

DETECÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS EM ISOLADOS BACTERIANOS DE MANGUEZAL UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

Fabianny Costa Almeida¹ (PIBITI/FAPITEC-SE);
Giovanna Clarice de Souza Santos²; Tábata Cristina Guimarães²; Rodrigo de Oliveira Santana²; Luiz Henrique de Oliveira Santos³; Maria Lucila Hernández Macedo¹
fabiane.calmeida@souunit.com.br;

¹Universidade Tiradentes/Biomedicina/Aracaju/SE.

²Instituto de Tecnologia e Pesquisa/Aracaju/SE.

³Universidade Federal de Sergipe/Aracaju/SE.

2.00.00.00-6 - Ciências Biológicas; 2.12.00.00-9 – Microbiologia 2.12.02.00-1 – Microbiologia Aplicada

RESUMO

Os poli(hidroxicanoatos) (PHAs) são biopolímeros produzidos através do metabolismo microbiano, apresentando propriedades físicas e mecânicas semelhantes às dos plásticos derivados do petróleo. No entanto, distinguem-se por sua natureza biodegradável, o que os torna uma alternativa promissora e ambientalmente sustentável aos plásticos convencionais. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil genotípico e fenotípico de bactérias com potencial de produção de poli(hidroxicanoatos), utilizando resíduos agroindustriais como substrato. Sete isolados bacterianos de manguezal foram reativados em meio ágar nutriente e avaliados quanto à produção de PHA. A detecção fenotípica foi realizada através de ensaios colorimétricos com Sudan Black B e Azul de Nilo, complementada pela observação microscópica de grânulos intracelulares. O perfil genotípico foi confirmado pela amplificação dos genes *phaA*, *phaB* e *phaC* via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Posteriormente, os isolados foram cultivados em meios líquidos contendo manipueira 100% e borra de dendê 5%, com o crescimento monitorado a 600 nm. A biomassa seca foi determinada por pesagem do material após fermentação. Em seguida o PHA foi extraído, purificado e caracterizado físico-quimicamente por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica e Análise Termogravimétrica Derivada (TG/TGA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC/MS). Os ensaios colorimétricos confirmaram a capacidade dos microrganismos de sintetizar PHA. Através da análise genotípica por PCR se detectou os genes *phaA*, *phaB* e *phaC* em todos os isolados. Em resíduo de dendê *Bacillus sp.* (I-3) e *Pseudomonas sp.* (5CR) exibiram absorvâncias de 0,388 e 0,581 com massa seca de 0,039 g e 0,030 g, respectivamente. Em manipueira, 5CR destacou-se com absorvância de 0,391 e massa seca de 0,040 g. Após a extração, o rendimento de PHA foi: 29,62% (0,08 g/L) para I-3, e 29,16% (0,07 g/L) para 5CR, ambos em borra de dendê. Um alto rendimento de PHB em manipueira foi observado no isolado 5CR com 35,41% (0,17 g/L). A análise por FTIR evidenciou bandas típicas de PHA (1720–1725 cm⁻¹) em todas as amostras. A DSC indicou pontos de fusão de 142–156 °C e 128–142 °C no PHA produzido por I-3 e 5CR em dendê, respectivamente. Em manipueira os pontos de fusão foram de 160–170 °C para PHA produzido por 5CR. A TG/TGA revelou estabilidade do PHA de 250 °C e 240 °C para I-3 e 5CR em dendê, e 201 °C para 5CR em manipueira. A MEV demonstrou superfícies distintas de PHA, com I-3 em dendê o material foi homogêneo, e com 5CR em dendê e manipueira o material apresentou superfícies porosas e heterogêneas. A GC/MS evidenciou um pico de ácido β-hidroxibutírico, confirmando que os biopolímeros obtidos são de PHA do tipo poli-hidroxibutirato (PHB). Em síntese, os dados fenotípicos e genotípicos confirmam a produção de PHA do tipo PHB por microrganismos de manguezal, destacando o potencial das cepas *Bacillus sp.* (I-3) e *Pseudomonas sp.* (5CR), bem como a viabilidade do uso de dendê e manipueira para aplicações biotecnológicas sustentáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Resíduos agroindustriais, biopolímeros, poli(hidroxi)alcanoatos

Agradecimentos: Os autores agradecem à FAPITEC/SE pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de pesquisa, e ao Instituto de Pesquisa de Sergipe e ao Laboratório de Biologia Molecular pelo suporte e infraestrutura na realização dos experimentos.

ABSTRACT

Poly(hydroxyalkanoates) (PHAs) are biopolymers produced through microbial metabolism, exhibiting physical and mechanical properties similar to petroleum-derived plastics. However, they stand out for their biodegradable nature, making them a promising and environmentally sustainable alternative to conventional plastics. This study aimed to evaluate the genotypic and phenotypic profiles of bacteria with potential for poly(hydroxyalkanoate) production using agro-industrial residues as substrates. Seven bacterial isolates from mangrove environments were reactivated in nutrient agar and assessed for PHA production. Phenotypic detection was carried out through colorimetric assays using Sudan Black B and Nile Blue, complemented by microscopic observation of intracellular granules. The genotypic profile was confirmed by amplifying the *phaA*, *phaB*, and *phaC* genes via Polymerase Chain Reaction (PCR). Subsequently, the isolates were cultivated in liquid media containing 100% cassava wastewater (manipueira) and 5% palm oil press cake, with growth monitored at 600 nm. Dry biomass was determined by weighing the material after fermentation. The extracted PHA was purified and physicochemically characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric and Derivative Thermogravimetric Analyses (TG/TGA), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC/MS). The colorimetric assays confirmed the microorganisms' ability to synthesize PHA. Genotypic analysis detected the *phaA*, *phaB*, and *phaC* genes in all isolates. In palm residue, *Bacillus* sp. (I-3) and *Pseudomonas* sp. (5CR) showed absorbance values of 0.388 and 0.581, with dry biomass yields of 0.039 g and 0.030 g, respectively. In cassava wastewater, *Pseudomonas* sp. (5CR) stood out with absorbance of 0.391 and dry biomass of 0.040 g. After extraction, the PHA yield was 29.62% (0.08 g/L) for I-3 and 29.16% (0.07 g/L) for 5CR, both in palm residue. A high PHB yield in cassava wastewater was observed in the isolate 5CR, with 35.41% (0.17 g/L). FTIR analysis revealed typical PHA absorption bands ($1720\text{--}1725\text{ cm}^{-1}$) in all samples. DSC indicated melting points between $142\text{--}156\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $128\text{--}142\text{ }^{\circ}\text{C}$ for PHAs produced by I-3 and 5CR in palm residue, respectively. In cassava wastewater, the melting point ranged from $160\text{--}170\text{ }^{\circ}\text{C}$ for PHA from 5CR. TG/TGA analyses showed thermal stability at $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ for I-3 and 5CR in palm residue, and $201\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5CR in cassava wastewater. SEM demonstrated distinct PHA surfaces, with I-3 in oil palm residue the material was homogeneous, and with 5CR in oil palm and cassava wastewater the material presented porous and heterogeneous surfaces. GC/MS analysis identified a β -hydroxybutyric acid peak, confirming that the obtained biopolymers are polyhydroxybutyrate (PHB)-type PHAs. In summary, phenotypic and genotypic data confirm the production of PHB-type PHA by mangrove microorganisms, highlighting the potential of *Bacillus* sp. (I-3) and *Pseudomonas* sp. (5CR), as well as the feasibility of using palm and cassava residues for sustainable biotechnological applications.

Keywords: Agro-industrial residues, biopolymers, poly(hydroxy)alkanoates

Acknowledgments: The authors thank FAPITEC/SE for financial support through the research grant, and the Institute of Research of Sergipe and the Molecular Biology Laboratory for their technical assistance and infrastructure.