KRAUSE et al., 2018; ZHU; DITTRICH, 2016). As reações redox que ocorrem nessas vias, quando associadas à presença de matéria orgânica, produtos metabólicos finais, pH alcalino, EPS, supersaturação de carbonato-bicarbonato e íons

cálcio, são os fatores que influenciam na precipitação de carbonato de cálcio induzida por bactérias.

A precipitação de minerais vem sendo explorada para além do contexto geológico e os potenciais biotecnológicos relacionados principalmente ao processo de precipitação de carbonato passam por diferentes setores, desde o industrial ao agrícola. As aplicações envolvendo melhoramento e restauração de materiais de construção (CHOI et al., 2020); melhoramento de solo (desde correção de acidez a permeabilidade) (HATAF; BAHARIFARD, 2020); restauração de obras de arte (DHAMI; MUKHERJEE, 2014); recuperação de áreas contaminados por cobre (DUARTE-NASS et al., 2020); biocatalisadores para precipitação in vitro de carbonato de cálcio (KAMENNAYA et al., 2012); tanques para sequestro de CO₂ e recuperação de áreas contaminadas com óleos (JANSSON; NORTHEN, 2010), são algumas das propostas descritas em revisões e trabalhos na literatura.

WALTER et al., 2021 destacou a grande diversidade metabólica das esteiras microbianas presentes na Região dos Lagos e sugeriu que elas possuem a capacidade de promover condições favoráveis para a precipitação de carbonato de cálcio, dando ênfase a mecanismos envolvidos no metabolismo do enxofre e nos carboxissomos, associados a processos fotossintéticos. No presente estudo, serão exploradas as vias do ciclo de nitrogênio relacionadas à precipitação de carbonato de cálcio, sendo elas: a amonificação de aminoácidos; a hidrólise de ureia; a redução dissimilatória de nitrato a amônia (DNRA) e a desnitrificação.

METODOLOGIA

A metodologia utilizada no tratamento dos dados de sequenciamento foi descrita na seção Metodologia Geral, a fim de evitar repetições. Para as anotações funcionais, foram utilizados os dados de *SEED* relacionados ao nível 3 e ao nível de função e, para as anotações taxonômicas, foram utilizados os dados de *RefSeq* a nível de gênero. Ambas, as anotações foram feitas via *MG-RAST* e analisadas através de tabelas via *Excel* 2019. Para a identificação das enzimas e caminhos metabólicos de forma atualizada com base no EC.-, foram

utilizados os bancos de dados como o *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e o Brenda.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. AMONIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

O termo amonificação compreende a decomposição de compostos nitrogenados orgânicos em amônia. Os microrganismos responsáveis por essa modificação são predominantemente heterotróficos, tendo sua proliferação e atividade influenciadas pela quantidade de matéria orgânica disponível no ambiente (WHEELER; YEMM, 1958). Este processo ocorre durante o metabolismo microbiano de aminoácidos, no qual ocorre a produção de CO₂ e amônia.

A busca por genes relacionados ao metabolismo de amonificação de aminoácidos nas esteiras microbianas foi baseada em enzimas que possuíam a amônia como produto metabólico final e que estivessem relacionadas ao metabolismo de aminoácidos. Considerando esta característica, foram identificadas 33 enzimas, sendo 15 pertencentes a classe das hidrolases, 13 para classe de liases e 5 para classe de oxidoredutase. A maioria delas estão relacionadas a processos metabólicos de degradação para diferentes tipos de aminoácidos e, em alguns locais, foi possível observar a presença de isoenzimas, ou seja, uma mesma enzima sob outra forma exercendo a mesma função (BRAMMER, 2000), como o caso da *allophanate hydrolase*, que pode ser única ou dividida em subunidades. Em todas as amostras, foi possível observar a presença de pelo menos um gene relacionado a enzimas produtoras de amônia (Anexos - Material Complementar). Embora o metabolismo de amônia possua outras finalidades nos microrganismos, a presença dos genes permite inferir que as esteiras microbianas de todos os locais de coleta têm potencial para contribuir com a precipitação de carbonato de cálcio via amonificação de aminoácidos.

As enzimas envolvidas nas vias de amonificação de aminoácidos podem ser classificadas como hidrolases, liases e oxidoredutases. Pelo fato deste metabolismo envolver uma série de reações até chegar à liberação da amônia,

essas enzimas variam amplamente em suas ações e propriedades (LADD; JACKSON, 2015; PALENIK; MOREL, 1990). Tal informação é condizente aos achados relatados neste estudo.

A partir da hidrólise da amônia (NH_4) em amônio (NH_3) e hidroxila (OH^-), o ambiente ao redor da célula tem seu pH elevado, o que na presença de Ca^{2+} possibilita a precipitação de carbonato de cálcio (CASTANIER; MÉTAYER-LEVREL; PERTHUISOT, 2000). Considerando que a amonificação de aminoácidos é uma das vias descritas envolvidas no processo de precipitação de carbonato de cálcio e que a produção de amônia é um fator importante para que isto ocorra, este foi o motivo para as análises concentrarem-se em genes de enzimas que possuíam esta característica. É interessante lembrar que o metabolismo de aminoácidos nas amostras, configura-se entre os mais abundantes, logo, as esteiras microbianas possuem substrato para que ocorram reações envolvendo esta via.

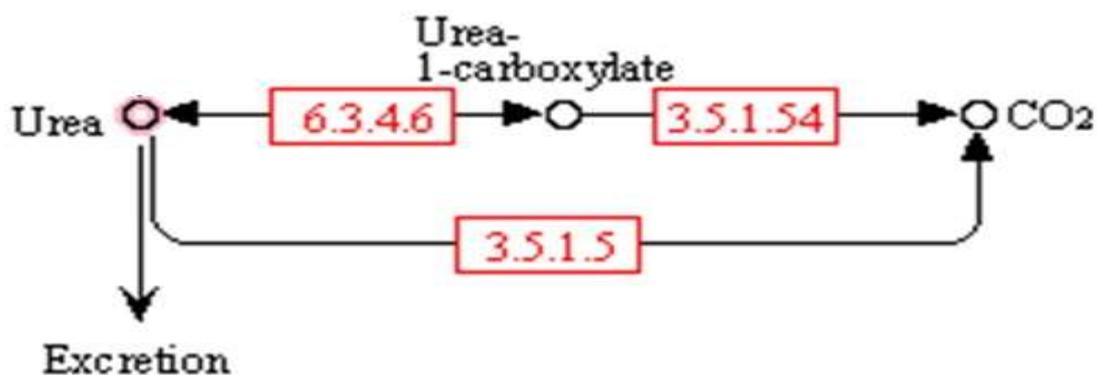
Com relação ao seu potencial biotecnológico, PERITO; MARVASI; MASTROMEI, 2020 apresentaram uma revisão sobre a utilização da precipitação de carbonato de cálcio como tratamento para deterioração e conservação de monumentos constituídos de pedra calcária. O trabalho cita o desenvolvimento de uma metodologia para aplicação envolvendo o uso de *Bacillus cereus* e *Mixococcus xanthus*. As bactérias foram colocadas em contato com uma superfície de calcário e alimentadas através de um meio de crescimento que estimulou o uso da via de amonificação de aminoácidos e confirmou a precipitação de carbonato de cálcio. Já AKIYAMA; KAWASAKI, 2012 avaliaram o potencial de um novo tipo de argamassa adaptável a diferentes solos e rochas. A intenção deste estudo foi testar os aminoácidos como nova fonte de amônia para aumentar o pH do meio, promovendo a precipitação de carbonato de cálcio, uma vez que, a utilização da ureia vem apresentando muitos desafios.

2. HIDRÓLISE DE UREIA

A hidrólise de ureia é descrita na literatura como um dos metabolismos do ciclo de nitrogênio envolvidos na precipitação de carbonato de cálcio e o menos complexo deles, apresentando alto grau de rendimento no processo de precipitação (SOLOMON et al., 2010).

Com relação ao metabolismo da hidrólise de ureia, a busca por genes foi baseada em suas duas vias descritas. Por isso, as análises concentraram-se em três genes específicos, sendo eles: allophanato hidrolase (EC 3.5.1.54), urease (EC 3.5.1.5) e urea carboxilase (EC 6.3.4.6) (Figura 3). Em todos os locais de coleta, ocorre a presença de pelo menos duas das três enzimas, relacionadas ao processo de decomposição da ureia.

Figura 3. Principais enzimas envolvidas no metabolismo de Degradação da Ureia: allophanato Hidrolase (EC 3.5.1.54); urease (EC 3.5.1.5) e urea Carboxilase (EC 6.3.4.6)



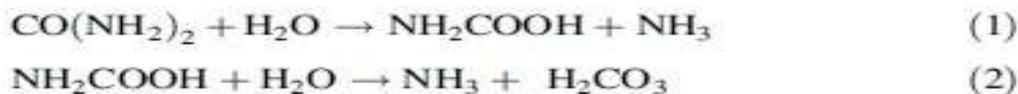
Fonte: Adaptado de KEGG, 2023

A enzima urease foi identificada pela presença de 3 genes de subunidades (alpha, beta e gamma) e 4 genes acessórios (UreG, UreF, UreD e UreE). Entre os cinco gêneros mais abundantes identificados como carreadores de ureases, destacam-se *Trichodesmium* sp., *Nostoc* sp., *Cyanothece* sp., *Roseobacter* sp. e *Rhodobacter* sp, sendo os três primeiros cianobactérias.

Com relação a via da urease, de forma intracelular, ela hidrolisa a ureia ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) em amônia (NH_4) e carbamato (NH_2COOH) (1). Espontaneamente, ocorre outra hidrólise que forma amônia e ácido carbônico (H_2CO_3) (2) (Figura 4). Os produtos que são gerados se equilibram em água para formar bicarbonato (HCO_3^-), amônio (NH_3) e hidroxila (OH^-) que leva ao aumento do

pH e que na presença de íons de cálcio, favorece a precipitação (ACHAL; PAN, 2011).

Figura 4. (1) A enzima urease decompõe ureia em carbamato e amônia; (2) Espontaneamente, o carbamato sofre uma hidrólise gerando amônia e ácido carbônico que serão equilibrados em água para auxiliar no aumento do pH do meio



Fonte: Adaptado de ACHAL; PAN, 2011

Esta enzima é encontrada em bactérias, alguns fungos, invertebrados e plantas (ARAB, 2019) e, geralmente, é codificada por três genes: UreA (gamma), UreB (beta) e UreC (alfa). Estes genes encontram-se acompanhados de genes acessórios UreD, UreE, UreF e UreG associados ao seu sítio ativo dependente de níquel. Entretanto, não é uma regra geral pois, em algumas espécies bacterianas, alguns desses genes podem não ser encontrados (CASTRO-ALONSO et al., 2019). O fato das ureases serem encontradas majoritariamente em bactérias, condiz com os achados taxonômicos do estudo, sendo os gêneros mais abundantes identificados, pertencentes ao domínio *Bactéria*. Este metabolismo via urease é o modelo mais simples e o que vêm sendo mais utilizado em aplicações biotecnológicas (HAMMES; VERSTRAETE, 2002), entretanto, a literatura relata que a anidrase carbônica parece auxiliar a urease no processo de precipitação de carbonato de cálcio através da intraconversão de CO₂ em HCO₃⁻ (BOZBEYOGLU et al., 2020).

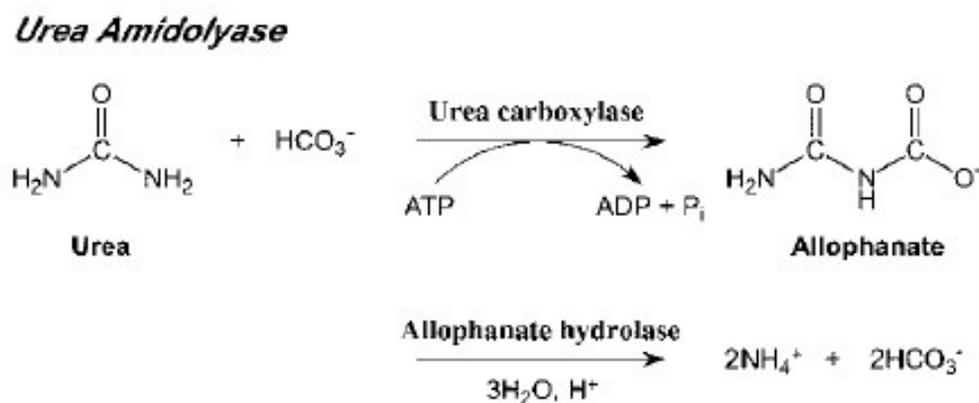
Quando analisamos a enzima allophanato hidrolase, 3 genes foram identificados e 2 deles estão relacionados a subunidades (1 e 2) que parecem ser dependentes de biotina e encontram-se alocadas na mesma categoria. Além disso, ela também foi relacionada ao metabolismo de amonificação de aminoácidos. Já para enzima urea carboxilase, apenas um gene foi identificado nas amostras de esteiras microbianas.

As enzimas allophanato hidrolase e urea carboxilase formam um complexo enzimático capaz de decompor a ureia. Nos metagenomas analisados, destacam-se 5 gêneros em que é possível encontrar este complexo enzimático bem representado, sendo eles, *Pseudomonas* sp., *Rhodopseudomonas* sp., *Thermococcus* sp., *Alkaliphilus* sp. e *Dechloromonas* sp. Além disso, apenas

no gênero *Pseudomonas* sp. foram encontrados todos os genes identificados de allophanato hidrolase.

Uma segunda via para hidrólise de ureia é descrita na literatura e identificada em bactérias, fungos, algas e plantas (LIU et al., 2020). Ela ocorre através de um conjunto enzimático denominado urea amidoliase que é biotina dependente e composto pela urea carboxilase e a allophanato hidrolase (LIN; BOESE; ST. MAURICE, 2016). Diferentemente das reações anteriormente descritas, ela é dependente de ATP e possui como produtos finais a amônia e o CO₂, que interferem no pH do meio, podendo auxiliar na indução da precipitação. Entretanto, até o momento nenhum trabalho esclarece sua contribuição neste processo (HAUSINGER, 2004) (Figura 5).

Figura 5. Reações químicas dependente de ATP envolvendo a Urea Amidoliase



Fonte: Adaptado de KANAMORI et al., 2004

A hidrólise de ureia é fortemente estudada em bactérias, mas também pode ser encontrado em fungos e arqueas (BURT et al., 2018; SOLOMON et al., 2010). A fonte de ureia utilizada neste metabolismo pode ser proveniente dos próprios microrganismos ou mesmo de fontes externas, como excretas de animais, porém, não há como confirmar qual a fonte mais utilizada pelas esteiras microbianas. Entretanto, é possível inferir com base na identificação dos genes que as esteiras microbianas de todos os locais de coleta possuem o potencial para realizar este metabolismo através das duas vias previamente descritas: urease e urea amidoliase.

Com relação ao potencial biotecnológico, a maioria dos trabalhos presentes na literatura destacam a simplicidade do seu mecanismo de decomposição.

DHAMI, 2013 investigou cinco isolados bacterianos (principalmente do gênero *Bacillus* sp.) de solos calcários, capazes de hidrolisar ureia e induzir precipitação de carbonato de cálcio com o potencial de aplica-lo na reconstrução de diferentes materiais de construção. Já NAVEED et al., 2020 revisou a importância que a precipitação de carbonato de cálcio via hidrólise de ureia pode apresentar para melhorias nas propriedades mecânicas do solo, tornando-o mais adequado a construções civis e para proteção ambiental. Outras revisões também abordam aplicações biotecnológicas desta via, voltadas principalmente para a área de biomateriais (BALAGURUSAMY, 2016; OMOREGIE; PALOMBO; NISSOM, 2020; LEEPRASET; CHONUDOMKUL; BOONMAK, 2022). Além disso, o trabalho de ARIYANTI; HANDAYANI, 2011 apresenta uma perspectiva do potencial de microalgas para produção de biocimento através da decomposição da ureia por ambas as vias. Já FOSTER et al., 2014 utilizou uma bactéria do gênero *Rhodococcus* sp., descrita por conter os genes para ambas as vias de degradação de ureia, para avaliar sua capacidade de bioconversão de nitrogênio e suas potenciais aplicações na biorremediação e biotecnologia comercial.

3. REDUÇÃO DISSIMILATÓRIA DE NITRATO A AMÔNIA (DNRA)

A via de redução dissimilatória de nitrato a amônia (DNRA) é outra via associada ao metabolismo de nitrogênio e relacionada à precipitação de carbonato de cálcio. Assim como na hidrólise de ureia, ela também possui enzimas específicas e por isso, a busca concentrou-se em dois genes: nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR). Essa via envolve duas etapas, sendo a primeira, iniciada pela redução de nitrato a nitrito por NR e a segunda, envolvendo a redução de nitrito a amônia por NiR. Na literatura, são descritos dois conjuntos de genes relacionados a DNRA sendo eles, Nap/Nfr e Nar/Nir (Figura 6), associados ao modo fermentativo ou respiratório, respectivamente (DECLEYRE et al., 2015).

Figura 6. Genes associados ao metabolismo da Redução Dissimilatória de Nitrato a Amônia (DNRA) (Nap/Nar - nitrato redutase; Nrf/Nir - nitrito redutase).



Fonte: Adaptado de KEGG, 2023.

Para o modo **fermentativo**, nas análises dos metagenomas, ao menos um dos genes de NapA (EC 1.9.6.1) e/ou NfrA (EC 1.7.2.2), correspondente as principais enzimas da via estão presentes nas amostras. Além delas, foram identificados 9 genes de subunidades sendo 5 para Nap (NapB, NapC, NapF, NapG e NapH) e 4 para Nfr (NfrH, NfrE, NfrC e NfrD). Em procariotos, a NapA é responsável por catalisar a primeira reação da via. Ela é uma enzima periplasmática que pode estar associada ou não a subunidade NapB, responsável pela transferência de elétrons (CRUZ-GARCÍA et al., 2007). Na ausência da NapB, a redução de nitrato pode ser estar acoplada a oxidação de formato para gerar força motriz (SPARACINO-WATKINS; STOLZ; BASU, 2014), ou seja, os microrganismos utilizam de outras fontes para realizar a transferência de elétrons necessária na reação. Já a segunda etapa da via é catalisada pela enzima NfrA. Essa enzima também é periplasmática, porém, é capaz de utilizar substratos alternativos e por isso, é comumente associada como a principal nitrito redutase envolvida no metabolismo de DNRA (GIBLIN et al., 2013).

Para as análises do modo **respiratório**, foram identificados 3 genes tanto para nitrato redutase Nar quanto para nitrito redutase Nir. A NarG (EC 1.7.5.1) e a NirB (EC 1.7.1.15) são as principais enzimas envolvidas neste metabolismo e ambas estão presentes nos metagenomas analisados. Além delas, também foram identificados genes de subunidades NarH, NarI, NirA e NirD. Esta via segue as mesmas etapas do modo fermentativo, porém, difere nas enzimas utilizadas. A primeira etapa é realizada pela enzima NarG que é citoplasmática e pode estar presente e/ou ausente em microrganismos (RUSMANA; NEDWELL, 2004) e que, juntamente com as subunidades NarH e NarI pode formar o complexo NarGHI (GONZÁLEZ et al., 2006). A segunda enzima da reação, a nitrito redutase NirB, também é citoplasmática, porém dependente de

NADH e possui atividade enzimática com ou sem a presença da subunidade NirD (YILZMAZ et al., 2022).

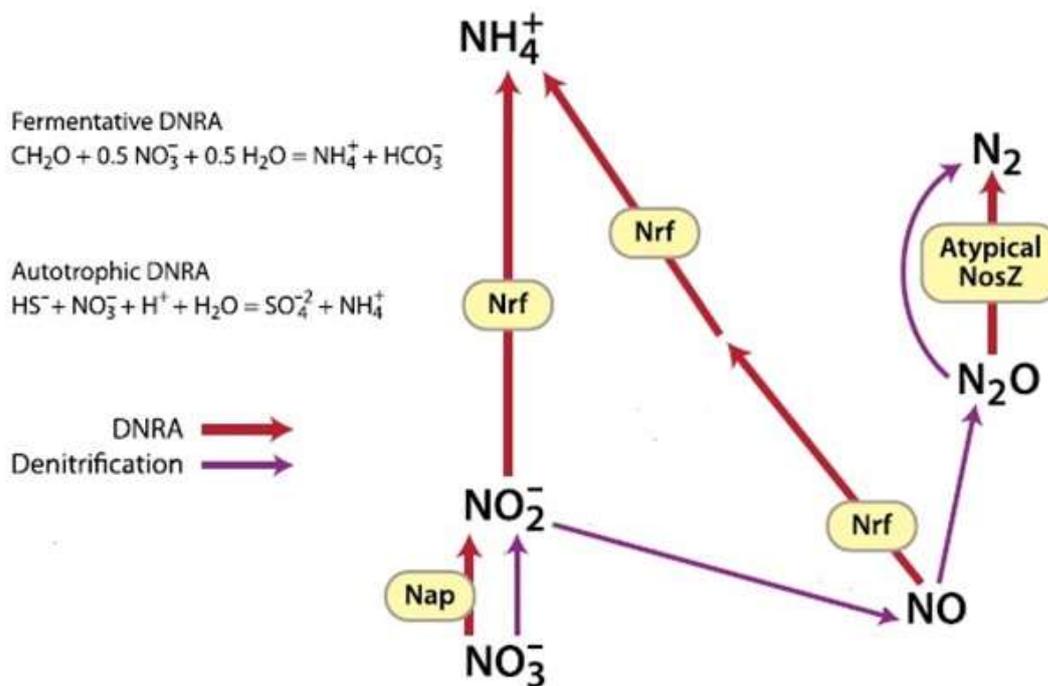
Ao analisar os metabolismos de nitrogênio presentes nas esteiras microbianas, a amonificação de nitrato e nitrito, categoria em que encontramos os principais genes relacionados a DNRA, configura entre os mais abundantes, correspondendo a 10,13% do total das sequências. Isto nos mostra que, os microrganismos presentes nesta estrutura possuem o substrato necessário para realizar metabolismos de amonificação, como a DNRA. Considerando os dados apresentados, os microrganismos presentes nesta estrutura, podem utilizar o modo fermentativo ou respiratório de acordo com suas necessidades. Na literatura, este metabolismo é relatado em ambientes anóxicos marinhos e estuarinos, principalmente nos sedimentos, sendo realizado por organismos heterotróficos e quimiolitotróficos, principalmente bactérias (BERNARD; MORTAZAVI; KLEINHUIZEN, 2015; GIBLIN et al., 2013).

Dos 43 gêneros atribuídos ao gene de NarG nos metagenomas, apenas três deles pertencem ao domínio arquea, sendo eles, *Haloarcula* sp., *Pyrobaculum* sp. e *Halomicrobium* sp. Este dado corrobora com o estudo de STOLZ; BASU, 2002 que realizou análises filogenéticas para os genes de nitrato redutases e atribuiu a gêneros bacterianos a presença de gene Nar e Nap enquanto, apenas Nar foi identificada em arqueas. Ao realizar as atribuições taxonômicas as principais enzimas envolvidas na DNRA nos metagenomas deste estudo, os dados são condizentes com a literatura. Sabendo que as enzimas Nap e Nar catalisam a primeira reação da via e determinam o rumo metabólico (fermentativo ou respiratório), é válido relatar que apenas para gêneros *Shewanella* sp., *Pseudomonas* sp., *Cupriavidus* sp., *Anaeromyxobacter* sp., *Desulfitobacterium* sp. e *Hahella* sp. ambas as enzimas foram identificadas.

A influência deste metabolismo na precipitação de carbonato de cálcio está associada a produção de amônia assim como, no consumo de H⁺ que auxilia no deslocamento dos equilíbrios e favorece a produção de íons carbonato que na presença de cálcio induzem o processo de precipitação (CASTANIER; MÉTAYER-LEVREL; PERTHUISOT, 2000) (Figura 7). Os estudos referentes às aplicações biotecnológicas da DNRA são voltados principalmente para a

remoção de nitrato do ambiente, sendo pouco estudado seu viés na precipitação de carbonato de cálcio. Em um dos poucos estudos dessa área, QI et al., 2022 demonstrou em seu trabalho a possibilidade da aplicação de nitrato em solos acidificados para correção da acidez através do metabolismo de DNRA.

Figura 7. Vias fermentativas e respiratórias envolvidas na DNRA interferem diretamente na indução da precipitação de carbonato de cálcio através do consumo e produção de compostos como H^+ , HCO_3^- e NH_4^+



Fonte: Adaptado de GIBLIN et al., 2013

4. DESNITRIFICAÇÃO

A desnitrificação é o processo dissimilatório mais conhecido e comum no ciclo do nitrogênio e vem sendo considerado em trabalhos mais recentes como um dos metabolismos que influenciam na precipitação de carbonato de cálcio, pois, dependendo do doador de elétrons, a redução do nitrato pode consumir compostos como H_2 e HS^- . Neste caso, a desnitrificação induz a precipitação de carbonato de cálcio ao consumir H^+ e gerar como um de seus produtos finais o bicarbonato, que auxilia no aumento do pH do meio e conseqüentemente na ocorrência da precipitação (Figura 8) (ELTARAHONY et al., 2019; GÖRGEN et al., 2021).

Figura 8. Equação referente a via de Desnitrificação



Fonte: Adaptado de MARTIN et al., 2013

A busca por genes relacionados à desnitrificação concentrou-se principalmente em enzimas relacionados à segunda etapa da via. Como demonstra a Figura 9, as vias de desnitrificação e DNRA possuem as mesmas enzimas na etapa da redução de nitrato a nitrito. Após a formação do nitrito, as vias tomam caminhos distintos e a partir daí, os genes nitrito redutases (Nir), óxido nítrico redutase (Nor) e óxido nitroso redutase (Nos) foram prospectados nas amostras de esteiras microbianas

Figura 9. Vias de Desnitrificação e DNRA. As nitrato redutases Nar/Nap são comuns em ambas, porém, após a formação de nitrito, outras enzimas dão continuidade ao processo, sendo elas identificadas como Nir, Nor e Nos



Fonte: Adaptado de SIMON, 2002.

Com relação aos metagenomas estudados, tanto os genes NirK (EC 1.7.2.1) quanto NirS (Cytochrome cd1 - EC 1.7.2.1) foram identificados. Quando avaliamos a presença desses genes nos microrganismos identificados nas amostras, apenas nos gêneros *Cupriavidus* sp. e *Kangiella* sp. ambos estão presentes. A etapa redutiva de nitrito em óxido nítrico (NO) é a principal diferença entre os microrganismos que respiram nitrato, dos microrganismos

desnitrificantes. É possível encontrar duas nitrito redutases periplasmáticas envolvidas neste processo, sendo elas NirK – que contém cobre - ou NirS (citocromo cd1) (DONG et al., 2009). Mesmo sendo diferentes, ambas possuem a mesma equivalência funcional e fisiológica (BRAKER; FESEFELDT; WITZEL, 1998). Na literatura, consta que a maioria dos microrganismos desnitrificantes codificam um ou outro desses genes. Até o momento, apenas os gêneros *Bacillus* sp. e *Bradyrhizobium* sp. foram identificados como carreadores de ambos os genes (JANG et al., 2018; SÁNCHEZ; MINAMISAWA, 2018), porém, nos dados apresentados os gêneros identificados como carreadores foram diferentes dos descritos na literatura.

Subsequentemente, o NO é reduzido a óxido nitroso (N₂O) e nesta etapa, foram identificados os genes NorB, NorC e qNor (quinol-dependente), que se diferenciam através do seu doador de elétrons (SALAS et al., 2021). Nas esteiras microbianas analisadas, encontram-se presentes genes que codificam NorB (EC 1.7.2.5), NorC e qNor (quinol-dependente). Ao avaliar a presença destes genes nos microrganismos, dos 10 gêneros identificados contendo NorB, 6 deles também contém o gene NorC, sendo estes gêneros *Thiobacillus* sp., *Bdellovibrio* sp., *Nitrosococcus* sp., *Roseobacter* sp., *Ruegeria* sp. e *Dinoroseobacter* sp. Já com relação a presença de qNor, destacam-se os gêneros *Anaeromyxobacter* sp., *Sorangium* sp., *Flavobacterium* sp., *Candidatus Koribacter* e *Synechocystis* sp., sendo nenhum deles semelhante aos gêneros identificados para NorBC. Logo, estes microrganismos parecem utilizar NorBC ou qNor para realizar a redução do óxido nítrico. Tal achado permite observar o quanto ainda é possível descobrir sobre o metabolismo dos microrganismos presentes nas esteiras microbianas e quais são suas possíveis adaptações as mudanças que ocorrem neste ecossistema.

Na última etapa da via, o N₂O é reduzido a dinitrogênio (N₂) por uma enzima denominada NosZ que está presente nos metagenomas analisados e atribuída principalmente aos gêneros *Gramella* sp., *Sphaerobacter* sp., *Robiginitalea* sp., *Magnetospirillum* sp. e *Roseobacter* sp.. NosZ é uma enzima solúvel e, normalmente, codificada junto com um grupo de genes conhecidos como NosR, NosD, NosF, NosY e NosL, podendo em alguns casos encontrarmos NosX e NosC (SALAS et al., 2021). Com exceção do NosC, todos os demais genes acessórios foram identificados nas amostras.

Com relação ao seu potencial biotecnológico, a desnitrificação vem sendo explorada através de suas aplicações para a indústria de bioengenharia e biomateriais. ERŞAN et al., 2016 investigou diferentes culturas bacterianas capazes de reduzir nitrato e precipitar carbonato de cálcio para auxiliar na inibição da corrosão de componentes de aço e ajudar na cicatrização de trincas. Já LIN et al., 2021 e JAIN; FANG; ACHAL, 2021 fizeram uma revisão sobre a precipitação de carbonato de cálcio via desnitrificação e suas diferentes aplicações envolvendo reforço do solo, desenvolvimento de concreto auto reparável, restauração de obras de arte e tratamento de águas residuais industriais.

Considerando os metabolismos já descritos na literatura relacionados a precipitação de carbonato de cálcio e, associando estudos já realizados em esteiras microbianas da Região dos Lagos sobre seu potencial de precipitação, este estudo descreveu e demonstrou, pela primeira vez, o potencial de quatro metabolismos. Porém, é importante ressaltar que a precipitação de carbonato de cálcio ocorre por um conjunto de fatores em que, alguns deles, podem sofrer interferência de processos metabólicos microbianos, como a produção de EPS, a diminuição do pH do meio (alcalinidade) e a disponibilidade de matéria orgânica.

CONCLUSÃO

A precipitação de carbonato de cálcio biologicamente induzida é uma importante fonte de estudo sobre interações microbianas através da formação de estruturas minerais fósseis e, vem ganhando destaque devido às suas aplicações biotecnológicas referentes a engenharia de materiais e à correção do solo. O ciclo do nitrogênio participa no processo de precipitação de carbonato de cálcio, especialmente através da produção de íons que interferem no pH do meio. Nesse capítulo, foi explorado o potencial metabólico dos microrganismos presentes nas esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama em relação às vias de amonificação de aminoácidos, hidrólise de ureia, redução dissimilatória de nitrato a amônia e desnitrificação. Alguns desses genes parecem ser atribuídos pela primeira vez a gêneros bacterianos. Isto aponta novos caminhos para aprofundar o conhecimento acerca do ciclo de nitrogênio através de pesquisas dedicadas à confirmação desses achados, como por exemplo, através do sequenciamento de genomas completos e de testes de atividade enzimática. Nesse sentido, aponta-se também a importância do estudo de mecanismos de trocas gênicas dentro de um sistema complexo como as esteiras microbianas e, os benefícios que a versatilidade metabólica pode trazer para os microrganismos que ali se encontram. Do ponto de vista biotecnológico, o presente estudo oferece evidências de que as esteiras microbianas são ambientes promissores para a bioprospecção de novos metabolismos e microrganismos envolvidos na precipitação de carbonato de cálcio com aplicações, sobretudo, para a bioengenharia e biorremediação.

CAPÍTULO 3

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DAS ESTEIRAS MICROBIANAS
ASSOCIADO À SÍNTESE DE BIOPLÁSTICO (PHA/PHB)**

INTRODUÇÃO

A poluição ambiental devido ao uso exagerado de plásticos e à baixa eficiência da sua gestão de vida útil, vem sendo palco de grande debate desde os anos 2000. Nesse contexto, os estudos envolvendo a substituição dos plásticos convencionais por bioplásticos estão ganhando destaque a nível internacional (NANDAKUMAR; CHUAH; SUDESH, 2021). Os bioplásticos são tipos específicos de materiais poliméricos biodegradáveis, produzidos a partir de bases biológicas ou recursos renováveis como bactérias, arqueas, microalgas entre outros (MANALI SHAH et al., 2021).

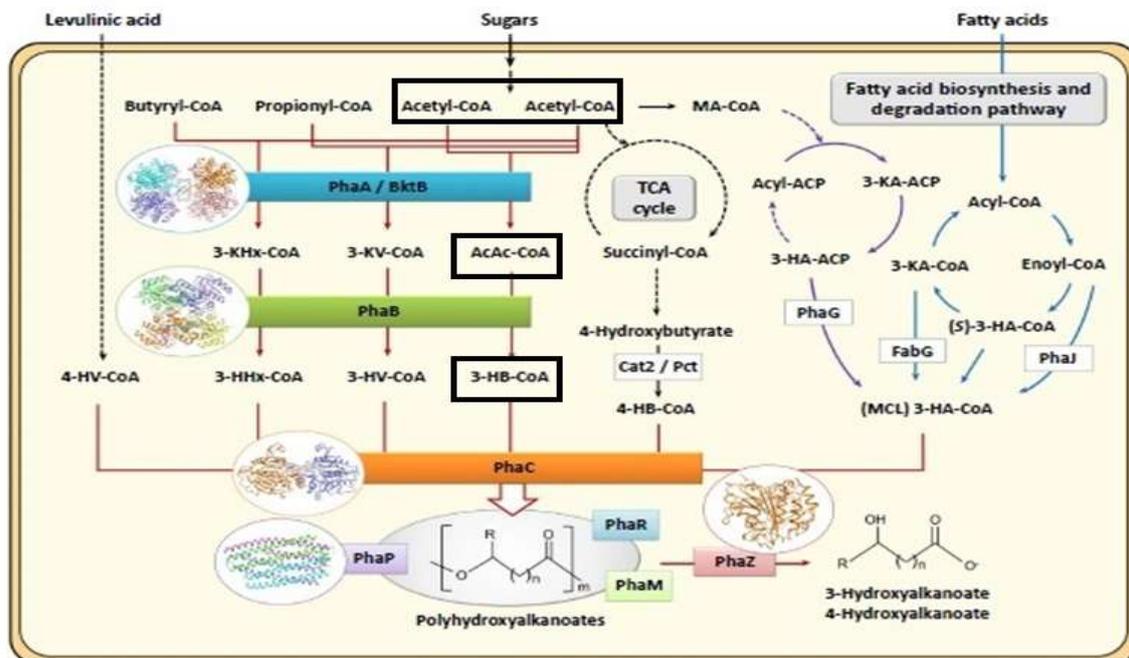
A degradação de plásticos convencionais no meio ambiente é influenciada por fatores como as propriedades do polímero, a comunidade microbiana e fatores abióticos (temperatura, UV e pH), porém, sua estimativa de degradação é superior à de 100 anos (VILJAKAINEN; HUG, 2021). Imagina-se que todo plástico a base de recursos renováveis seja biodegradável, mas isso depende da estrutura química do material. Entre os bioplásticos considerados biodegradáveis, destaca-se o polihidroxialcanoato (PHA), sendo até o momento seu tempo de degradação estimado no meio marinho entre 1 e 3 anos (DILKES-HOFFMAN et al., 2019). Entretanto, a degradação microbiológica de bioplásticos catalisada por enzimas microbianas vem chamando a atenção como forma de reduzir a quantidade deste material no meio ambiente (AHSAN et al., 2023). Alguns microrganismos possuem enzimas específicas envolvidas no processo de degradação de PHAs. Essas enzimas são denominadas PHA despolimerases (PhaZ) e podem ser encontradas de forma intra ou extracelular (DE VOGEL et al., 2021).

O PHA é um biopolímero biodegradável e plástico que vem ganhando destaque na indústria devido à sua semelhança de estrutura química e propriedades físico-químicas com os plásticos convencionais produzidos a partir de derivados petroquímicos (MENG; CHEN, 2017). Esse biopolímero é naturalmente produzido por diversos microrganismos, principalmente bactérias, e sua síntese é induzida sob condições de estresse, como por exemplo, limitação de nitrogênio e fósforo. Além disso, são acumulados sob a forma de grânulos intracelulares para armazenamento de carbono e energia (ALSAADI et al., 2022).

A síntese de PHA é derivada da fermentação de açúcares, lipídeos, alcenos e ácidos alcanóicos (GRANDÍSSIMO et al., 2019). Suas vias biossintéticas estão associadas, de forma direta ou indireta, a processos metabólitos centrais como as vias glicolíticas e à biossíntese e degradação de aminoácidos e ácidos graxos (SAGONG et al., 2018). A PHA sintase (PhaC) é a enzima chave para a produção de PHA, pois influencia a composição final do polímero, bem como a especificidade do substrato (ALSAADI et al., 2022). Mais de 100 tipos de PHAs já foram identificados e são classificados de acordo com sua cadeia (curta, média ou longa) e com base na composição dos monômeros dos polímeros, sendo o PHB o mais conhecido (SHARMA et al., 2017).

O Poli-3-hidroxi-butirato (P3HB) é um polímero pertencente à família dos PHAs de cadeia curta e o membro mais estudado. Sua via sintética tem como precursor o acetil-CoA e segue por 3 etapas até a formação do biopolímero (Figura 1). Este biopolímero é conhecido por sua biocompatibilidade e por isso, vem sendo aplicado na indústria biomédica e farmacêutica (CHEN et al., 2011). O estudo da rota biossintética do PHB em organismos marinhos extremófilos como bactérias, fungos, algas e arqueas vem ganhando destaque devido à sua grande capacidade de sobrevivência a condições como alta salinidade, desidratação e congelamento (NANDA et al., 2022). Com relação aos ambientes hipersalinos, a produção de PHA tem um importante papel na sobrevivência e adaptação dos microrganismos e estudos têm demonstrado bons resultados na produção de bioplásticos por microrganismos extremófilos (OBRUCA et al., 2020; KUMAR; KUMAR; SINGH, 2020). Essa capacidade pode trazer vantagens na produção industrial do PHB através da redução dos custos associados a medidas para evitar a contaminação por outros microrganismos (NANDA et al., 2022).

Figura 1. Vias metabólicas envolvidas na biossíntese de PHA e as principais enzimas utilizadas neste metabolismo. Destacado em preto está a via do P3HB que começa pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA em uma de acetoacetil-CoA (AcAc-CoA) que é catalisada a 3-hidroxibutiril-CoA (3-HB-CoA). Na etapa final da via, a PhaC (PHA sintase) sintetiza o biopolímero poli-3-hidroxibutirato (P3HB)



Fonte: Adaptado de SAGONG et al., 2017

Tratando-se de um assunto que está em debate atualmente, são muitos os trabalhos sobre o potencial biotecnológico dos bioplásticos. As aplicações biotecnológicas relacionadas ao PHA vão da produção de bioplástico a aplicações médicas (NARANCIC et al., 2020); utilização como nanopartículas (PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005); engenharia genética (LI et al., 2017); composto bioativo antitumoral (FERNÁNDEZ et al., 2022) e na agricultura e indústria de embalagens de alimentos (SIROHI et al., 2020; EL-MALEK et al., 2020).

Estudos prévios realizados na Região dos Lagos apontam o potencial das esteiras microbianas para a produção de PHA/PHB. SILVA et al., 2008 descreveu uma bactéria magnetostática "*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*" isolada de amostras da Lagoa de Araruama como um microrganismo capaz de produzir PHA. Já PINTO et al., 2015 descreveu o genoma completo da arquea *Haloferax gibbonsii* isolado da Lagoa Vermelha e seu potencial como produtor de PHA. O presente trabalho utilizou a metagenômica para investigar a presença de genes relacionados à síntese

desses biopolímeros, ampliando a visão acerca do potencial biotecnológico associado à síntese de bioplásticos por microrganismos das esteiras microbianas presentes no complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas.

METODOLOGIA

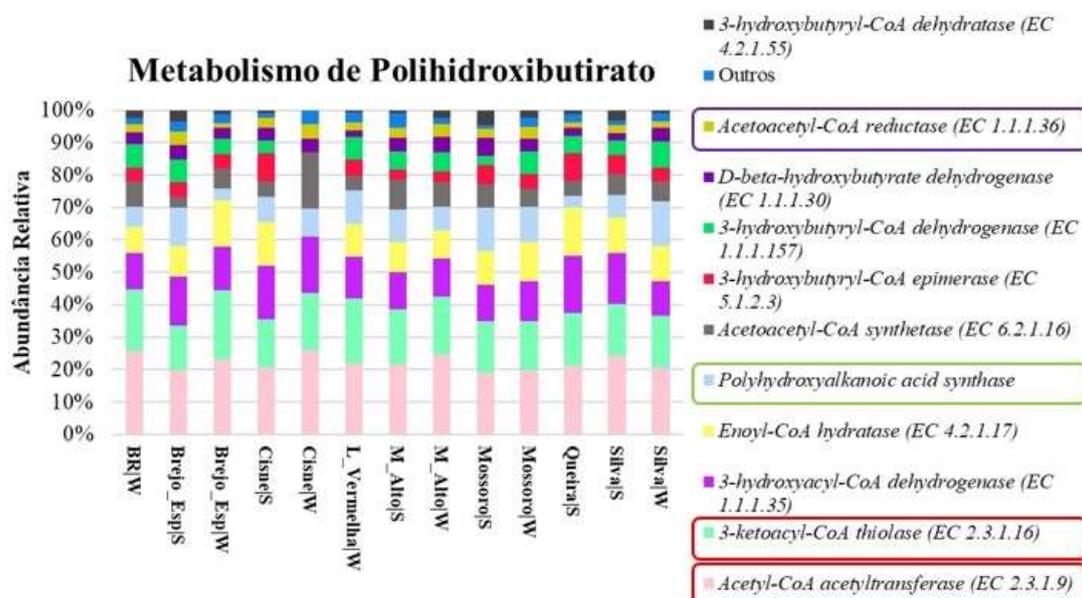
A metodologia utilizada no tratamento dos dados de sequenciamento foi descrita em Metodologia Geral, a fim de evitar repetições. As anotações das sequências foram feitas via *MG-RAST*. Para as anotações funcionais, foram utilizadas as anotações a nível de *SEED* 3 relacionadas ao metabolismo de Polihidroxibutirato (PHB) e suas funções. Para as anotações taxonômicas, foi utilizado o banco de dados *RefSeq* a nível de gênero.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ANÁLISE FUNCIONAL

A via biossintética de PHB encontra-se entre as mais abundantes na categoria de Ácidos graxos, Lipídeos e Isoprenoides, correspondendo a 11,71% das sequências totais desta categoria. As sequências relacionadas às principais enzimas envolvidas na biossíntese deste biopolímero - PhaA, PhaB e PhaC - foram encontradas nas amostras de esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas (Figura 2).

Figura 2. Abundância relativa referente ao SEED 3 do Metabolismo de Polihidroxiacetato e suas principais enzimas presentes nas esteiras microbianas nos locais de coleta (BR; Brejo_Esp: Brejo do Espinho; Cisne; L_Vermelha: Lagoa Vermelha e M_Alto: Monte Alto; Mossoró; Queira e Silva) na Região dos Lagos em duas estações (S - *summer* e W - *winter*), no ano de 2013. Em “Outros”, encontram-se as sequências que representam menos de 1,50% das sequências totais. Marcado em vermelho, verde e roxo encontram-se as enzimas PhaA, PhaC e PhaB, respectivamente



A PhaA é a enzima responsável pela primeira reação da via e é encontrada como acetil-CoA acetil-transferase e/ou 3-ketoacetil-CoA tiolase, correspondendo a 21,73% e 16,46% das sequências totais relacionadas ao metabolismo de PHB, respectivamente. Segundo SAGONG et al., 2018, as enzimas acetil-CoA acetil-transferase e 3-ketoacetil-CoA tiolase são capazes de realizar a mesma reação catalítica, porém diferenciam-se em relação à sua especificidade de substrato. A 3-ketoacetil-coA tiolase é a enzima mais utilizada para produção de biopolímeros de cadeias longas. A presença de genes que codificam ambas as enzimas nas esteiras microbianas as tornam uma promissora fonte de bioprospecção atrelada à versatilidade de produção de biopolímeros.

A enzima PhaB catalisa a segunda reação da via e encontra-se como acetoacetil-CoA redutase, correspondendo a 2,80% das sequências totais. Já a PhaC, refere-se a PHA sintase, correspondendo a 7,91% das sequências totais identificadas. A PHA sintase (PhaC) é considerada a enzima chave nas vias biossintéticas de biopolímeros. Divide-se em 4 classes dependendo da especificidade do substrato e de acordo com sua preferência em formar cadeias curtas, médias ou longas de polímeros. As classes I, III e IV produzem

os PHAs de cadeia curta (C3 a C5), enquanto a classe II sintetiza PHAs de cadeia média-longa (C4 a C14). Além disso, as classes I e II são formadas por uma única subunidade (PhaC), enquanto as classes III e IV possuem uma segunda subunidade, PhaE e PhaR, respectivamente (MEZZOLLA; D'URSO; POLTRONIERI, 2018). Correlacionando os achados a esta classificação, a PhaC encontrada nas esteiras microbianas parece pertencer a enzimas da classe I, pois não foram encontradas sequências referentes a uma segunda subunidade nas amostras.

Dentro da categoria "Outros", foram identificadas duas enzimas associadas ao processo de degradação do PHB, sendo elas a PHA despolimerase (PhaZ) e a PHB despolimerase (intracelular). A abundância de ambas é baixa, correspondendo a 0,08% e 0,13% das sequências totais, respectivamente. Entretanto, mesmo em baixa abundância, sua presença nos permite inferir que as esteiras microbianas também têm o potencial de degradar PHB. As sequências atribuídas a PHA despolimerase e PHB despolimerase (intracelular) nas esteiras microbianas estudadas, foram identificadas como pertencentes ao filo *Proteobacteria*. Estes dados corroboram com o estudo de VILJAKAINEN; HUG, 2021 que descreveu os filos *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* como principais codificadores de PHA despolimerase em ambientes marinhos, sedimentos e águas residuais. De modo geral, essas enzimas podem ser encontradas de forma intra ou extracelular, podendo degradar os grânulos internos ou serem secretadas para eliminar PHAs encontrados no meio ambiente.

Por fim, foram identificadas sequências referentes a enzima enoyl-CoA hidratase. Segundo TAN et al, 2020, a co-expressão desse gene juntamente com a PHA sintase permite o aumento na composição das cadeias dos PHAs durante seu metabolismo.

Portanto, a detecção de sequências relacionadas à síntese e à degradação de PHB aponta para o grande potencial biotecnológico, associado à bioprospecção de microrganismos presentes nas esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas para a produção de bioplásticos.

2. ANÁLISE TAXONÔMICA

Ao realizar a análise taxonômica das sequências referentes ao metabolismo de PHB, foram identificados 10 gêneros do domínio Arquea e mais de 100 gêneros do domínio Bactéria. Os 5 gêneros mais abundantes são de bactérias, sendo eles *Desulfococcus* sp., *Desulfatibacillum* sp., *Ruegeria* sp., *Roseobacter* sp. e *Rhodospirillum* sp.

Entretanto, sendo a PhaC a enzima mais importante da via biossintética, foram analisados quais microrganismos a nível de gênero poderiam carrear-las. Novamente, destacam-se as bactérias com 55 gêneros identificados como possíveis carreadores do gene PhaC, sendo os 8 mais abundantes, destacados na Tabela 1.

Tabela 1. Gêneros mais abundantes relacionados a enzima PHA sintase (PhaC) nas amostras de esteiras microbianas e principais referências de estudos relacionando esses gêneros a produção de PHA/PHB.

Gêneros mais abundantes (PhaC)	% de sequências	Referência
<i>Synechocystis</i> sp.	6,87	Rodríguez Lorenzo et al. (2022)
<i>Ruegeria</i> sp.	6,87	Kim et al. (2019)
<i>Thioalkalivibrio</i> sp.	5,28	-
<i>Dinoroseobacter</i> sp.	5,11	Xiao et al (2015)
<i>Rhodospirillum</i> sp.	5,11	Karmann et al. (2019)
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	4,58	Brown et al. (2022)
<i>Rhodobacter</i> sp.	4,58	Kemavongse et al. (2007)
<i>Magnetococcus</i> sp.	4,40	-

Dos 8 gêneros apresentados, é interessante relatar que a cianobactéria *Synechocystis* sp. e a proteobactéria *Ruegeria* sp. destacam-se correspondendo a 6,87% das sequências totais identificadas para a enzima PhaC. Além disso, 7 dos gêneros bacterianos pertencem ao filo Proteobacteria, dos quais 6 pertencem à classe de α -Proteobacteria. O presente trabalho fornece pela primeira vez a evidência do potencial da capacidade de biossíntese de PHB pelos gêneros *Thioalkalivibrio* sp. e *Magnetococcus* sp., sendo necessários estudos mais aprofundados para confirmar esse achado.

A presença de cianobactérias entre os gêneros mais abundantes é muito interessante ao considerar a economia da produção de bioplásticos. GRANDÍSSIMO, 2019 relatou em seu estudo o potencial das cianobactérias autotróficas como produtoras de PHAs, visto que, elas necessitam apenas de luz e CO₂ para a produção de biopolímeros o que, possibilitaria reduzir o custo de produção dos bioplásticos. Já CARPINE et al., 2020 relatou os principais gêneros bacterianos utilizados na produção de PHB em escala industrial nas Américas, Ásia e Europa. Entre os gêneros citados, 10 foram identificados nas esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas, destacando-se *Rhodopseudomonas* sp.

CONCLUSÃO

Através da metagenômica, o presente estudo possibilitou a detecção dos principais genes envolvidos na biossíntese de biopolímeros, bem como a identificação de mais de 50 microrganismos potencialmente produtores associados às esteiras microbianas do complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas. A exploração desse repertório gênico é especialmente valiosa quando se considera a capacidade destes microrganismos de sobreviver em condições hipersalinas, possibilitando a utilização de meios de cultivo com salinidade elevada e reduzindo os riscos de contaminação. Nesse sentido, são necessários novos estudos voltados ao isolamento, cultivo e confirmação da capacidade produtora de biopolímeros dos microrganismos identificados e à avaliação da sua viabilidade para produção em escala industrial.

5. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo revelou, através da metagenômica, a elevada diversidade taxonômica e funcional da microbiota associada às esteiras microbianas coletadas na Região dos Lagos e salinas próximas. Essas esteiras são compostas principalmente pelo filo *Proteobacteria*, incluindo diversos gêneros para os quais são descritos potenciais biotecnológicos nos campos da biorremediação, biomoléculas, bioplástico, tratamento de águas residuais, bioenergia e alimentação. O segundo filo mais abundante é o *Cyanobacteria*, incluindo gêneros produtores de substâncias com ações antimicrobianas, antiincrustantes e antineoplásicas.

Do ponto de vista funcional, os genes mais abundantes nessas esteiras estão relacionados ao metabolismo basal de carboidratos e proteínas. Dentro do metabolismo de carboidratos, destaca-se o potencial biotecnológico associado a metabolismo de um carbono, que vem sendo explorado para conversão de gases residuais antropogênicos em moléculas de alto valor industrial, como o gás natural. Além disso, as vias de fermentação detectadas nas amostras estudadas estão relacionadas à produção de butanol e etanol, que possuem grande valor para a indústria de biocombustível.

Foram identificados ainda, microrganismos resistentes a metais, com potencial aplicação para biorremediação de ambientes contaminados. A análise funcional também revelou a presença de genes associados à resistência a antibióticos. Este resultado merece ser alvo de estudos mais aprofundados, tendo em vista sua implicação na saúde pública. Esses achados apontam para a necessidade de investigar os impactos antropogênicos na Lagoa de Araruama.

O aprofundamento das análises referentes ao potencial metabólico da microbiota presente nas esteiras microbianas revelou a ocorrência de genes relacionados à precipitação de carbonato de cálcio e à produção e degradação de bioplásticos. A precipitação de carbonato de cálcio biologicamente induzida desempenha um importante papel geológico e possui diversas aplicações no que se refere a engenharia de materiais e à correção do solo. Nesse sentido, foram exploradas as vias do ciclo do nitrogênio: amonificação de aminoácidos, hidrólise de ureia, redução dissimilatória de nitrato a amônia e desnitrificação.

A busca por alternativas biodegradáveis aos plásticos convencionais vem impulsionando os estudos voltados à produção de bioplásticos, materiais poliméricos biodegradáveis produzidos por bactérias, arqueas e microalgas. O presente estudo evidencia a ocorrência de genes e microrganismos potencialmente relacionados à síntese e degradação de polihidroxibutirato. Dessa forma, esse trabalho fornece bases importantes para o desenvolvimento de pesquisas futuras voltadas à exploração do repertório gênico das esteiras microbianas presentes no complexo lagunar da Lagoa de Araruama e salinas próximas para a síntese de bioplástico.

Considerando suas particularidades, como estrutura e presença em ambientes hipersalinos, as esteiras microbianas apresentaram elevada biodiversidade e versatilidade metabólica. Nesse sentido, as esteiras provaram ser um ecossistema com grande potencial para bioprospecção envolvendo microrganismos e processos metabólicos com diferentes aplicações na área da biotecnologia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASIAN, F. et al. A Review on the Genetics of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbon Degradation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 224–250, jan. 2016.

ABDOLLAHNIA, M. et al. Exploring the potentials of halophilic prokaryotes from a solar saltern for synthesizing nanoparticles: The case of silver and selenium. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229886, 4 mar. 2020.

ACHAL, V.; PAN, X. Characterization of Urease and Carbonic Anhydrase Producing Bacteria and Their Role in Calcite Precipitation. **Current Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 894–902, mar. 2011.

AGUILAR, N.C. Isolamento e caracterização de bactérias resistentes a arsênio com potencial de aplicação em processos de biorremediação. 2019. 100f. **Tese (Doutorado)**, UFVJM, Minas Gerais, 2019. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2188?mode=full>>. Acesso em: 27 ago.2023.

AHSAN, W. A. et al. Biodegradation of Different Types of Bioplastics through Composting - A Recent Trend in Green Recycling. **Catalysts**, v. 13, n. 2, p. 294, 28 jan. 2023.

AKIYAMA, M.; KAWASAKI, S. Microbially mediated sand solidification using calcium phosphate compounds. **Engineering Geology**, v. 137–138, p. 29–39, jun. 2012.

ALMEIDA, J. et al. Acetylcholinesterase in Biofouling Species: Characterization and Mode of Action of Cyanobacteria-Derived Antifouling Agents. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 2739–2756, 24 jul. 2015.

ALMEIDA, T. C. D. et al. Identificação de cianobactérias na Lagoa Salgada por abordagem metagenômica, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Brasiliensis**, v. 6, n. 1, p. 1, 31 jan. 2022.

ALSAADI, A. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolymer Synthesis by Marine Bacteria of the Malaysian Coral Triangle Region and Mining for PHA Synthase Genes. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 2057, 18 out. 2022.

ALVES, S.A.P.M.N; SILVA, L.H.S.S. Estudo dos estromatólitos biscuit da Lagoa Vermelha (Rio de Janeiro - Brasil). **Revista de Geologia**, Fortaleza. Vol.24, n.2, 2011. Disponível em <<http://www.periodicos.ufc.br/geologia/article/view/1402>>. Acesso em: 15 jun.2023

AMIN, K. et al. Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases from Hyperthermophilic Archaea: Insights on Their Characteristics and Applications in Biotechnology. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1557, 21 out. 2021.

ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Babraham: Babraham Institute. 2010. Disponível em: <<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>

ARAB, M. G. **Soil Stabilization using Calcium Carbonate Precipitation via Urea Hydrolysis**. Em: THE 4TH WORLD CONGRESS ON CIVIL, STRUCTURAL, AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING. abr. 2019. Disponível em: <https://avestia.com/CSEE2019_Proceedings/files/paper/ICGRE/ICGRE_149.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2023

ARAUJO, A. et al. Magnetotactic Bacteria as Potential Sources of Bioproducts. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 389–430, 16 jan. 2015.

ARAÚJO, Francisco Clésio Medeiros Dantas de. Produção do livro paradidático: uma pitada de sal no ensino de geografia. 2017. 143f. **Dissertação (Mestrado Profissional em Geografia)** - Centro de Ensino Superior do Seridó - CERES, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017

ARIYANTI, D.; HANDAYANI, N. A. An Overview of Biocement Production from Microalgae. v. 2, 2011.

AUBÉ, J. et al. Meta-omics Provides Insights into the Impact of Hydrocarbon Contamination on Microbial Mat Functioning. **Microbial Ecology**, v. 80, n. 2, p. 286–295, ago. 2020.

AZZAM, A. M.; TAWFIK, A. Removal of Heavy Metals Using Bacterial Bio-Flocculants of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management**, v. 23, n. 4, p. 288–294, 27 out. 2015.

BAKER-AUSTIN, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176–182, abr. 2006.

BALAGURUSAMY, N. Potential of enzymes (urease and carbonic anhydrase). **Chimica Oggi**, v. 34, 2016.

BARBOZA, N. R.; GUERRA-SÁ, R.; LEÃO, V. A. Mechanisms of manganese bioremediation by microbes: an overview: Mechanism of manganese bioremediation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 11, p. 2733–2739, nov. 2016.

BARRUETO, L.R.L. Variedade de espécies de *Acinetobacter* carreando genes codificadores de carbapenemases em águas costeiras da cidade do Rio de Janeiro. 2018. 104f. **Dissertação (Mestrado em Ciências - Microbiologia)**, UFRJ, Rio de Janeiro, 2018.

BASTOS, M.D.C.F. Capítulo 10 – Resistência bacteriana a drogas. Em: VERMELHO, A.B; BASTOS, M.D.C.D.F; SÁ, M.H.B.D (Eds.). **BACTERIOLOGIA GERAL**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 546–552

BEN ABDALLAH, M.; SAYADI, S.; KARRAY, F. Overproduction of poly(3-hydroxybutyrate) by the extremely halophilic archaeon Haloarcula sp. CEJ40-10 using starchy substrate. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 9 fev. 2023.

BERLANGA, M.; PALAU, M.; GUERRERO, R. Community homeostasis of coastal microbial mats from the Camargue during winter (cold) and summer (hot) seasons. **Ecosphere**, v. 13, n. 2, fev. 2022.

BERLANGA, M. et al. Rapid spectrofluorometric screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *Internacional Microbiology*, v.9, p. 95-102, fev.2006

BERNARD, R. J.; MORTAZAVI, B.; KLEINHUIZEN, A. A. Dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) seasonally dominates NO₃ – reduction pathways in an anthropogenically impacted sub-tropical coastal lagoon. **Biogeochemistry**, v. 125, n. 1, p. 47–64, ago. 2015.

BERTAGNOLLI, A. D.; KONSTANTINIDIS, K. T.; STEWART, F. J. Non-denitrifier nitrous oxide reductases dominate marine biomes. **Environmental Microbiology Reports**, v. 12, n. 6, p. 681–692, dez. 2020.

BERTUCCI, T. C. P. et al. TURISMO E URBANIZAÇÃO: OS PROBLEMAS AMBIENTAIS DA LAGOA DE ARARUAMA – RIO DE JANEIRO. n. 4, 2016.

BIBENS, L. et al. A Review of Fatty Acid Biosynthesis Enzyme Inhibitors as Promising Antimicrobial Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 3, p. 425, 10 mar. 2023.

BOLHUIS, H; CRETOIU, M.S; STAL, L.J. Molecular ecology of microbial mats. **FEMS Microbiology Ecology**, 1 nov. 2014.

BORAH, D. et al. Biolubricant potential of exopolysaccharides from the cyanobacterium *Cyanothece epiphytica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 8, p. 3635–3647, abr. 2018.

BOZBEYOGLU, N. N. et al. Calcium Carbonate Precipitation by Urease and Carbonic Anhydrase Positive Bacteria. **Pamukkale University Journal of Engineering Sciences**, v. 26, n. 3, p. 513–518, 2020.

BRAKER, G.; FESEFELDT, A.; WITZEL, K.-P. Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3769–3775, out. 1998.

BRAMMER, S.P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7p.html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 3). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do03.htm>. Acesso em: 17 Out.2023

BRANCO, N. M. C. et al. Ocorrência de antimicrobianos em águas superficiais e residuais do Município do Rio de Janeiro: uma questão de vulnerabilidade

ambiental e de saúde pública. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e415101019000, 15 ago. 2021.

BRAVO, G.B.G. Resistência aos metais cobre, chumbo, cromo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas em ambiente aquático. 2018. 44f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)**, UTFPR, Londrina, 2018. Disponível em:< <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3066> >. Acesso em: 27 ago.2023

BROWN, B.; WILKINS, M.; SAHA, R. Rhodopseudomonas palustris: A biotechnology chassis. **Biotechnology Advances**, v. 60, p. 108001, nov. 2022.

BURT, C. D. et al. Urea Hydrolysis and Calcium Carbonate Precipitation in Gypsum-Amended Broiler Litter. **Journal of Environmental Quality**, v. 47, n. 1, p. 162–169, jan. 2018.

BUT, S. Y. et al. Serine-glyoxylate aminotranferases from methanotrophs using different C1-assimilation pathways. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 5, p. 741–751, maio 2019.

CABRERA, MA. Á.; BLAMEY, J. M. Biotechnological applications of archaeal enzymes from extreme environments. **Biological Research**, v. 51, n. 1, p. 37, dez. 2018.

CAPENESS, M. J.; EDMUNDSON, M. C.; HORSFALL, L. E. Nickel and platinum group metal nanoparticle production by *Desulfovibrio alaskensis* G20. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 727–731, dez. 2015.

CARDOSO, D. C. et al. Seasonal development of a coastal microbial mat. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 9035, 21 jun. 2019.

CARPINE, R. et al. Industrial Production of Poly- β -hydroxybutyrate from CO₂: Can Cyanobacteria Meet this Challenge? **Processes**, v. 8, n. 3, p. 323, 10 mar. 2020.

CARREIRA, C. et al. Fungi and viruses as important players in microbial mats. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 11, p. fiae187, 28 out. 2020.

CARR, S.; BUAN, N. R. Insights into the biotechnology potential of *Methanosarcina*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1034674, 15 dez. 2022.

CARVALHO, C. et al. Stromatolite Growth in Lagoa Vermelha, Southeastern Coast of Brazil: Evidence of Environmental Changes. **Radiocarbon**, v. 60, n. 2, p. 383–393, abr. 2018.

CASTANIER, S.; MÉTAYER-LEVREL, G. L.; PERTHUISOT, J.-P. Bacterial Roles in the Precipitation of Carbonate Minerals. Em: RIDING, R. E.; AWRAMIK, S. M. (Eds.). **Microbial Sediments**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 32–39.

CASTRO-ALONSO, M. J. et al. Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation (MICP) and Its Potential in Bioconcrete: Microbiological and Molecular Concepts. **Frontiers in Materials**, v. 6, p. 126, 10 jun. 2019.

CASTRO-FERNANDEZ, Victor et al. Chapter 2 - Evolution, Metabolism and Molecular Mechanisms Underlying Extreme Adaptation of Euryarchaeota and its Biotechnological Potential. Em: HAITHAM SGHAIER; AFEF NAJJARI; KAIS GHEDIRA (Eds). **Archaea-New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications**, Croatia: Intechopen, 2017. p 13–30. Disponível em < <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=T22PDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA11&dq=Euryarchaeota+&ots=6XlfsuV2GF&sig=1keGioccPqz9Y-X-O2QR74fs5ZA#v=onepage&q=Euryarchaeota&f=false> >. Acesso em: 26 ago. 2023

CHAGAS, T.P.G. Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro. 2011. 129f. **Dissertação (Mestrado em Ciências) – Medicina Tropical**, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em:< <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/6963> >. Acesso em: 27 ago.2023

CHANG, W.; UM, Y.; HOLOMAN, T. R. P. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation Coupled to Methanogenesis. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 6, p. 425–430, mar. 2006.

CHEN, G.-Q. et al. PHA/PHB. Em: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 217–227.

CHEVREUX, B; WETTER, T; SUHAI, S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information in computer science and biology. Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB), Accra, 1999.

CHISTOSERDOVA, L. Recent progress and new challenges in metagenomics for biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 10, p. 1351–1359, out. 2010.

CHOI, S.-G. et al. Review on geotechnical engineering properties of sands treated by microbially induced calcium carbonate precipitation (MICP) and biopolymers. **Construction and Building Materials**, v. 246, p. 118415, jun. 2020.

CIESIELSKI, S. Cultivation-Dependent and -Independent Characterization of Microbial Community Producing Polyhydroxyalkanoates from Raw Glycerol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 853–861, 28 maio 2010.

CLARES, M. E.; GUERRERO, M. G.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. Cadmium removal by *Anabaena* sp. ATCC 33047 immobilized in polyurethane foam. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 5, p. 1793–1798, maio 2015.

COOKSLEY, C. M. et al. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone–butanol–ethanol fermentation pathway. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 6, p. 630–641, nov. 2012.

CORRÊA, M. S. P. D. O. et al. ECOLOGIA BACTERIANA NA LAGOA DE ARARUAMA DO ESTADO RIO DE JANEIRO. **Semioses**, v. 13, n. 1, p. 47–59, 12 mar. 2019.

COSTA, E. D. C. P. et al. MAPEAMENTO MULTITEMPORAL E CADASTRAL DAS SALINAS DA LAGOA DE ARARUAMA – RJ. **GEOgraphia**, v. 24, n. 53, 22 jul. 2022.

COSTA, E. D. C. P.; SEABRA, V. D. S. DINÂMICAS NATURAIS E ATIVIDADES SOCIOECONÔMICAS NA PLANÍCIE COSTEIRA DA LAGOA DE ARARUAMA – RJ. **Formação (Online)**, v. 27, n. 52, 18 jan. 2021.

COUTINHO, F. H. et al. Antibiotic Resistance is Widespread in Urban Aquatic Environments of Rio de Janeiro, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 3, p. 441–452, out. 2014.

CRUZ-GARCÍA, C. et al. Respiratory Nitrate Ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 2, p. 656–662, 15 jan. 2007.

CUDE, W. N. et al. Production of the Antimicrobial Secondary Metabolite Indigoidine Contributes to Competitive Surface Colonization by the Marine Roseobacter *Phaeobacter* sp. Strain Y4I. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4771–4780, 15 jul. 2012.

CUI, Y.-W. et al. The effects of salinity on nitrification using halophilic nitrifiers in a Sequencing Batch Reactor treating hypersaline wastewater. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24825, 25 abr. 2016

DAȔBROWSKA, K. et al. Immunogenicity Studies of Proteins Forming the T4 Phage Head Surface. **Journal of Virology**, v. 88, n. 21, p. 12551–12557, nov. 2014.

DAMAZIO, C. M.; SENRA, M. C. E. Correlações entre cianobactérias endolíticas e esteiras microbianas hipersalinas da Lagoa Pitanguinha, Neokuaternário do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Universidade Guarulhos**, v.6, p 11-16, dez 2005.

DAMAZIO, C; SILVA E SILVA, L.H. Cianobactérias em esteiras microbianas coliformes da lagoa Pitanguinha, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Paleontologia**, v. 9, n. 1, p. 165–170, 30 abr. 2006.

DE ARAUJO, C. F. M. et al. Detection of Carbapenemase Genes in Aquatic Environments in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4380–4383, jul. 2016.

DECLEYRE, H. et al. Dissimilatory nitrogen reduction in intertidal sediments of a temperate estuary: small scale heterogeneity and novel nitrate-to-ammonium reducers. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 14 out. 2015.

DEFALCO, T. Caracterização de bactérias resistentes a metais pesados e o potencial para biorremediação. 2022. 95f. **Dissertação (Mestrado em Ciências – Microbiologia Agrícola)**, USP, São Paulo, 2022. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-09062022-152749/en.php>>. Acesso em: 27 ago.2023

DE VOGEL, F. A. et al. Comparative Genomics of Marine Bacteria from a Historically Defined Plastic Biodegradation Consortium with the Capacity to Biodegrade Polyhydroxyalkanoates. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 186, 16 jan. 2021.

DHAMI, N. K. Biomineralization of Calcium Carbonate Polymorphs by the Bacterial Strains Isolated from Calcareous Sites. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 707–714, maio 2013.

DHAMI, N. K.; REDDY, M. S.; MUKHERJEE, A. Application of calcifying bacteria for remediation of stones and cultural heritages. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 26 jun. 2014.

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

DO AMARAL, S. C. et al. Determination of Volatile Organic Compounds and Antibacterial Activity of the Amazonian Cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain GFB01. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4744, 16 out. 2020.

DONG, L. F. et al. Changes in Benthic Denitrification, Nitrate Ammonification, and Anammox Process Rates and Nitrate and Nitrite Reductase Gene Abundances along an Estuarine Nutrient Gradient (the Colne Estuary, United Kingdom). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 10, p. 3171–3179, 15 maio 2009.

DUARTE-NASS, C. et al. Application of microbe-induced carbonate precipitation for copper removal from copper-enriched waters: Challenges to future industrial application. **Journal of Environmental Management**, v. 256, p. 109938, fev. 2020.

DUMINA, M. et al. A Novel L-Asparaginase from Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus sibiricus*: Heterologous Expression and Characterization for Biotechnology Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 9894, 13 set. 2021.

DUPRAZ, C. et al. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. **Earth-Science Reviews**, v. 96, n. 3, p. 141–162, out. 2009.

DUPRAZ, C.; VISSCHER, P. T. Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 429–438, set. 2005.

EHRlich, H. Geomicrobiology: its significance for geology. **Earth-Science Reviews**, v. 45, n. 1–2, p. 45–60, nov. 1998.

EL-MALEK, F. A. et al. The sustainability of microbial bioplastics, production and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 319–328, ago. 2020.

EL SEMARY, N. A.; FOU DA, M. Anticancer activity of *Cyanothece* sp. strain extracts from Egypt: First record. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 12, p. 992–995, dez. 2015.

ELTARAHONY, M. et al. **Calcite and vaterite biosynthesis by nitrate dissimilating bacteria in carbonatogenesis process under aerobic and anaerobic conditions**. [s.l.] Biogeochemistry: Biomineralization, 16 dez. 2019. Disponível em: <<https://bg.copernicus.org/preprints/bg-2019-444/>>. Acesso em: 29 ago. 2023.

ERŞAN, Y. Ç. et al. Nitrate reducing CaCO₃ precipitating bacteria survive in mortar and inhibit steel corrosion. **Cement and Concrete Research**, v. 83, p. 19–30, maio 2016.

FAIRCHILD, T. R; SALLUN FILHO, W. *Collenia Itapevensis*, o primeiro fóssil pré-cambriano brasileiro e sua importância no estudo de estromatólitos no Brasil. Geologia do continente sul-americano: evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida. Tradução. São Paulo: **Beca**, 2004. Disponível em < <https://repositorio.usp.br/item/001416444>.>. Acesso em: 15 jun.2023.

FAO. Fisheries Technical Paper, n 137 - Manual of Methods in Aquatic Environment Research, 1975, p.154-156.

FARIAS, T.F.G. Seleção de *Enterococcus* sp. resistente a cobre e a mercúrio com potencial aplicação na biorremediação. 2016. 46f. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Ambiental)**, UTFPR, Londrina, 2016. Disponível em:< <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12101> >. Acesso em: 27 ago.2023

FEDER, F. et al. Cyanobacterial Composition of Microbial Mats, Found in Brejo do Espinho and in Artificial Saline of Araruama, RJ, Brazil. **Advances in Microbiology**, v. 03, n. 06, p. 47–54, 2013.

FERNANDES, K.C.B. Poluentes químicos e biológicos em ambientes aquáticos e seus impactos na estrutura e no resistoma móvel de comunidades microbianas. 2019. 175f. **Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde**, ICQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2019. Disponível em:< <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/53180> >. Acesso em: 27 ago.2023

FERNÁNDEZ, J. et al. Antitumor bioactivity and gut microbiota modulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in a rat animal model for colorectal cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 203, p. 638–649, abr. 2022.

FISTAROL, G. O. et al. Environmental and Sanitary Conditions of Guanabara Bay, Rio de Janeiro. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 20 nov. 2015.

FOSTER, A. et al. The repertoire of nitrogen assimilation in *Rhodococcus*: catalysis, pathways and relevance in biotechnology and bioremediation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 89, n. 6, p. 787–802, jun. 2014.

FRANKS, J.; STOLZ, J. F. Flat laminated microbial mat communities. **Earth-Science Reviews**, v. 96, n. 3, p. 163–172, out. 2009.

FUSETANI, N. Antifouling marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 28, n. 2, p. 400–410, 2011.

GANESH KUMAR, A. et al. Biodegradation of complex hydrocarbons in spent engine oil by novel bacterial consortium isolated from deep sea sediment. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 556–564, out. 2014.

GAREEV, K. G. et al. Magnetotactic Bacteria and Magnetosomes: Basic Properties and Applications. **Magnetochemistry**, v. 7, n. 6, p. 86, 18 jun. 2021

GARLAPATI, D. et al. Role of cyanobacteria in agricultural and industrial sectors: an outlook on economically important byproducts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 12, p. 4709–4721, jun. 2019.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F. The metagenomics worldwide research. **Current Genetics**, v. 63, n. 5, p. 819–829, out. 2017

GAZITÚA, M. C. et al. Potential virus-mediated nitrogen cycling in oxygen-depleted oceanic waters. **The ISME Journal**, v. 15, n. 4, p. 981–998, abr. 2021.

GEOPARQUE COSTÕES E LAGUNAS DO RIO DE JANEIRO. **Araruama**. Disponível em: < <https://www.geoparquecostoeselagunas.com/araruama/>>. Acesso em: 08 jul.2023

GERDES, G. What are Microbial Mats? Em: SECKBACH, J.; OREN, A. (Eds.). **Microbial Mats**. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. v. 14p. 3–25.

GIBLIN, A. et al. The Importance of Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium (DNRA) in the Nitrogen Cycle of Coastal Ecosystems. **Oceanography**, v. 26, n. 3, p. 124–131, 1 set. 2013.

GIL, J. F. et al. Viruses in Extreme Environments, Current Overview, and Biotechnological Potential. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 81, 8 jan. 2021.

GOMES, S.B.V.C. Composição Geomicrobiológica e Orgânica das Esteiras Microbianas de Três Lagoas Costeiras do Sudeste do Rio de Janeiro, Brasil.

2011. 264f. **Tese (Doutorado em Ciências - Geologia) - Instituto de Geociências**, UFRJ, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: < chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcgclclefindmkaj/https://www.geologia.ufrj.br/images/documentos/Teses_e_Disserta%C3%A7%C3%B5es/2011/Teses/Sinda_Beatriz_Gomes_Doutorado.pdf >. Acesso em: 16 jun.2023

GONZÁLEZ LÓPEZ, C. V. et al. Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO₂ removal processes. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5904–5910, dez. 2009.

GONZÁLEZ, P. J. et al. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 5–6, p. 1015–1023, maio 2006.

GÖRGEN, S. et al. The diversity of molecular mechanisms of carbonate biomineralization by bacteria. **Discover Materials**, v. 1, n. 1, p. 2, dez. 2021.

GRADÍSSIMO, D.G. et al. Capítulo 22 - Potencial produção de biomaterial pela cianobactéria amazônia *Tolypothrix* sp. CACIAM 22. In: SILVA NETO, BENEDITO RODRIGUES (Eds). A produção do conhecimento nas ciências da saúde. Ponta Grossa, PR: Atena, 2019, v.1, p. 213-224. Disponível em: < <https://livroaberto.ufpa.br/jspui/handle/prefix/774>. Acesso em: 29 ago.2023

GRENNI, P.; ANCONA, V.; BARRA CARACCILO, A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 25–39, jan. 2018.

GREWE, C. B.; PULZ, O. The Biotechnology of Cyanobacteria. Em: WHITTON, B. A. (Ed.). **Ecology of Cyanobacteria II**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 707–739.

GUASTALLI, E.A.L. Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de pintainhas de reposição de postura. 2010. 75f. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia – Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, UNESP, São Paulo, 2010. Disponível em:< <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/94898> >. Acesso em: 27 ago.2023

GUÉZENNEC, J. et al. Microbial mats in French Polynesia and their biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 16–22, jan. 2011.

HAI, T. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Accumulation in Sulfate-Reducing Bacteria and Identification of a Class III PHA Synthase (PhaEC) in *Desulfococcus multivorans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4440–4448, ago. 2004.

HAMMES, F.; VERSTRAETE*, W. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. **Reviews in Environmental Science and BioTechnology**, v. 1, n. 1, p. 3–7, mar. 2002.

- HAN, D. et al. Biology and Biotechnology of Edible *Nostoc*. Em: RICHMOND, A.; HU, Q. (Eds.). **Handbook of Microalgal Culture**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2013. p. 433–444.
- HARRISON, J. J.; CERI, H.; TURNER, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 928–938, dez. 2007.
- HATAF, N.; BAHARIFARD, A. Reducing Soil Permeability Using Microbial Induced Carbonate Precipitation (MICP) Method: A Case Study of Shiraz Landfill Soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, n. 2, p. 147–158, 7 fev. 2020.
- HAUSINGER, R. P. Metabolic Versatility of Prokaryotes for Urea Decomposition. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2520–2522, maio 2004.
- HAYASHIDA, G. et al. Characterization of a Chlorophyta microalga isolated from a microbial mat in Salar de Atacama (northern Chile) as a potential source of compounds for biotechnological applications: Microalga from a microbial mat. **Phycological Research**, v. 65, n. 3, p. 202–211, jul. 2017
- HENSTRA, A. M. et al. Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 200–206, jun. 2007.
- HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E. et al. Physico-chemical Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced by *Halomonas salina*, Isolated from a Hypersaline Microbial Mat. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 5, p. 1105–1111, maio 2019.
- HUBER, H. Euryarchaeota. Em: JOHN WILEY & SONS, LTD (Ed.). **Encyclopedia of Life Sciences**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2006.
- HÜLSEN, T.; HSIEH, K.; BATSTONE, D. J. Saline wastewater treatment with purple phototrophic bacteria. **Water Research**, v. 160, p. 259–267, set. 2019.
- HUSSEIN, H. et al. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 0–0, 15 abr. 2004
- HU, Y. et al. Construction and Preliminary Analysis of a Deep-Sea Sediment Metagenomic Fosmid Library from Qiongdongnan Basin, South China Sea. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 719–727, nov. 2010.
- IESPA, A.; IESPA, C. Cyanobacterial and sedimentary composition in polygonal microbial mats from Pernambuco Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil. **Gaea - Journal of Geoscience**, v. 5, n. 1, p. 35–41, 6 ago. 2009.
- JAHNERT, R. J.; COLLINS, L. B. Characteristics, distribution and morphogenesis of subtidal microbial systems in Shark Bay, Australia. **Marine Geology**, v. 303–306, p. 115–136, mar. 2012.

JAIN, S.; FANG, C.; ACHAL, V. A critical review on microbial carbonate precipitation via denitrification process in building materials. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 7529–7551, 1 jan. 2021.

JANG, J. et al. Presence of Cu-Type (NirK) and *cd*₁-Type (NirS) Nitrite Reductase Genes in the Denitrifying Bacterium *Bradyrhizobium nitroreducens* sp. nov. **Microbes and Environments**, v. 33, n. 3, p. 326–331, 2018.

JANSSEN, A. J. H. et al. Application of bacteria involved in the biological sulfur cycle for paper mill effluent purification. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 4, p. 1333–1343, fev. 2009.

JANSSON, C.; NORTHEN, T. Calcifying cyanobacteria—the potential of biomineralization for carbon capture and storage. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 365–371, jun. 2010.

KAMENNAYA, N. et al. Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization. **Minerals**, v. 2, n. 4, p. 338–364, 29 out. 2012.

KANAMORI, T. et al. Enzymatic Characterization of a Prokaryotic Urea Carboxylase. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2532–2539, maio 2004.

KANOKSILAPATHAM, W.; INTAGUN, W. A Review: Biodegradation and Applications of Keratin Degrading Microorganisms and Keratinolytic Enzymes, Focusing on Thermophiles and Thermostable Serine Proteases. **American Journal of Applied Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1016–1023, 1 nov. 2017.

KARMANN, S.; PANKE, S.; ZINN, M. Fed-Batch Cultivations of *Rhodospirillum rubrum* Under Multiple Nutrient-Limited Growth Conditions on Syngas as a Novel Option to Produce Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB). **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 59, 2 abr. 2019.

KARRAY, F. et al. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by *Haloarcula*, *Halorubrum*, and *Natrinema* Haloarchaeal Genera Using Starch as a Carbon Source. **Archaea**, v. 2021, p. 1–10, 26 jan. 2021.

KATAOKA, N. et al. Butyrate production under aerobic growth conditions by engineered *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 5, p. 562–568, maio 2017.

KATAYAMA, N.; IJIMA, H.; OSANAI, T. Chapter 7 - Production of Bioplastic Compounds by Genetically Manipulated and Metabolic Engineered Cyanobacteria. Em: ZHANG, W.; SONG, X. (Eds.). **Synthetic Biology of Cyanobacteria**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 1080p. 155–169.

KAVITHA, G.; RENGASAMY, R.; INBAKANDAN, D. Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 111, p. 102–108, maio 2018.

KEBBOUCHE-GANA, S. et al. Isolation and characterization of halophilic Archaea able to produce biosurfactants. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 727–738, maio 2009.

KEIM, C. N. et al. Structure, Behavior, Ecology and Diversity of Multicellular Magnetotactic Prokaryotes. Em: SCHÜLER, D. (Ed.). **Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria**. Microbiology Monographs. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2007. v. 3p. 103–132.

KEMAVONGSE, K. et al. Effect of co-substrate on production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and copolymer PHBV from newly identified mutant *Rhodobacter sphaeroides* U7 cultivated under aerobic-dark condition. v. 29, n. 4, 2007.

KIM, J. et al. *Ruegeria lutea* sp. nov., isolated from marine sediment, Masan Bay, South Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 2854–2861, 1 set. 2019.

KOROTKOVA, N. et al. Glyoxylate Regeneration Pathway in the Methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1750–1758, 15 mar. 2002.

KRAUSE, S. et al. Marine ammonification and carbonic anhydrase activity induce rapid calcium carbonate precipitation. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 243, p. 116–132, dez. 2018.

KUMAR, V.; KUMAR, S.; SINGH, D. Microbial polyhydroxyalkanoates from extreme niches: Bioprospection status, opportunities and challenges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 147, p. 1255–1267, mar. 2020.

KUMAR, J. et al. Chapter 16 - Cyanobacteria: Applications in Biotechnology. Em: A.K. Mishra, D.N. Tiwari, A.N. Rai (Eds). **Cyanobacteria**. Elsevier, 2019. p. 327–346. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128146675000167>>. Acesso em: 26 ago.2023

KUTTER, V.T. Biogeoquímica de metais na cadeia trófica pelágica da área de ressurgência de Cabo Frio sudeste do Brasil. 2011. 194f. **Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental)**, UFF, Niterói, 2011. Disponível em: <<https://app.uff.br/riuff/handle/1/6890>>. Acesso em: 27 ago.2023

LADD, J. N.; JACKSON, R. B. Biochemistry of Ammonification. Em: STEVENSON, F. J. (Ed.). **Agronomy Monographs**. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2015. p. 173–228.

LAUT, L. et al. Organic matter compounds as a tool for trophic state characterization in a hypersaline environment: Araruama Lagoon, Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 97, p. 102403, jan. 2020.

LEE, J. et al. Recent progress and challenges in microbial polyhydroxybutyrate (PHB) production from CO₂ as a sustainable feedstock: A state-of-the-art review. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 125616, nov. 2021.

LEIBETSEDER, A. Sustainable production of PHB y utilizing C₁ compounds as carbon source. 2022. 83f. **Diploma Thesis**, Technische Universitat Wien, 2023. Disponível em: <<https://repositum.tuwien.at/handle/20.500.12708/142598>>. Acesso em: 27 ago.2023

LEITE, M.G.H. Relacionando impactos ambientais às atividades salineiras: o que sabemos sobre isso?. 27f. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas)**, UFRGS, 2023. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcgclcfindmkaj/https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/258652/001169557.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 jun.2023

LEEPRASERT, L.; CHONUDDOMKUL, D.; BOONMAK, C. Biocalcifying Potential of Ureolytic Bacteria Isolated from Soil for Biocementation and Material Crack Repair. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 963, 3 maio 2022.

LEY, R. E. et al. Unexpected Diversity and Complexity of the Guerrero Negro Hypersaline Microbial Mat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3685–3695, maio 2006.

LIAO, Y.-T. et al. Characterization of a T4-like Bacteriophage vB_EcoM-Sa45lw as a Potential Biocontrol Agent for Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O45 Contaminated on Mung Bean Seeds. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. e02220-21, 23 fev. 2022.

LI, D. et al. Controlling microbial PHB synthesis via CRISPRi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 14, p. 5861–5867, jul. 2017.

LI, L.-G.; XIA, Y.; ZHANG, T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. **The ISME Journal**, v. 11, n. 3, p. 651–662, mar. 2017.

LI, X.; YU, H.-Y. Characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Haloarcula* sp. G41 and its application for biodiesel production. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 6, p. 455–463, nov. 2014

LI, Y. et al. Potential of acetone-butanol-ethanol (ABE) as a biofuel. **Fuel**, v. 242, p. 673–686, abr. 2019.

LIN, W. et al. Microbially Induced Desaturation and Carbonate Precipitation through Denitrification: A Review. **Applied Sciences**, v. 11, n. 17, p. 7842, 25 ago. 2021.

LIN, Y.; BOESE, C. J.; ST. MAURICE, M. The urea carboxylase and allophanate hydrolase activities of urea amidolyase are functionally independent: Functional Independence in Urea Amidolyase. **Protein Science**, v. 25, n. 10, p. 1812–1824, out. 2016.

LIU, Y. et al. Single-particle analysis of urea amidolyase reveals its molecular mechanism. **Protein Science**, v. 29, n. 5, p. 1242–1249, maio 2020.

LOPES, G.P.D.F et al. Bioprospecção Marinha: Das ciências do mar às ciências da saúde em busca de novos compostos bioativos com potencial antineoplásico. **Revista Pesquisa Naval**, n.32, p. 3-8, Rio de Janeiro, 2020.

LÓPEZ-CORTÉS, A.; LANZ-LANDÁZURI, A.; GARCÍA-MALDONADO, J. Q. Screening and Isolation of PHB-Producing Bacteria in a Polluted Marine Microbial Mat. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 1, p. 112–120, jul. 2008.

LUENGO, J. M. et al. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 251–260, jun. 2003.

MADIGAN, M.T et al. Capítulo 15: Diversidade Microbiana. In: _____. **Microbiologia de Brock**. Tradução: Alice Freitas Versiani et al. Revisão Técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p. 480.

MAMLOUK, D.; GULLO, M. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 377–384, dez. 2013.

MANALI SHAH et al. Bioplastic for future: A review then and now. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 9, n. 2, p. 056–067, 28 fev. 2021.

MARINHO, RODRIGO. Mais salgada que o mar e 100 vezes maior que a Rodrigo de Freitas: conheça a Lagoa de Araruama - que não é lagoa. **G1 - Região dos Lagos**. Região dos Lagos, 26 jun. 2022. Disponível em <<https://g1.globo.com/rj/regiao-dos-lagos/noticia/2022/06/26/mais-salgada-que-o-mar-e-100-vezes-maior-que-a-rodrigo-de-freitas-conheca-a-lagoa-de-araruama-que-nao-e-lagoa.ghtml>>. Acesso em: 23 jun.2023

MARTIN, D. et al. Carbonate Precipitation under Pressure for Bioengineering in the Anaerobic Subsurface via Denitrification. **Environmental Science & Technology**, p. 130709154540005, 9 jul. 2013.

MARTÍNEZ-GUTIÉRREZ, C. A. et al. Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, Mexico. **PeerJ**, v. 6, p. e4780, 7 maio 2018.

MARTINS, J.; SILVEIRA, T. S. Salinity dependence of the distribution of multicellular magnetotactic prokaryotes in a hypersaline lagoon. **International Microbiology**, n. 12, p. 193–201, 2009.

MAZA-MÁRQUEZ, P.; LEE, M. D.; BEBOUT, B. M. **Community ecology and functional potential of bacteria, archaea, eukarya and viruses in Guerrero Negro microbial mat**. [s.l.] In Review, 10 nov. 2022. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-2236973/v1>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

MEIRELLES, P.M. et al. Genômica, Metagenômica e Ferramentas de Anotação. In: THOMPSON, F.; THOMPSON, C (Edição). **Biociencia e Biotecnologia Marina**. Rio Grande, FURG, 2020. p. 271-284

MENG, D.-C.; CHEN, G.-Q. Synthetic Biology of Polyhydroxyalkanoates (PHA). Em: ZHAO, H.; ZENG, A.-P. (Eds.). **Synthetic Biology – Metabolic Engineering**. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Cham: Springer International Publishing, 2017. v. 162p. 147–174.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, v. 9, n. 1, p. 386, dez. 2008.

MEZZOLLA, V.; D'URSO, O.; POLTRONIERI, P. Role of PhaC Type I and Type II Enzymes during PHA Biosynthesis. *Polymers*, v. 10, n. 8, p. 910, 13 ago. 2018.

MOOPANTAKATH, J. et al. Bioactive molecules from haloarchaea: Scope and prospects for industrial and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1113540, 31 mar. 2023.

MÜLLER, VOLKER. Bacterial Fermentation. Encyclopedia of Life Sciences. EM: JOHN WILEY E SONS, LTD (Ed). 2001. Disponível em: < chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://userfiles.educatorpages.com/userfiles/fwpasci/biology/U3bacterialfermentation.pdf >. Acesso em: 27 ago. 2023

NANDA, S. et al. Innovations in applications and prospects of bioplastics and biopolymers: a review. *Environmental Chemistry Letters*, v. 20, n. 1, p. 379–395, fev. 2022

NANDAKUMAR, A.; CHUAH, J.-A.; SUDESH, K. Bioplastics: A boon or bane? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 147, p. 111237, set. 2021.

NARANCIC, T. et al. Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation. *Polymers*, v. 12, n. 4, p. 920, 15 abr. 2020.

NARANJO, J. M. et al. Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 38–44, abr. 2013.

NAVEED, M. et al. Application of microbially induced calcium carbonate precipitation with urea hydrolysis to improve the mechanical properties of soil. *Ecological Engineering*, v. 153, p. 105885, jun. 2020.

NISHIOKA, M. et al. Metabolic flux analysis of a poly- β -hydroxybutyrate producing cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, grown under photoautotrophic conditions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 7, n. 5, p. 295–302, out. 2002.

NGUYEN, S. T. T. et al. Bacterial community structure and metabolic potential in microbialite-forming mats from South Australian saline lakes. **Geobiology**, v. 20, n. 4, p. 546–559, jul. 2022.

OBEROI, A. S.; PHILIP, L.; BHALLAMUDI, S. M. Biodegradation of Various Aromatic Compounds by Enriched Bacterial Cultures: Part A–Monocyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 7, p. 1870–1888, ago. 2015.

OBRUCA, S. et al. Novel unexpected functions of PHA granules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 11, p. 4795–4810, jun. 2020.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877–886, maio 2015.

OMOREGIE, A. I.; PALOMBO, E. A.; NISSOM, P. M. Bioprecipitation of calcium carbonate mediated by ureolysis: A review. **Environmental Engineering Research**, v. 26, n. 6, p. 200379–0, 22 nov. 2020.

PACTON, M. et al. Viruses as new agents of organomineralization in the geological record. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 4298, 3 jul. 2014.

PAL, C. et al. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 964, dez. 2015.

PAL, C. et al. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. Em: **Advances in Microbial Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 70p. 261–313.

PALENIK, B.; MOREL, F. M. M. Amino acid utilization by marine phytoplankton: A novel mechanism. **Limnology and Oceanography**, v. 35, n. 2, p. 260–269, mar. 1990.

PARANHOS, R. Alguns métodos para análise de água. 1996. 200p. **Cadernos didáticos - Sub-Reitoria de Ensino de Graduação e Corpo Discente/SR-1**, UFRJ, Rio de Janeiro, 1996.

PARWANI, L.; BHATT, M.; SINGH, J. Potential Biotechnological Applications of Cyanobacterial Exopolysaccharides. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, p. e21200401, 2021.

PENNAFIRME, S. et al. Characterization of microbial mats and halophilic virus-like particles in a eutrophic hypersaline lagoon (Vermelha Lagoon, RJ, Brazil). **Regional Studies in Marine Science**, v. 31, p. 100769, set. 2019.

PEREIRA, L.F.M. Licenciamento ambiental, repensando a ferramenta: estudo de caso em tipologias não industriais nos ecossistemas costeiros na Região dos Lagos no Rio de Janeiro. 2004. 202f. **Dissertação (Mestrado em Ciência**

Ambiental) – Instituto de Geociências, UFF, Niterói, 2004. Disponível em: <<https://app.uff.br/riuff/handle/1/17250>>. Acesso em: 27 ago.2023

PERITO, B.; MARVASI, M.; MASTROMEI, G. Bacterial mineralization of calcium carbonate for conservation of stone artworks. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 949, n. 1, p. 012090, 1 nov. 2020.

PINTO, L. H. et al. Complete genome sequence of *Haloferax gibbonsii* strain ARA6, a potential producer of polyhydroxyalkanoates and halocins isolated from Araruama, Rio de Janeiro, Brasil. **Journal of Biotechnology**, v. 212, p. 69–70, out. 2015.

POLI, A. et al. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Archaea**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 552–560, 1 mar. 2005.

POUS, N. et al. Opportunities for groundwater microbial electro-remediation. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 119–135, jan. 2018.

PRABHAKARAN, P.; ASHRAF, M. A.; AQMA, W. S. Microbial stress response to heavy metals in the environment. **RSC Advances**, v. 6, n. 111, p. 109862–109877, 2016.

PRIETO-BARAJAS, C. M.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 31, p. 48–56, jan. 2018.

PRIMO, P. B. DA S.; BIZERRIL, C. R. S. F. **Lagoa de Araruama: perfil ambiental do maior ecossistema lagunar hipersalino do mundo**. Rio de Janeiro, RJ: Projeto PLANÁGUA SEMADS/GTZ de Cooperação Técnica Brasil-Alemanha, 2002.

QI, P. et al. Bio-augmentation with dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) driven sulfide-oxidizing bacteria enhances the durability of nitrate-mediated souring control. **Water Research**, v. 219, p. 118556, jul. 2022.

RAMOS, V. M. C. et al. Cyanobacterial Diversity in Microbial Mats from the Hypersaline Lagoon System of Araruama, Brazil: An In-depth Polyphasic Study. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1233, 30 jun. 2017.

RASUK, M. C. et al. Bacterial Diversity in Microbial Mats and Sediments from the Atacama Desert. **Microbial Ecology**, v. 71, n. 1, p. 44–56, jan. 2016.

REGEA, G. Review on antibiotics resistance and its economic impacts. *Journal of Pharmacology e Clinical Research*. 2018, v.5. Disponível em: <<chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://juniperpublishers.com/jpcr/pdf/JPCR.MS.ID.555675.pdf>>. Acesso em: 27 ago.2023

REID, P. et al. Microbial Processes Forming Marine Stromatolites: Microbe-Mineral Interactions with a Three-Billion-Year Rock Record. Em: KRUMBEIN, W. E.; PATERSON, D. M.; ZAVARZIN, G. A (Eds.). **Fossil and Recent Biofilms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 103–118.

RIBEIRO, LUIZA. Lagoa de Araruama: Maior Ecossistema Lagunar Hipersalino do Mundo. **Aquafluxus - Consultoria Ambiental em Recursos Hídricos**. Rio de

Janeiro, 13 mai. 2013. Seção: Meio Ambiente. Disponível em < <https://www.aquafluxus.com.br/lagoa-de-araruama-maior-ecossistema-lagunar-hipersalino-do-mundo/?lang=em> >. Acesso em: 22 jun.2023

RIDING, R. Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms: *Microbial carbonates*. **Sedimentology**, v. 47, p. 179–214, fev. 2000.

RIDING, R. Microbialites, Stromatolites and Thrombolites. In: REITNER, J.; THIEL, V (Edição). **Encyclopedia of Geobiology**. Encyclopedia of Earth Science Series, Heidelberg, Springer, 2011. p. 635-654

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annual Review of Genetics**, v. 38, n. 1, p. 525–552, 1 dez. 2004

RINKE, C. et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, v. 499, n. 7459, p. 431–437, 25 jul. 2013.

ROCHA, L.; BORGHI, L. Microbial Mat Microbiofacies Analysis of the Pitanguinha Lagoon (Região dos Lagos, RJ, Brazil). **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**, v. 40, n. 1, p. 191–205, 30 jan. 2018.

RODRÍGUEZ LORENZO, F. et al. Monitoring PHB production in *Synechocystis* sp. with hyperspectral images. **Water Science and Technology**, v. 86, n. 1, p. 211–226, 1 jul. 2022.

ROESELERS, G. et al. Diversity of phototrophic bacteria in microbial mats from Arctic hot springs (Greenland). **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 26–38, jan. 2007.

ROMANO, A. H.; CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. **Research in Microbiology**, v. 147, n. 6–7, p. 448–455, jul. 1996.

ROTTER, A. et al. The Essentials of Marine Biotechnology. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 629629, 16 mar. 2021.

RUSMANA, I.; NEDWELL, D. B. Use of chlorate as a selective inhibitor to distinguish membrane-bound nitrate reductase (Nar) and periplasmic nitrate reductase (Nap) of dissimilative nitrate reducing bacteria in sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 3, p. 379–386, jun. 2004.

RUVINDY, R. et al. Unravelling core microbial metabolisms in the hypersaline microbial mats of Shark Bay using high-throughput metagenomics. **The ISME Journal**, v. 10, n. 1, p. 183–196, jan. 2016.

SÁ, M.H.B.D Capítulo 5 – Mecanismos de obtenção de energia em células procarióticas. Em: VERMELHO, A.B; BASTOS, M.D.C.D.F; SÁ, M.H.B.D (Eds.). **BACTERIOLOGIA GERAL**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 417–421.

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

SAHLI, K. et al. Characterization and biological activities of carotenoids produced by three haloarchaeal strains isolated from Algerian salt lakes. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 1, p. 6, jan. 2022.

SAKTHISELVAN, P.; MADHUMATHI, R. Optimization on Microbial Production of Polyhydroxybutyrate (PHB): A Review. **Internacional Journal of Research and Analytical Reviews**, v. 6, n. 1, set. 2018.

SALAS, A. et al. Bacterial nitric oxide metabolism: Recent insights in rhizobia. Em: **Advances in Microbial Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2021. v. 78p. 259–315.

SALGAONKAR, B.; BRAGANÇA, J. Utilization of Sugarcane Bagasse by Halogeometricum borinquense Strain E3 for Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 50, 25 maio 2017.

SALLOTO, G. R. B. et al. A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico. v. 10, n. 2, 2012.

SAMPAIO, L. F.; DAL' BÓ, P. F. F.; BORGHI, L. Morphology and Genesis of Microbially Induced Sedimentary Structures (MISS) in Sediments of the Lagoa Vermelha (Região dos Lagos – Rio de Janeiro). **Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ**, v. 38, n. 1, p. 95, 5 out. 2015.

SÁNCHEZ, C.; MINAMISAWA, K. Redundant roles of Bradyrhizobium oligotrophicum Cu-type (NirK) and cd1-type (NirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 5, 1 mar. 2018.

SÁNCHEZ-ROMÁN, M. et al. Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria: Mineral precipitation by halophilic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, n. 2, p. 273–284, ago. 2007.

SCHINK, B.; PHILIPP, B.; MÜLLER, J. Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 1, p. 12–23, 13 jan. 2000.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, v. 27, n. 6, p. 863–864, 15 mar. 2011.

SCHUINDT, R. M. D. A.; DACO, R. D. S.; OLIVEIRA, M. M. D. Impactos na Lagoa de Araruama e percepção ambiental da comunidade da Praia do Siqueira, Cabo Frio (RJ). **Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 13, n. 1, p. 299–321, 30 mar. 2018.

SEVERIN, I.; STAL, L. J. Diazotrophic Microbial Mats. Em: SECKBACH, J.; OREN, A. (Eds.). **Microbial Mats**. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. v. 14p. 321–339.

SHARMA, P. et al. Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas putida* LS46 Expressing a Novel PHA SYNTHASE (PhaC116) Enzyme. **Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 242, 3 mar. 2017.

SHI, J. et al. Thermostable DNA ligases from hyperthermophiles in biotechnology. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1198784, 24 maio 2023.

SHI, M.; JIANG, Y.; SHI, L. Electromicrobiology and biotechnological applications of the exoelectrogens *Geobacter* and *Shewanella* spp. **Science China Technological Sciences**, v. 62, n. 10, p. 1670–1678, out. 2019.

SHIGEMATSU, T. et al. Microbial community of a mesophilic propionate-degrading methanogenic consortium in chemostat cultivation analyzed based on 16S rRNA and acetate kinase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 401–415, set. 2006.

SHIN, B. et al. Anaerobic degradation of hexadecane and phenanthrene coupled to sulfate reduction by enriched consortia from northern Gulf of Mexico seafloor sediment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1239, 4 fev. 2019.

SILVA, C.A.D. Especificação do mercúrio na cadeia trófica pelágica de uma costa sujeita a ressurgência. Cabo Frio – RJ. 2006. 142f. **Tese (Doutorado em Geoquímica Ambiental)**, UFF, Niterói, 2006. Disponível em: < <https://app.uff.br/riuff/handle/1/7901?show=full> >. Acesso em: 27 ago.2023

SILVA E SILVA, L. H. D.; DAMAZIO-IESPA, C. M.; IESPA, A. A. C. Estudo sedimentológico e geomicrobiológico das esteiras microbianas tipo filme da lagoa Pitanguinha, região dos lagos, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 30, n. 1, p. 67–72, 1 jan. 2007.

SILVA, K. T. et al. Ultrastructure and cytochemistry of lipid granules in the many-celled magnetotactic prokaryote, ‘*Candidatus Magnetoglobus multicellularis*’. **Micron**, v. 39, n. 8, p. 1387–1392, dez. 2008.

SILVA, L.H.S.S. et al. Caracterização e levantamento cianobacteriano das esteiras microbianas coliformes em ambiente artificial (Salina Julieta), Araruama, Brasil. **Revista de Geologia**, Fortaleza. Vol.24, n.1, 2008. Disponível em < <https://docplayer.com.br/66562204-Characterizacao-e-levantamento-cianobacteriano-das-esteiras-microbianas-coloformes-em-ambiente-artificial-salina-julieta-araruama-brasil.html> >. Acesso em: 17 jun.2023

SILVA, L. H. D. S. E. et al. Composição cianobacteriana e química dos estromatólitos da lagoa Salgada, Neógeno do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Geologia USP. Série Científica**, v. 13, n. 1, p. 95–106, 1 mar. 2013.

SIMON, J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 285–309, ago. 2002.

SINGH, A. K. et al. Microbially Originated Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolymers: An Insight into the Molecular Mechanism and Biogenesis of PHA Granules. Em: SINGH, O. V.; CHANDEL, A. K. (Eds.). **Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 355–398.

SINGH, P.; PARMAR, N. Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)-producing bacteria. **African Journal of Biotechnology**, v.10 (24), p. 4907-4919, jun. 2011.

SINHA, S. K.; DATTA, S. β -Glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. is a salt-tolerant enzyme that is stabilized by its reaction product glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 19, p. 8399–8409, out. 2016.

SIROHI, R. et al. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). **Bioresource Technology**, v. 311, p. 123536, set. 2020.

SIROOSI, M. et al. Halophilic Amylase Production and Purification from *Haloarcula* sp. Strain D61. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 7382–7392, 16 jun. 2020.

ŚLIŻEWSKA, A.; ŻYMAŃCZYK-DUDA, E. Cyanobacteria as Valuable Tool in Biotechnology. **Catalysts**, v. 11, n. 11, p. 1259, 20 out. 2021.

SOLOMON, C. et al. Role of urea in microbial metabolism in aquatic systems: a biochemical and molecular review. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 59, p. 67–88, 24 mar. 2010.

SOUSA, D.M.D. One-carbon (C₁) metabolismo. **Wageningen University e Research**. Disponível em: < <https://www.wur.nl/en/research-results/chair-groups/agrotechnology-and-food-sciences/biomolecular-sciences/laboratory-of-microbiology/research/microbial-physiology/one-carbon-c1-metabolism.htm> >. Acesso em: 27 ago. 2023

SOUZA, F. P. D.; AZEVEDO, J. P. S. Panorama das lagoas urbanas no Rio de Janeiro: aspectos relevantes na gestão das Lagoas Rodrigo de Freitas, Araruama e Complexo Lagunar de Jacarepaguá. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 25, n. 1, p. 197–204, jan. 2020.

SPARACINO-WATKINS, C.; STOLZ, J. F.; BASU, P. Nitrate and periplasmic nitrate reductases. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 676–706, 2014.

SPINOLA, E.C. Mercúrio na área de disposição final dos resíduos sólidos do município de São Pedro da Aldeia – RJ. 2004. 68f. **Dissertação (Mestrado em Geoquímica Ambiental)**, UFF, Niterói, 2004. Disponível em: <<https://app.uff.br/riuff/handle/1/4962>>. Acesso em: 27 ago.2023

STAL, L. J.; BOLHUIS, H.; CRETOIU, M. S. Phototrophic Microbial Mats. Em: HALLENBECK, P. C. (Ed.). **Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 295–318.

STAŚCZAK, A. et al. Optical Evaluation of Effects of Energy Substrates on PHB Accumulation for Bioplastic Production. **Energies**, v. 15, n. 22, p. 8390, 10 nov. 2022.

STOLZ, J. F.; BASU, P. Evolution of Nitrate Reductase: Molecular and Structural Variations on a Common Function. **ChemBioChem**, v. 3, n. 2–3, p. 198–206, 1 mar. 2002.

SUBASHCHANDRABOSE, S. R. et al. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 896–907, nov. 2011.

SUDHA, S. S.; RAJAMANICKAM, K.; RENGARAMANUJAM, J. Microalgae mediated synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. **INDIAN J EXP BIOL**, 2013.

SUO, Y. et al. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production with high butyrate/acetate ratio. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 10, p. 4511–4522, maio 2018.

SUOSAARI, E. P.; REID, R. P.; ANDRES, M. S. Stromatolites, so what?! A tribute to Robert N. Ginsburg. **The Depositional Record**, v. 5, n. 3, p. 486–497, set. 2019.

SRIMONGKOL, P. et al. Ability of marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. VDW to remove ammonium from brackish aquaculture wastewater. **Agricultural Water Management**, v. 212, p. 155–161, fev. 2019.

SRIVASTAVA, N.K. Lagoa Salgada, RJ - Estromatólitos recentes. In: SCHOBENHAUS, C.; CAMPOS, D.A; QUEIROZ, E.T; WINGE, M; BERBET-BORN, M.L.C (Edição). *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. 1 ed. Brasília: DNPM/CPRM - **Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleontológicos (SIGEP)**, 2002. v.01: 203-209. Disponível em <<chrome-extension://efaidnbnmnibpcajpcgiclfndmkaj/https://sigep.eco.br/sitio041/sitio041.pdf>>. Acesso em: 17 jun.2023

STEELE, H. L.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 2, p. 105–111, jun. 2005.

STOLZ, J.F. Structure of Microbial Mats and Biofilms. In: RIDING, R. E.; AWRAMIK, S. M. (Edição). **Microbial Sediments**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2000. p. 9-16.

STRICKLAND, J.D.H; PARSONS, T.R. A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2ª edição. Bulletin 167, 1972. p 77-80.

STUART, R. K. et al. Cyanobacterial reuse of extracellular organic carbon in microbial mats. **The ISME Journal**, v. 10, n. 5, p. 1240–1251, maio 2016

TAN, H. T. et al. Evaluation of BP-M-CPF4 polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil using *Cupriavidus necator* transformants. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 250–257, set. 2020.

TASHIRO, Y. et al. Recent advances and future prospects for increased butanol production by acetone-butanol-ethanol fermentation. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 5, p. 432–445, set. 2013.

TIANG, M. F. et al. Recent advanced biotechnological strategies to enhance photo-fermentative biohydrogen production by purple non-sulphur bacteria: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 24, p. 13211–13230, maio 2020.

TIMMERMANS, M.; PAUDEL, Y.; ROSS, A. Investigating the Biosynthesis of Natural Products from Marine Proteobacteria: A Survey of Molecules and Strategies. **Marine Drugs**, v. 15, n. 8, p. 235, 1 ago. 2017.

TISO, T. et al. The metabolic potential of plastics as biotechnological carbon sources – Review and targets for the future. **Metabolic Engineering**, v. 71, p. 77–98, maio 2022.

TOUMI, J. et al. Microbial ecology overview during anaerobic codigestion of dairy wastewater and cattle manure and use in agriculture of obtained biofertilisers. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 141–149, dez. 2015.

TRINCONE, A. Enzymatic Processes in Marine Biotechnology. **Marine Drugs**, v. 15, n. 4, p. 93, 25 mar. 2017.

URIBE-LORÍO, L. et al. The influence of temperature and pH on bacterial community composition of microbial mats in hot springs from Costa Rica. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 10, out. 2019

VALLE, L.G.R.D.S. Gamaespectrometria e Mineralogia de Sedimentos Carbonáticos na Lagoa do Brejo do Espinho (RJ) durante o Holoceno. 2021. 93f. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Geofísica)**, UFF, Niterói, 2021. Disponível em: <chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://www.geofisica.uff.br/sites/default/files/projetofinal/2021_luiz_gustavo_rodrigues_de_sa_valle.pdf> . Acesso em: 23 jun.2023

VAN GEMERDEN, H. Microbial mats: A joint venture. **Marine Geology**, v. 113, n. 1–2, p. 3–25, jul. 1993.

VASCONCELOS, C. et al. Lithifying microbial mats in Lagoa Vermelha, Brazil: Modern Precambrian relics? **Sedimentary Geology**, v. 185, n. 3–4, p. 175–183, mar. 2006.

VILJAKAINEN, V. R.; HUG, L. A. The phylogenetic and global distribution of bacterial polyhydroxyalkanoate bioplastic-degrading genes. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 1717–1731, mar. 2021.

VISSCHER, P. T. et al. Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): The role of sulfur cycling. [s.d.].

VISSCHER, P. T.; STOLZ, J. F. Microbial mats as bioreactors: populations, processes, and products. Em: **Geobiology: Objectives, Concepts, Perspectives**. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 87–100.

XIAO, N.; JIAO, N.; LIU, Y. In vivo and in vitro observations of polyhydroxybutyrate granules formed by *Dinoroseobacter* sp. JL 1447. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 467–475, mar. 2015.

WALTER, J. M. et al. Metagenomic Insights Into Ecosystem Function in the Microbial Mats of a Large Hypersaline Coastal Lagoon System. **Frontiers in Marine Science**, v. 8, p. 715335, 17 ago. 2021.

WANG, B. et al. Anaerobic-petroleum degrading bacteria: Diversity and biotechnological applications for improving coastal soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 224, p. 112646, nov. 2021.

WANG, Z. et al. Critical roles of cyanobacteria as reservoir and source for antibiotic resistance genes. **Environment International**, v. 144, p. 106034, nov. 2020.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 237–241, jun. 2001

WEI, X. et al. T4-like Phages Reveal the Potential Role of Viruses in Soil Organic Matter Mineralization. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 9, p. 6440–6448, 4 maio 2021.

WHEELER, B. E. J.; YEMM, E. W. The conversion of amino acids in soils. [s.d.].

WHITE, R. A.; VISSCHER, P. T.; BURNS, B. P. Between a Rock and a Soft Place: The Role of Viruses in Lithification of Modern Microbial Mats. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 204–213, mar. 2021.

WHO, 2017. Prioritization of pathogens to guide Discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. World Health Organization. Geneva; 2017, p.12.

- WONG, H.; AHMED-COX, A.; BURNS, B. Molecular Ecology of Hypersaline Microbial Mats: Current Insights and New Directions. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 6, 5 jan. 2016.
- WU, H.-J.; WANG, A. H.-J.; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 93–101, fev. 2008.
- YAMAMURA, S. et al. Production of two morphologically different antimony trioxides by a novel antimonate-reducing bacterium, *Geobacter* sp. SVR. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, p. 125100, jun. 2021.
- YAN, L. et al. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application. **Microbiological Research**, v. 167, n. 9, p. 507–519, out. 2012.
- YAO, J.; ROCK, C. O. Exogenous fatty acid metabolism in bacteria. **Biochimie**, v. 141, p. 30–39, out. 2017.
- ZAHRA, Z. et al. Cyanobacteria: Review of Current Potentials and Applications. **Environments**, v. 7, n. 2, p. 13, 12 fev. 2020.
- ZAVARZIN, G. A. **Microbial Geochemical Calcium Cycle**. v. 71, n. 1, 2002.
- ZHANG, C. et al. T4-Like Phage Bp7, a Potential Antimicrobial Agent for Controlling Drug-Resistant *Escherichia coli* in Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5559–5565, 15 set. 2013.
- ZHANG, J. et al. Effects of the Newly Isolated T4-like Phage on Transmission of Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Genes via Generalized Transduction. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 2070, 14 out. 2021.
- ZHANG, Q. et al. Cyanobacterial blooms contribute to the diversity of antibiotic-resistance genes in aquatic ecosystems. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 737, 4 dez. 2020.
- ZHU, T.; DITTRICH, M. Carbonate Precipitation through Microbial Activities in Natural Environment, and Their Potential in Biotechnology: A Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, 20 jan. 2016.
- ZIGANSHINA, E. E. et al. Microbial Community Diversity in Anaerobic Reactors Digesting Turkey, Chicken, and Swine Wastes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1464–1772, 28 nov. 2014.

7. ANEXOS

7.1 MATERIAL COMPLEMENTAR

Figura 1. Via metabólica referente a biossíntese de PHB via KEGG. O círculo vermelho demarca a via e as principais enzimas envolvidas na biossíntese que se encontram presentes nas amostras de metagenoma

