

**Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade  
Estadual Paulista**

**Câmpus de Jaboticabal**

**A influência de íons metálicos sobre a biossíntese de  
Exopolissacarídeos e polihidroxibutirato de *Rhizobium tropici*  
LBMP-C01**

**Tatiane Fernanda Leonel**

Tecnóloga em biocombustíveis

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE  
MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**A influência de íons metálicos sobre a biossíntese de  
Exopolissacarídeos e polihidroxitirato de *Rhizobium tropici*  
LBMP-C01**

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Dra. Cristiane Moretto

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias – Unesp, Campus de  
Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título  
de Mestre em Microbiologia  
Agropecuária

2017

Leonel, Tatiane Fernanda  
L583i A influência de íons metálicos sobre a biossíntese de  
Exopolissacarídeos e polihidroxibutirato de *Rhizobium tropici* LBMP-  
C01 / Tatiane Fernanda Leonel. – – Jaboticabal, 2017  
xv, 47 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Banca examinadora: Paulo Inácio da Costa, João Martins Pizauro  
Junior  
Bibliografia

1. Bioplásticos. 2. Biopolímeros. 3. EPS. 4. Metais pesados. 5.  
*Rhizobium tropici*.. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:577.11

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da  
Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de  
Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: A INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS SOBRE A BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS E POLIHIDROXIBUTIRATO DE *Rhizobium tropici* LBMP-C01

**AUTORA: TATIANE FERNANDA LEONEL**

**ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS**

**COORIENTADORA: CRISTIANE MORETTO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. PAULO INACIO DA COSTA  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP Araraquara/SP

Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR  
Departamento de Tecnologia / UNESP / FCAV - Jaboticabal

Jaboticabal, 18 de julho de 2017

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**Tatiane Fernanda Leonel** - nascida na cidade de Araraquara (SP), em 8 de outubro de 1993. Graduiu-se em Tecnologia em Biocombustíveis pela Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (SP), no ano de 2015. Estagiou no Laboratório de Biologia Aplicada FCAV/UNESP, Campus Jaboticabal (Departamento de Biologia), e também no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e plantas (Departamento de tecnologia), aonde fez iniciação científica. Ingressou no ano de 2015 no curso de Mestrado pelo programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Desenvolveu sua dissertação junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP/FCAV, atuando na área de Bioquímica de Microrganismos e plantas, estudando a influência dos íons metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ ) no crescimento celular da bactéria *Rhizobium tropici*; na produção dos biopolímeros EPS (exopolissacarídeos) e PHB (polihidroxibutirato) e também a expressão dos genes *exoR* e *exoZ* relacionado com a biossíntese de EPS.

**“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará”.**

**Salmos 23.**

## **Ofereço**

### **A minha família**

**Neide e Geraldo** – As pessoas mais importantes da minha vida, que sempre me animavam com suas palavras, me apoiando e me proporcionando a oportunidade de cursar uma faculdade mesmo tendo tantas dificuldades. Me orgulho em nascer nesta família, agradeço a Deus por ter me dado essa oportunidade de conviver com exemplos de honestidades, o meu socorro em horas difíceis.

### **As minhas irmãs**

**Ana Paula, Isabel, Queila, Erica** – minhas melhores amigas e as melhores conselheiras sempre me animando e claro me aconselhando inúmeras vezes, para me corrigir e sempre seguir pelo melhor caminho.

### **Aos meus sobrinhos**

**Gabriela e João Pedro** –minhas alegrias em momentos angustiantes da minha trajetória, com apenas alguns sorrisos mudavam os meus dias.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profª. Drª. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, por ter me recebido de braços abertos e que com muita humildade transmitiu sua sabedoria adquirida ao longo dos anos, colaborando para a elaboração e a qualidade deste trabalho.

À minha coorientadora **Drª. Cristiane Moretto** pela coorientação, e também pela paciência, me ajudando em todos os momentos. Agradeço pela amizade, uma das melhores coisas que aprecio durante o período de minha formação, foram tantos “vamos conseguir” que sinceramente se não fosse estes eu não teria tido ânimo e não enxergaria a solução para sair de diversas situações

Ao programa de pós-graduação de **Microbiologia Agropecuária**, FCAV/UNESP- Jaboticabal, por ter me dado esta oportunidade.

À **CAPES** - pela bolsa de Mestrado, que permitiu minha total dedicação a este trabalho.

Ao **LBMP** - Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas, aos amigos que sempre estiveram dispostos a ajudar, e também pelas muitas risadas, em especial Michelli Funicelli, Joana Desiderato, Gabriela Cabral, Elisangela Soares Gomes Pepe, Renato Galdiano, Dayanne Fernandes.

A **Drª Camila Fernandes** –com paciência me passava seu conhecimento, e me ajudou em algumas etapas deste trabalho.

Ao **Dr. João Carlos Campanharo** –sábio e humilde que em momentos de apuros me socorria e com muita humildade transferia seus conhecimentos.

---



A **Dr<sup>a</sup>. Vivian Boter**, técnica do laboratório de Araraquara, criamos um forte laço de amizade e trocas de conhecimento, colaborou muito para a qualidade deste artigo.

---

A **USP**- Laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos -FMRP / USP por ter colaborado para com as análises de microscopia de transmissão que tanto enriqueceu o trabalho.

A **UNESP-Araraquara** – Principalmente ao **Prof. Dr.** Paulo Inácio da Costa que nos abriu a porta de seu laboratório, desenvolvendo em cada etapa de RT-PCR, nos passando de forma tão humilde todo o conhecimento que adquiriu ao longo dos anos.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1. <i>Rhizobium tropici</i> .....	18
2.2. Exopolissacarídeos (EPS) de Rizobactérias.....	19
2.3. Polihidroxibutirato (PHB) de Rizobactérias .....	20
2.4. Metais pesados e microrganismos.....	20
2.5. Controle genético da síntese de EPS em Rizóbios.....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1. Condições e meios de cultivo.....	24
4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	24
4.3. Curva de Crescimento Bacteriano.....	24
4.4. Análise do efeito dos íons metálicos sobre a Viabilidade Celular .....	25
4.4.1. Análise de Unidade Formadora de Colônia.....	25
4.4.2. 4.4.2. Análise por Citometria de Fluxo e Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	25
4.5. Influência dos íons metálicos (Cu <sup>2+</sup> e Cr <sup>6+</sup> ) sobre produção de exopolissacarídeo (EPS) e polihidroxibutirato (PHB) .....	26
4.5.1. Obtenção de Exopolissacarídeo (EPS) .....	26

4.5.2. Obtenção de Polihidroxibutirato (PHB).....	27
4.6. Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform, FTIR).....	27
4.7. Determinação da composição monossacarídica do EPS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	28
4.8. Efeito dos íons metálicos na expressão gênica em <i>Rhizobium tropici</i> .....	29
4.8.1. Desenho dos primers para a avaliação da expressão do gene <i>exoR</i> e <i>exoZ</i> .....	29
4.8.2. Determinação e desenho do primer para controle do gene endógeno .....	30
4.8.3. Extração de RNA.....	31
4.8.4. Quantificação e qualidade do RNA total.....	32
4.8.5. Transcrição reversa.....	32
4.8.6. Reação de PCR em tempo real .....	32
4.8.7. Análise dos dados e estudo da quantificação relativa .....	33
4.9. Análise estatística .....	33
<b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) .....	33
5.2. Curva de Crescimento Bacteriano.....	34
5.3. Análise de Unidade Formadora de Colônia.....	36
5.4. Análise da Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo .....	37
5.5. Produção de exopolissacarídeo (EPS) com e sem metal.....	40
5.6. Produção de polihidroxibutirato (PHB) com e sem metal.....	42
5.7. Análise de Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform FTIR) .....	47
<b>5.8. Efeito dos íons metálicos na expressão gênica em <i>Rhizobium tropici</i></b> .....	48

5.8.1. Expressão dos genes <i>exoR</i> e <i>exoZ</i> .....	48
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Modelo de correlação das vias metabólicas de produção de exopolissacarídeos, quorum sensing e repressão catabólica em <i>S. meliloti</i> .....	<b>p.22.</b>
<b>Figura 2.</b> Fragmento do alinhamento pelo software Clustaw X das sequências do gene <i>exoR</i> e <i>exoZ</i> de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.....	<b>p.30.</b>
<b>Figura 3.</b> Ensaio da Concentração Mínima Inibitória (CMI) analisado por Densidade Óptica (DO <sub>600</sub> ) o crescimento celular de <i>Rhizobium tropici</i> (LBMP-C01) em meio de cultivo PSY <sub>líq</sub> contendo (A) cobre (CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O) e (B) cromo e (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ), incubados a 28 °C sob agitação de 150 rpm, até 144 horas.....	<b>p.34.</b>
<b>Figura 4.</b> Curva de crescimento celular de <i>R. tropici</i> em meio PSY <sub>líq</sub> por leitura de Densidade Óptica (DO <sub>600</sub> ) nos respectivos tratamentos: Controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu <sup>2+</sup> a 0,1 mmol L <sup>-1</sup> ); cromo (Cr <sup>6+</sup> a 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu <sup>2+</sup> a 0,1 mmol L <sup>-1</sup> + Cr <sup>6+</sup> a 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ), mantidos até 144 horas sob agitação de 150 rpm a 28 °C.....	<b>p.36.</b>
<b>Figura 5.</b> Cultivo bacteriano durante o período de 72 horas, submetidos a Citometria de fluxo de dispersão luminosa, mostrando a diminuição da população na presença dos íons metálicos, e microscopia eletrônica de transmissão, mostrando a população bacteriana no respectivo tempo, barra de 500 nm. Os tratamentos são: (A e E). Controle sem a influência de íons metálicos, (B e F). cobre (Cu <sup>2+</sup> a 0,1 mmol L <sup>-1</sup> ); (C e G) cromo (Cr <sup>6+</sup> a 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ), (D e H). cobre + cromo (Cu <sup>2+</sup> a 0,1 mmol L <sup>-1</sup> + Cr <sup>6+</sup> a 0,05 mmo L <sup>-1</sup> ). .....	<b>p.39</b>
<b>Figura 6.</b> Microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células foram examinadas no final do experimento no tempo de 72 horas, (A). controle sem a influência de íons metálicos, (B). cobre (Cu <sup>2+</sup> a 0,1 mmol L <sup>-1</sup> ); (C) cromo (Cr <sup>6+</sup> a 0,05 mmol L <sup>-1</sup> ), (D). cobre + cromo (Cu <sup>2+</sup> a 0,1 mmol L <sup>-1</sup> + Cr <sup>6+</sup> a 0,05 mmol <sup>-1</sup> ), mostrando o acúmulo dos grânulos de PHB (setas brancas), e o acúmulo dos	

íons metálicos (setas pretas). Barra de 500 nm.  
 .....p.45

**Figura 7.** Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do exopolissacarídeos (EPS) produzido por *R. tropici*, em meio PSY<sub>líq</sub> suplementado com íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); de cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre +cromo [ $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ] sob agitação de 150 rpm, 28 °C, por 144 h.....p.46

**Figura 8.** Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) de polidroxibutiratos (PHB) produzido por *R. tropici*, em meio PSY<sub>líq</sub> suplementado com íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); de cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre +cromo [ $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ )], sob agitação de 150 rpm, 28 °C, por 72 h.....p.47

**Figura 9.** Gráfico de amplificação do gene *exoR* e *exoZ* da rizobactéria *R. tropici* em meio PSY<sub>líq</sub> acrescido de íons metálicos cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) + cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), nas fases fases de desenvolvimento (24, 48 e 120 horas)  
 .....p.48

**Figura 10.** Nivel de expressão gênica do gene *exoR* e *exoZ* para as amostras de *R. tropici*, nos tempos de 24; 48; e 120 horas no meio PSY<sub>líq</sub> suplementado com íons metálicos cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) + cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ).....p.50

## LISTA DE TABELAS

### Página

**Tabela 1:** Análise da viabilidade das células de *R. tropici* em meio PSY<sub>líq</sub> acrescido de íons metálicos cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e Cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>), nos tempos 0 e 72 horas sob agitação 150 rpm a 28°C..... **p.37**

**Tabela 2.** Percentual de células vivas da rizobacteria *R.tropici* em meio PSY<sub>líq</sub> após a análise de Citometria de fluxo de dispersão luminosa nas condições controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), onde a porcentagem de células vivas é expressa em gates (%)......**p.38**

**Tabela 3.** Produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular em meio de PSY<sub>líq</sub> por *R. tropici* e eficiência relativa de produção de EPS, controle (sem a presença de íons metálicos); Cobre (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); Cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e solução das misturas dos dois íons metálicos Cobre + Cromo (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), mantido sob agitação 150 rpm, 28 °C por 96 horas e 144 horas .....**p.41**

**Tabela 4.** Produção de polihidroxibutirato (PHB) e eficiência relativa de produção de PHB produzido por *Rhizobium tropici* cultivado em meio PSY<sub>líq</sub> nas respectivas condições: Controle (sem a presença de íons metálicos); Cobre (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); Cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e solução das misturas dos dois íons metálicos Cobre + Cromo (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), mantido sob agitação 150 rpm, 28°C por 144 horas.....**p.44**

**Tabela 5.** Valores de Ct da reação em tempo real de *R. tropici* em meio PSY<sub>líq</sub> acrescido de íons metálicos Cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); Cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e Cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + Cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>), nas fases fases de desenvolvimento (24, 48, 72, 120 horas) .....**p.49**

## A INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS SOBRE A BIOSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS E POLIHIDROXIBUTIRATO DE *Rhizobium tropici* LBMP-C01

**RESUMO** - Nas últimas décadas, a síntese microbiana de biopolímeros com propriedades biotecnológicas tem atraído atenção crescente. Este trabalho relatou o efeito dos íons metálicos cobre bivalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e cromo hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ ) na biossíntese de exopolissacarídeo (EPS) e polihidroxibutirato (PHB), produzidos pela bactéria *Rhizobium tropici* (LBMP-C01). No ensaio de concentração mínima inibitória (CMI), a rizobactéria apresentou sensibilidade às concentrações superiores a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  para  $\text{Cu}^{2+}$  e  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  para o íon  $\text{Cr}^{6+}$ . O estudo do efeito destas concentrações de íons metálicos sobre a produção de EPS e PHB, este foi cultivado em meios  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  sem a presença dos íons (controle) e suplementados com os íons separadamente ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ ) e em mistura ( $\text{Cu}^{2+} + \text{Cr}^{6+}$ ). A curva de cultivo mostrou diferenças significativas entre o meio  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  controle e os demais tratamentos contendo os íons metálicos nas concentrações avaliadas. Apesar do efeito dos íons metálicos no cultivo, todos os tratamentos apresentaram células viáveis. Quanto à ação dos íons metálicos sobre a produção de EPS e PHB, foi observado que os tratamentos contendo o íon cromo e os íons em mistura ( $\text{Cu}^{2+} + \text{Cr}^{6+}$ ) reduziram a produção de ambos os biopolímeros. No entanto, o tratamento suplementado com somente o íon  $\text{Cu}^{2+}$  induziu o aumento da produção de até 48% de EPS e 46,66% de PHB em relação ao controle, após 144 horas. O estudo de FTIR indicou mínimas diferenças nos grupos funcionais presentes nas moléculas dos biopolímeros produzidos nos meios suplementados com os íons metálicos. As análises de expressão gênica, mostraram que os íons metálicos influenciam a expressão dos genes *exoR* e *exoZ* responsáveis pela síntese do biopolímero EPS, os tratamentos com  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+} + \text{Cr}^{6+}$  apresentaram efeitos opostos sobre as expressões dos genes *exoR* e *exoZ*: para o *exoR* houve aumento na expressão, enquanto para o *exoZ* houve redução.

**Palavras-chave:** bioplásticos, biopolímeros, EPS, metais pesados, *Rhizobium tropici*.



## THE INFLUENCE OF METAL IONS ON THE BIOSYNTHESIS OF *Rhizobium tropici* EXOPOLYSACCHARIDES AND POLYHYDROXYBUTYRATE LBMP-C01

**ABSTRACT** - In the last decades, the microbial synthesis of biopolymers with biotechnological properties has attracted increasing attention. This work reported the effect of bivalent copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) and hexavalent chromium ( $\text{Cr}^{6+}$ ) ions on exopolysaccharide biosynthesis (EPS) and polyhydroxybutyrate (PHB), produced by the bacterium *Rhizobium tropici* (LBMP-C01). In the minimum inhibitory concentration (MIC) test, rhizobacteria showed sensitivity to concentrations higher than  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$  for  $\text{Cu}^{2+}$  and  $0.05 \text{ mmol L}^{-1}$  for the  $\text{Cr}^{6+}$  ion. The study of the effect of these metal ion concentrations on EPS and PHB production was carried out in  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  media without the presence of ions (control) and supplemented with ions separately ( $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$ ) and in a mixture ( $\text{Cu}^{2+}$   $\text{Cr}^{6+}$ ). The culture curve showed significant differences between the control  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  medium and the other treatments containing the metal ions at the concentrations evaluated. Despite the effect of metal ions on the culture, all treatments had viable cells. As for the action of the metal ions on the production of EPS and PHB, it was observed that the treatments containing the chromium ion and the ions in the mixture ( $\text{Cu}^{2+}$  +  $\text{Cr}^{6+}$ ) reduced the production of both biopolymers. However, the treatment supplemented with  $\text{Cu}^{2+}$  alone induced an increase in the production of up to 48% of EPS and 46.66% of PHB in relation to the control after 144 hours. The FTIR study indicated minimal differences in the functional groups present in the molecules of the biopolymers produced in the media supplemented with the metal ions. Gene expression analysis showed that the metal ions influence the expression of the *exoR* and *exoZ* genes responsible for the synthesis of EPS biopolymer, the  $\text{Cu}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  +  $\text{Cr}^{6+}$  treatments showed opposite effects on *exoR* and *exoZ*: *exoR* increase in expression, while for *exoZ* there was reduction.

**Key words:** bioplastics, biopolymers, EPS, heavy metals, *Rhizobium tropici*.

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar das bactérias serem organismos unicelulares, estas desenvolveram mecanismos biológicos como forma de proteção, reserva de nutrientes entre outros, proporcionando vantagem substancial para sobrevivência diante de condições ambientais adversas. Dentre estes mecanismos, as bactérias são capazes de converterem eficientemente diferentes fontes de carbono, numa variedade diversificada de polímeros com propriedades químicas e biomateriais variados. Embora as bactérias sintetizem apenas alguns polímeros intracelulares, a gama de polímeros extracelulares que podem sintetizar é grande (REHM, 2010). Existem vias reguladoras complexas para controlar a biossíntese e mesmo as propriedades materiais destes polímeros em resposta aos estímulos externos (JANCZAREK, 2011; REHM, 2010).

As rizobactérias são capazes de sintetizar um amplo espectro de polímeros, através do acúmulo de glicogênio no citoplasma como um produto dinâmico de armazenamento de carbono (TRAINER & CHALES, 2006; JANCZAREK, 2011; GETACHEW & WOLDESENBET, 2016). O exopolissacarídeo (EPS) é um dos biopolímeros produzidos por rizobactérias comercialmente útil: para a produção de géis e modificação das propriedades reológicas de sistemas aquosos e possuem potencial para aplicação em processos de biorremediação (CASTELLANE et al., 2015, MORETTO et al., 2015, SACCO et al., 2016; CASTELLANE et al., 2017). Essas bactérias também sintetizam polihidroxiбутирато (PHB) um polímero intracelular, capaz de armazenar carbono como fonte de energia com aplicações industriais na síntese de plástico biodegradável. Por se tratar de recursos renováveis e menor geração de resíduos durante o processo de produção, estas biomoléculas têm potencial para substituir matérias-primas convencionais à base de combustíveis fósseis (MOZUMDER et al., 2014; GETACHEW & WOLDESENBET, 2016)

A biossíntese dos biopolímeros depende tanto de características genéticas como das condições de cultivo (STAUDT et al., 2012; CASTELLANE et al., 2014). Há trabalhos relatando a relação de fontes de carbono e nitrogênio presente em meios de cultivo para a produção de EPS e PHB. No entanto, não encontramos até a presente data relatos de estudos sobre o emprego de sais metálicos aos meios de cultivos analisando as influências destes íons nas biossínteses de EPS e PHB. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo geral

analisar a síntese de EPS e PHB em diferentes condições de cultivo, da estirpe LBMP-C01 de *Rhizobium tropici*. Sendo as condições estudadas o efeito dos íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) separadamente e em mistura ( $\text{Cu}^{2+} + \text{Cr}^{6+}$ ). Para isso, foram estudados a (i) determinação da concentração mínima inibitória; (ii) curva de crescimento celular; (iii) viabilidade celular por citometria; (iv) produção de EPS e PHB, (v) alterações dos grupos funcionais das moléculas de EPS e PHB analisado por FTIR, (vi) alterações nos grupos monossacarídicos das moléculas de EPS analisadas por RP-HPLC, (vii) expressão dos genes *exoR* e *exoZ*.

### 1.1. JUSTIFICATIVA

O emprego de biomoléculas produzidas por microrganismos destinadas tanto a processos agrícolas quanto industriais, demonstra a necessidade pela busca de estirpes que apresentem maior capacidade de produção destas moléculas, quanto meios de cultivo que as estimulem. O grande desafio é a busca por alternativas de produção destas biomoléculas que sejam menos onerosas. Neste sentido, estudos que investiguem condições ideais para produção de biomoléculas como: temperatura, aeração, micronutriente, fonte de carbono são conhecimentos essenciais para a processos de produção em larga escala. Outro aspecto é o aumento da aplicação de fungicidas cúpricos, como também outras fontes poluentes de metais pesados na agricultura tornando de suma importância estudos dos efeitos dos metais pesados na expressão gênica de rizobactérias, sendo os genes de produção de EPS, intrinsecamente ligados a importantes processos simbióticos com plantas. A rizobactéria *Rhizobium tropici* (LBMP-C01); demonstrou em estudos anteriores ser interessantes quanto a produção de biopolímeros; exopolissacarídeos (EPS) e polihidroxibutirato (PHB). Diante desses fatos é de fundamental importância conhecer os efeitos dos íons metálicos sob o fenótipo da rizobactéria na produção de células, EPS e PHB, já que estes biopolímeros apresentam um amplo espectro de atuação no setor agorindustrial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Rhizobium tropici*

*Rhizobium tropici* é uma bactéria gram-negativa, pertencente a classe  $\alpha$  proteobactéria, é habitante de solo e possui a capacidade de associar-se simbioticamente com plantas leguminosas, convertendo o nitrogênio atmosférico em compostos assimiláveis como a amônia, o que para a planta é extremamente benéfico pois ela necessita deste composto para seu desenvolvimento. Amplamente utilizadas em inoculantes comerciais para aplicação em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), exibem resistência intrínseca a várias condições estressantes abióticas, como pH baixo do solo e altas temperaturas, que são comuns em ambientes tropicais (RIBEIRO et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 1991). Estirpes de *R. tropici* mostram uma forte resistência aos pesticidas utilizados na agricultura como mostra alguns trabalhos descritos na literatura (BERNAL et al., 2012; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2008). Estas características genéticas são determinadas pela vasta coleção de genes de resistência que esta espécie possui. O genoma sequenciado da estirpe *R. tropici* CIAT 899 tem 6.686.337 pb é composto de um cromossoma e três plasmídeos com sistema de replicação tipo rep, contendo genes necessários para a simbiose, revelando que possuem um plasmídeo altamente conservado (pSym) que está também presente em *Rhizobium leucaenae* CFN 299 e exibe uma gama de hospedeiro semelhante. Foi encontrado em seu genoma genes *nodA* que contribuem para essa diversidade, genes de fixação de nitrogênio (*nif / fix*) e genes de síntese de polissacarídeos (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012). O sequenciamento de *Rhizobium tropici* CIAT 899 mostrou uma gama de genes envolvidos na resposta a estresses, revelando uma grande variedade de características que permite o sucesso na colonização das raízes dos seus hospedeiros; para isto, genes que comandam a sínteses de polissacarídeos de superfície, transportadores de captação, enzimas catabólicas para nutrientes, fazem parte de seu vasto genoma (ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012).

## 2.2. Exopolissacarídeos (EPS) de Rizobactérias

Rhizóbio é um grupo diversificado de bactérias que fixam o nitrogênio, pertencentes as subclasses  $\alpha$  e  $\beta$  das Proteobacterias, são membros de vários gêneros incluindo *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Methilobacterium* ( $\alpha$ -rhizobia), bem como as *Burkholderia* e *Cupriavides* ( $\beta$ -rhizobia). (JANCZAREK, 2011). Estas bactérias possuem diversos biopolímeros com propriedades químicas diferentes, a partir da utilização de substratos complexos, que são influenciados por fatores nutricionais como disponibilidade de enxofre, nitrogênio e fosfato (PEIX et al., 2010), alguns apresentam a mesma função, enquanto outros são mais específicos. Os EPSs ajudam na captação de nutrientes e também na competição em diferentes ambientes, protegendo as células de condições adversas (SAMIRAN et al., 2012). Quando em simbiose com as plantas (leguminosas), para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio, é necessária a troca de diversos sinais entre as rizobactérias e a planta. Esta interação simbiótica é um processo muito complexo que envolve a participação dos flavonoides secretados pelas raízes da planta e oligossacarídeos lipoquitina rizobiana (fatores Nod) que possuem um papel de grande relevância para a simbiose, além da participação da superfície celular das bactérias, que consiste de polissacarídeos complexos, entre eles lipossacarídeos (LPS), capsular (CPS), e extracelular (EPS), todos estes envolvidos no processo simbiótico eficaz. (JANCZAREK, 2011). Basicamente existem dois principais tipos de EPSs, encontrados na superfície extracelular que são liberados, as  $\beta$ -glicanas cíclicas, sendo o de maior interesse e, os EPSs devido a sua fácil obtenção (FRAYSSE et al., 2003; DONOT et al., 2012).

Outros fatores que influenciam na composição do EPS são: os fatores ambientais, além de mudanças no ambiente bacteriano (BECKER et al., 1998; KARR et al., 2000; FRAYSSE et al., 2003). Por exemplo, as variações nas condições de cultivos, acrescidos com íons metálicos, alteraram a produção de EPS e biomassa bacteriana (MORETTO, 2014), alterações nas fontes de carbono, também interferem na produção de EPS (BECKER et al., 1998; KARR et al., 2000; CASTELLANE, 2007).

### 2.3. Polihidroxitirato (PHB) de Rizobactérias

Muitas espécies bacterianas sintetizam polihidroxitirato (PHB) como fonte de carbono intracelular para o armazenamento de energia em condições de limitação de nutrientes. Mais de 90 gêneros de bactérias, isoladas de várias fontes, foram encontradas com uma grande variedade de PHBs com propriedades diferentes (MINO et al., 1998). Espécies de rizóbios, como *R. leguminosarum* e *S. meliloti*, sintetizam glicanas cíclicas (BREEDVELD et al., 1993).

Desde a década passada, esforços visando preservar o ecossistema tem levado a busca de novos materiais poliméricos que possam substituir parcialmente os materiais sintéticos (CARASCHI et al., 2002; ROSA et al., 2002; QUINES, 2010) e que minimizem os impactos causados principalmente por materiais a base de petróleo, como os plásticos. Estudos apontam alternativas para a substituição materiais plásticos convencionais sendo uma dessas o uso dos polímeros biodegradáveis como o PHB que possuem muitas aplicações, não ficando restrito a área ambiental, mas também muito aplicada a área biomédica (DUARTE et al., 2004), devido as suas propriedades como plasticidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e sua capacidade de ser sintetizado a partir recursos renováveis (YASHOTHA et al., 2006).

### 2.4. Metais pesados e os microrganismos

Os metais pesados ( $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{2+}/Cr^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}/Ni^{4+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  etc.) são constituintes naturais que possuem uma densidade relativamente maior ao ser comparado com a água (TCHOUNWOU et al., 2012); são comumente encontrados em diversos habitats incluindo os microbianos, devido a processos naturais e industriais (TCHOUNWOU et al., 2012). A contaminação por estes metais é frequente devido as aplicações industriais (produtos farmacêuticos, pesticidas, plásticos, borrachas, curtumes, etc.), (LAKHERWAL, 2014). Alguns efeitos toxicológicos podem surgir devido a capacidade de bioacumulação e biomagnificação, destes íons metálicos como por exemplo o Cromo VI que pode causar danos ao DNA (JAISHANKAR et al., 2014).

Os metais em quantidades traços são essenciais para o funcionamento de numerosos processos biológicos vitais, porém em altas concentrações são

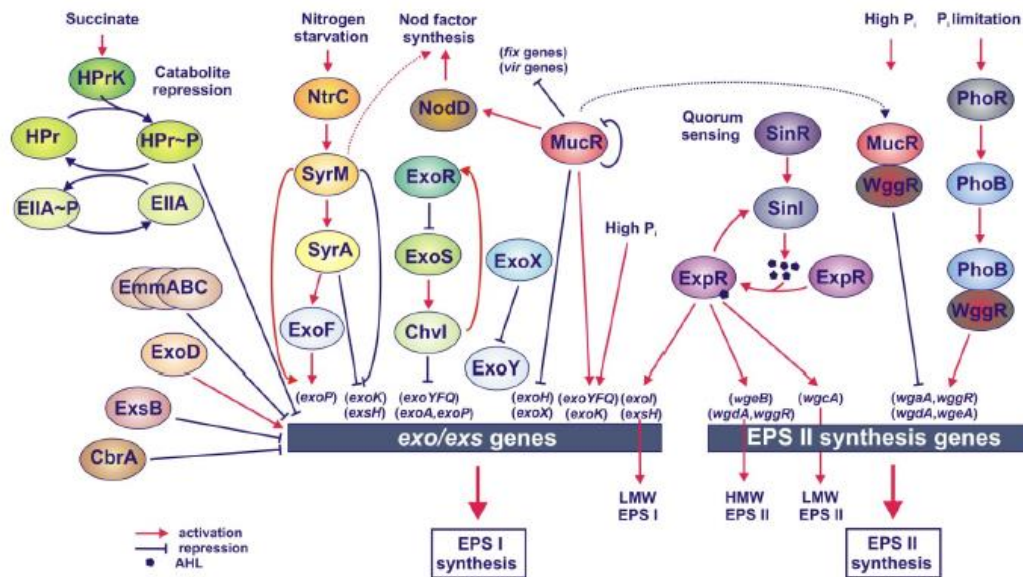
altamente tóxicos para todos os ramos da vida. Visando a adaptação e sobrevivência, os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos de defesas a estes íons, (por efluxo, complexação ou redução de íons metálicos), a maioria destes microrganismos se adaptaram e utilizam estes metais para o funcionamento de seu metabolismo (SPAIN et al., 2003). Em cepas de *Pseudomonas syringae* estudos observaram que estas bactérias possuíam um mecanismo de sequestro do cobre, desta forma adquiriram resistência a este metal (COOKSEY et al., 1990), o operon de resistência ao cobre codifica proteínas, que é regulado por um promotor indutível por cobre, sugerindo que *P. syringae* emprega um sistema sensorial transdução para alterar a expressão gênica em resposta aos estímulos ambientais e regula a expressão de genes de resistência ao cobre (COOKSEY, 1994), fato este também observado na estirpe FB24 *Arthrobacter* sp. que também contém um gene de resistência ao cromato (*crD*), este codifica uma proteína putativa de efluxo, e três genes com similaridades de aminoácidos com os terminais amino e carboxi de ChrB, uma proteína reguladora putativa. (HENNE et al., 2009).

## 2.5 Controle genético da síntese EPS em Rizóbios

A síntese de EPS em rizóbios é um processo que exige muitas etapas e a atividade coordenada de diversas proteínas enzimáticas, do mesmo modo acontece em outras bactérias. Os genes envolvidos no processo de síntese de EPS geralmente estão agrupados em grandes clusters (~ 35 kb) localizados em cromossomos ou megaplasmídeos (FINAN et al., 2001; KANEKO et al., 2002). Estas estruturas contêm genes responsáveis por codificarem enzimas indispensáveis para a síntese de precursores de açúcares e nucleotídicos, enzimas envolvidas na montagem e modificação de proteínas responsáveis pela polimerização de unidades repetidas e também no transporte do EPS para o exterior da rizobactéria (SKORUPSKA et al., 2006). Foram localizados 28 genes *exo*, organizados em vários operons, como genes essenciais na síntese de precursores de açúcares (*exoC*), genes envolvidos na regulação da produção de EPS I (*exoD*, *exoR*, *exoS* e *mucR*) estão ligados a esta região e dispersos por todo o cromossomo (KELLER et al., 1995; UTTARO et al., 1990). Enzimas envolvidas na montagem da unidade (ExoY, ExoF, ExoA, ExoL, ExoM, ExoO, ExoU e ExoW) e modificação (ExoZ, ExoH e ExoV) e proteínas responsáveis

pela polimerização de unidades repetitivas e transporte de EPS I (ExoP, ExoT, ExoQ e ExsA) (GLUCKSMANN et al., 1993; JOFRETT et al., 2009).

A figura 1 mostra a interação de todos os genes que estão ligados ao processo de síntese do EPS, incluindo os genes repressores que afetam a produção do EPS como o *exoR*, responsável pelo início da síntese de EPS em rizóbios. Mutações neste gene (*exoR*) exibe o aumento da produção de EPS I e uma maior expressão nos genes *exo* (JANCZAREK, 2011).



**Figura 1.** Modelo de correlação das vias metabólicas de produção de exopolissacarídeos, quorum sensing e repressão catabólica em *S. meliloti*.

As condições nutricionais e de estresse, bem como a limitações de algum nutriente que não seja carbono, como por exemplo, nitrogênio e/ou enxofre, influência de maneira direta na biossíntese de EPS. A produção de EPS I é estimulada quando há a limitação de fosfato ou baixa pressão osmótica (DOHERTY et al., 1998).



### 3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo estudar a influência dos íons metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ ) no crescimento celular da rizobactéria *Rhizobium tropici*; e o efeito destes na produção dos biopolímeros EPS (exopolissacarídeos) e PHB (polihidroxibutirato), observando as alterações dos grupos funcionais e monossacarídicos das moléculas, e também a expressão dos genes *exoR* e *exoZ* relacionados com a biossíntese de EPS, possibilitando assim verificação da influência destes íons metálicos na produção de EPS e PHB.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal. As técnicas utilizadas neste trabalho não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança.

#### 4.1. Condições e meios de cultivo

O *Rhizobium tropici*, foi cultivado em meio líquido PGY (1,4 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10,0 g de glicerol e 3,0 g de extrato de levedura por litro) à 29°C, com agitação 150 rpm, durante 48 horas. Em seguida foi retirada uma alíquota de 800 mL deste meio de cultivo, e adicionada em 200 mL de glicerol, sendo congelada rapidamente com nitrogênio líquido e estocada a -80°C, sendo este o estoque definitivo do trabalho. Para todos os testes realizados neste trabalho foi utilizado o meio líquido PGY e PSY (1,2 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 30,0 g de Sacarose e 1,0 g de extrato de levedura por litro) conforme descrito por Castellane et al. (2017).

#### 4.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Visando conhecer a toxicidade dos metais cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) para a rizobactéria *R. tropici* foram realizados testes para verificar a concentração mínima inibitória destes metais. Para tanto soluções estoques, de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  na concentração de 1,0 M, preparadas com água deionizada e em seguida autoclavada a  $121^\circ\text{C}$  e 1 atm, durante 15 min. O rizóbio foi multiplicado em 50 mL de meio  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  à  $28^\circ\text{C}$  e 150 rpm de agitação até o platô da fase log. Alíquotas da cultura correspondente a 10% (v/v) foram transferidas para os tubos de vidro Sigmaware (Sigma CAT N° 5916) contendo 5,0 mL do meio  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  adicionados dos metais pesados ( $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ ), separadamente e em conjunto, em uma faixa de concentrações de 0,05 - 10,0 mM. Estas concentrações foram adotadas tendo com base nos dados da literatura (MOHAMAD et al., 2012; XIE et al., 2013). Para o controle, alíquotas do pré-inóculo foram inoculadas em meio de cultivo  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  sem a presença dos íons metálicos. Após o cultivo da bactéria em meio líquido, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido  $\text{PSY}_{\text{sol}}$  com a respectiva concentração do metal; a placa com apenas o meio  $\text{PSY}_{\text{sol}}$  foi utilizada como controle. A CMI foi observada quando a bactéria não apresentou crescimento mesmo depois de 10 dias de incubação.

#### 4.3. Curva de Crescimento Bacteriano

Para o estudo do efeito dos metais cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) sobre o desenvolvimento celular do rizóbio, foi realizada curva de crescimento celular. Para isso, foi preparado um pré-inóculo da bactéria em meio  $\text{PGY}_{\text{liq}}$  que foi mantido a  $28^\circ\text{C}$  em agitação de 150 rpm, incubada por 24 horas, até a  $\text{DO}_{600}$  atingir aproximadamente 1-2. Alíquotas de 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidas para frascos tipos Erlenmeyer contendo meio  $\text{PSY}$  líquido ( $\text{PSY}_{\text{liq}}$ ) com os metais; individualmente  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{6+}$ , e os dois em conjunto e sem os íons metálicos (controle), incubados (a  $28^\circ\text{C}$ , 150 rpm,) em triplicata. As amostras foram retiradas, nos tempos 0, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas e realizadas diluições seriadas. O número de células viáveis foi avaliado por

plaqueamento das diluições em meio PSY sólido (PSY<sub>sol</sub>) e os resultados foram expressos em Unidade Formadora de Colônia (UFC). Além disso, alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos acima, submetidos a centrifugação 10.000 × g, a 4 °C, por 15 minutos, separando-se o sobrenadante das células e estas ressuspensas em 1 mL de água destilada e deionizada até corresponder a 10<sup>7</sup> cel mL<sup>-1</sup> e sendo então utilizadas para as leituras da DO<sub>600</sub> em biofotômetro (Eppendorf).

#### **4.4. Análise do efeito dos íons metálicos sobre a Viabilidade Celular**

##### **4.4.1. Análise de Unidade Formadora de Colônia**

Este ensaio foi proposto para a determinação da viabilidade de células de *R. tropici* sob ação dos íons metálicos cobre (Cu<sup>2+</sup>) a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e cromo (Cr<sup>6+</sup>) 0,05 mmol L<sup>-1</sup> em concentrações determinadas pelo estudo de CMI (item 4.2). Para isso, foi preparado um pré-inóculo da cultura em PGY<sub>líq</sub>, mantido em agitação a 150 rpm, a 28 °C, incubado por 24 h, até DO<sub>600</sub> de aproximadamente 2. Alíquotas de 10% (v/v) do pré-inóculo foram transferidas para frascos Erlenmeyer com meio PGY<sub>líq</sub>, contendo os respectivos íons metálicos e sem metal (controle). Incubados a 30°C com agitação de 150 rpm, em triplicata, nos tempos 0 e 72. As amostras foram retiradas para leitura da absorbância em Densidade Ótica 600 nm em biofotômetro e UFC em Placa de Petri.

##### **4.4.2. Análise por Citometria de Fluxo e Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As suspensões bacterianas foram primeiramente submetidas à avaliação de suas propriedades morfológicas, tamanho e complexidade interna, respectivamente, pela dispersão de um feixe de laser de 488 nm, frontal (Forward Side Scatter-FSC) e lateral (Side Scatter-SSC), em um citômetro de fluxo FACSCalibur™-BD (HEWITT & NEBE-VON-CARON, 2004). A correlação entre morfologia celular e dispersão de luz pode ser usada para estimar a concentração de biomassa (ALLMAN et al.; 1992; ROBERTSON et al., 1998). As amostras da suspensão foram cultivadas em meio PSY<sub>líq</sub> nos respectivos tratamentos: controle sem a adição de íons metálicos, cobre (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), cobre + cromo (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05

mmo L<sup>-1</sup>). As análises de viabilidade celular por citometria de fluxo foram realizadas pela excitação da sonda de iodeto de propídio (PI) com o laser de Argônio 488 nm (15 mW) e emissão em 530/30 nm. Utilizou-se a sonda de PI para monitorar a viabilidade celular individual para além da culturabilidade com base na presença ou ausência de uma membrana citoplasmática intacta (HEWITT & NEBE VON CARON, 2004), em conjunção com a microscopia de transmissão, para observar o bioacumulação de metais, e os grânulos de PHB. Para observar a bioacumulação de metais, e os grânulos de PHB, as células obtidas dos pellets, foram ressuspensas e fixadas em uma densidade de aproximadamente 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> com glutaraldeído, 2%, pH 7,2, (PETERS & HUNZIKER, 2001) por três horas e a leitura foi feita em microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1200 EX, Jeol).

#### **4.5. Influência dos íons metálicos (Cu<sup>2+</sup> e Cr<sup>6+</sup>) sobre produção de exopolissacarídeo (EPS) e polihidroxibutirato (PHB)**

Para analisar o efeito dos íons metálicos na capacidade da bactéria *R. tropici* em produzir EPS e PHB, culturas foram inoculadas em frascos tipo “Erlenmeyer”, contendo meio PGY<sub>líq</sub> (item 4.1) (pré-inóculo) incubado em agitador orbital a 28°C ,150 rpm por 24 horas. Alíquotas de 10% (v/v) da cultura do pré-inóculo foram transferidas para frascos tipo “Erlenmeyer” (300 mL) contendo 100 mL do meio PSY<sub>líq</sub>. (Item 4.1), sem e com a presença dos íons metálicos e incubados, a 28°C ,150 rpm, por 144 horas. Para este ensaio as concentrações testadas foram predefinidas pelo ensaio de CMI (item 4.2), cobre a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e cromo 0,05 mmol L<sup>-1</sup>. Os tratamentos para a avaliação da produção de EPS e PHB foram realizados em (i) meio PSY<sub>líq</sub>. (controle) e este mesmo meio acrescido de: (ii) cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); (iii) cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>); (iv) cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + cromo<sup>+</sup> (0,05 mmol L<sup>-1</sup>). Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento.

##### **4.5.1. Obtenção de Exopolissacarídeo (EPS)**

Para determinar a influência dos íons metálicos sobre a produção de EPS, a bactéria foi cultivada conforme descrito anteriormente. Após o cultivo por 96 e 144h a cultura foi submetida à centrifugação (10.000 × g, a 4°C, por 30

minutos), separando-se as células do sobrenadante. Deste os EPSs foram extraídos segundo metodologia adotada por Castellane et al. (2014). As amostras de EPSs foram secas e pesadas. (g EPS L<sup>-1</sup>). O precipitado obtido após a centrifugação (biomassa celular) foi ressuscitado em solução salina (NaCl 0,85%), novamente centrifugadas (10.000 × g, a 4°C, por 15 minutos) e secas em estufa a 50°C até massa celular se mostrar constante. A eficiência relativa na produção de EPS foi avaliada pela relação entre o total de EPS e a biomassa celular seca.

#### **4.5.2. Obtenção de Polihidroxibutirato (PHB)**

As células recuperadas (biomassa celular, item 4.5.1) foram utilizadas para a extração do PHB que foi sonicada por 5 minutos em um Duty cycle 20 e Output control 5, sem colocar no gelo. Aos frascos contendo as amostras, controle e aqueles com os íons metálicos foram adicionados 15 mL de clorofórmio e agitados vigorosamente por 1 minuto em vortex, mantidos em agitação orbital (150 rpm, 28 °C, por 60 minutos) em seguidas foram centrifugados (4.000 rpm, 20°C, por 30 minutos). Após esta centrifugação as amostras foram mantidas em repouso e da solução trifásica o PHB foi extraído da fase inferior. A solução contendo o PHB foi transferida para béqueres e armazenada em capela de exaustão para evaporação do solvente, overnight. Então, a massa seca das amostras de PHB (seco) foi quantificada (grama de PHB por 1,0 g de biomassa celular seca).

#### **4.6. Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform, FTIR).**

A identificação dos grupos funcionais e possíveis sítios de ligações relacionados a adsorção dos íons metálicos em estudo, foram realizados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transform, FTIR). Amostras de 1 mg (massa seca) dos bioplásticos (EPS e PHB) carregados com os íons metálicos Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup> e Cr<sup>6+</sup> + Cu<sup>2+</sup>, e também o controle sem a presença do íon metálico, foram misturadas com 100 mg de KBr em almofariz de ágata. Os espectros de IR foram obtidos no intervalo de 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> para os bioplásticos. Para o carregamento foram usadas soluções de cobre

a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  e cromo a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  dos íons metálicos em contato por 144 horas, com agitação e temperatura controlada conforme descrito no item (4.5.1 e 4.5.2).

#### **4.7. Determinação da composição monossacarídica do EPS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Para o estudo de alterações na composição dos EPSs produzidos nos meios de cultivos descritos no item 4.1. A composição de monossacarídeos dos EPSs foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando a química de marcação dos monômeros com 1-fenil-3-metil-5-pirazolone (PMP), segundo a metodologia descrita por Fu e O'Neill (1995), modificada por Castellane et al. (2014). Amostra de 1,0 mg de EPS foi hidrolisada com 200  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoracético,  $4 \text{ mols L}^{-1}$  em tubos de hidrólise de 13 x 100 mm, selados com uma chama de maçarico sob vácuo. Os tubos permaneceram a  $120^\circ\text{C}$ , durante 2 horas. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e a solução foi evaporada em um liofilizador Hetovac vr<sup>-1</sup>. O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de isopropanol puro, novamente evaporado. O EPS hidrolisado e os padrões de monossacarídeos padrões foram pré-derivatizados (marcação química) com PMP. As reações foram conduzidas em microtubos, acrescentando-se em cada tubo 40  $\mu\text{L}$  de solução de PMP ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em metanol) e 40  $\mu\text{L}$  de solução de hidróxido de sódio ( $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ ). Os tubos foram agitados e incubados a  $70^\circ\text{C}$  por 2 horas. Após o resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de solução de ácido clorídrico  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ . Foram adicionados 0,5 mL de éter butílico na extração dos derivados de monossacarídeos e os tubos agitados por 5 segundos. As fases foram separadas por centrifugação a  $5.000 \times g$  por 5 minutos e a fase superior (orgânica) foi removida e descartada. Este procedimento de extração foi repetido por 3 vezes e a fase aquosa resultante foi misturada com 1,0 mL de água milli-Q. Nas análises dos monossacarídeos marcados com PMP foram desenvolvidas num sistema para CLAE equipado com um detector UV/VIS (Shimadzu, modelo SPD-M10A). O comprimento de onda para a detecção foi de 245 nm. A separação dos monossacarídeos derivados com PMP foi realizada através de uma coluna Ultra RESTEK-C-18 (150 x 4,6 mm, i.d. x  $5\mu\text{m}$ ) com

velocidade de fluxo constante de 0,5 mL min<sup>-1</sup>; usando os tampões A e B, constituídos por 100 mmol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio (pH 5,5), 25% de acetonitrila, com 10% e 25% de acetonitrila, respectivamente. O gradiente para a separação foi 0% de B, 30 minutos e 0-100% de B, até 100 minutos. Os monossacarídeos padrões utilizados foram glicose, manose, ramnose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico, e as seguintes concentrações: 0,0125; 0,0250. 0,0500 e 0,1000 mg mL<sup>-1</sup> para a construção da curva de calibração. A quantidade de amostra injetada no cromatógrafo foi de 20 µL.

#### 4.8. Efeito dos íons metálicos na expressão gênica em *Rhizobium tropici*

##### 4.8.1. Desenho dos primers para a avaliação da expressão do gene *exoR* e *exoZ*

Para realizar esta avaliação, foi necessário o desenho dos primers a partir das sequências dos genes *exoR* e *exoZ* responsáveis pela codificação da proteína (exo) exopolissacarídeos, do organismo do gênero *Rhizobium tropici* CIAT 899 encontrados no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram alinhadas pelo programa ClustalX 1.5b (THOMPSON, 1997), e visualizadas pelo programa Bioedit (HALL, 1999), o qual apresenta uma sequência conservadas para os genes de acordo com o alinhamento. Os primers foram desenhados de acordo com as sequências descritas abaixo, sendo a região de alinhamento destacada em vermelho (Figura 2).

```

. . . TCCCGCTGGGCTCTCGCCAACATGTATGCCGATGGCGATGGCGTGACGCAGAACGATTTTCG
AAGCTTTCAAGATCTATAGCGAGATCGCCCAGCAGGGCGTGGAGCCAGGTTTCGGAAGACACCGG
TTTCTTTCATCAACGCGCTGCTGGCGCTTGCGAGCTACTACAAAAGCGGCAATCCCAACAGCCCC
GTAAAGATCGACCTCAATCAGTCCCGCCAGCTTTATTTCCAGGTGGCATCCACCTTCGGCGTGC
CGG . . .

```

```

>ExoR_Forward primer
TATAGCGAGATCGCCCAGCA

```

```

>ExoR_Reverse primer
CTTTACGGGGCTGTTGGGAA

```

Para o gene ExoZ

```

. . . CCCCTCACCTATCTCGGCAACGCGTCCTATTTCGATCTATCTCTGGCATAACGCTCGCGATCT
CGGTGATCGTCAAGCTGCTGTCGTCGCTACAGATACCGTCAGACGCCGTTACCTTCGTCAGCGT
CATCTTCGGCACGCTCCTCGGCGTTGTTCGCCTATGAAGCCGTCGAAAAGCCGTTGCGCAATCTG
CTGAAGGGCCTGAGCTGGCGGAGATCCCGGCCCTCGCCGGCCTGA. . .

```

>ExoZ Forward primer

CTGCTGTCGTCGCTACAGAT

>ExoZ Reverse primer

CTCAGGCCCTTCAGCAGATT

**Figura 2.** Fragmento do alinhamento pelo software Clustaw X das sequências do gene *exoR* e *exoZ* de *Rhizobium tropici* CIAT 899.

Para o desenho foi utilizado as sequências do gene de *Rhizobium tropici* CIAT 899, com as regiões conservadas onde foi desenhado o conjunto de primers. O primer do gene *exoR* possui o amplicon de 120 pb de e temperatura de melting (Tm) de 62,6° para o reverse e 62,8°C para o foward, para o gene *exoZ* 128 pb de amplicons e as respectivas temperaturas 57,6 e 60,3 °C, sendo estas adequadas para a análise de expressão gênica pela técnica de Real time PCR. Para o controle endógeno foi realizado o mesmo procedimento.

#### 4.8.2. Determinação e desenho do primer para controle do gene endógeno

Para a análise quantitativa na reação de PCR em tempo real, foi necessária utilização de um controle endógeno, sendo esse um gene com uma expressão constante no organismo e de preferência com expressão similar ao gene a ser analisado. Como controle endógeno foi utilizado o gene Sigma A rRNA (fator sigma primário da RNA polimerase). Para isso, foram selecionadas as sequências do gene Sigma A rRNA de um conjunto de bactérias de interesse, principalmente do gênero *Rhizobium*, no site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram alinhadas pelo programa ClustalX 1.5b (THOMPSON, 1997), e visualizadas pelo programa Bioedit (HALL, 1999), o qual apresenta uma sequência consenso de acordo com o alinhamento. Após o alinhamento, foi observado que haviam similaridades entre as sequências, e que haviam regiões em que poderia ser desenhado os pares de primers de acordo



com os parâmetros da PCR em tempo real. Com isso foi utilizado para o desenho dos primers o programa Primer Express (PrimerExpress software, Applied Biosystems versão 7500).

#### 4.8.3. Extração de RNA

Células bacterianas de *R. tropici* foram obtidas a partir de 100mL de suspensão do cultivo nas condições (i) meio PSY<sub>liq.</sub> (controle) e este mesmo meio acrescido de: (ii) cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); (iii) cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>); (iv) cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>). Após a centrifugação (12.000 rpm, durante 10 minutos, a 22 °C) o sedimento bacteriano foi ressuspensionado em 100 µL de solução de lise (0,2 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima em 1 mL de T.E) e pré-aquecido a 37 °C por 10 minutos no Eppendorf ThermoMixer® F1.S, as etapas subsequentes foram realizadas de acordo com o kit de isolamento de RNA, (RNAspin Mini), com algumas modificações, foram adicionados 350 µL de solução de lise e juntamente com 3,5 µL β-mercaptoetanol e misturados por vortex, após toda a mistura foi filtrada na RNAspin Mini Filter para a retirada das impurezas e submetido a centrifugação (11.000 × g por 2 minutos), após foram adicionado 350 µL de etanol a 70% e misturados por vortex por 5 segundos, a solução foi filtrada através da centrifugação (8.000 × g por 1 minutos) em uma RNAspin Mini Column para a retenção do material genético o sobrenadante foi descartado e o material genético transferido para outro tubo aonde foram adicionados 350 µL do tampão de dessalinização (solução MDB) e centrifugado (11.000 × g por 2 minutos), na membrana de sílica foram adicionados 95 µL DNase, e deixada em repouso por 45 minutos em temperatura ambiente, na etapa de lavagem 200 µL Wash Buffer I foi adicionado a membrana de sílica e centrifugado (11.000 × g por 2 minutos), em continuação a esta etapa 600 µL e 250 µL respectivamente da solução Wash Buffer II foram adicionados e novamente centrifugado (11.000 × g por 2 minutos), para a eluição 50 µL de água RNase – free, a etapa foi repetida por duas vezes. O RNA extraído foi armazenado em freezer -80°C.

#### 4.8.4. Quantificação e qualidade do RNA total

As amostras de RNA total extraídas dos cultivos bacterianas foram quantificadas em Agilent Bioanalyzer, utilizando os protocolos do kit, para a verificação da integridade do RNA extraído.

#### 4.8.5. Transcrição reversa

Para a quantificação da expressão do gene *exoR* e *exoZ* pela técnica de Real time PCR, foi necessário a transformação das amostras de RNA para cDNA. Para isso, foram feitas reações com o RNA total, na concentração de 5 ou 10µL de acordo com a quantificação de cada amostra, adicionando-se 1µL de *random primers* (50-250 ng), 1µL de dNTP (10 mM), completando a reação com H<sub>2</sub>O DEPC, em seguida manteve a reação a 65°C por 5 minutos. Após esse período, foi acrescido 4µL de tampão para enzima [5x] (Promega), 1µL DTT (0,1M) esta reação foi mantida a 25°C por 2 minutos, posteriormente foi adicionado 1µL da enzima Superscript II. A síntese do cDNA foi efetuada á 42°C durante 0:50 minutos.

#### 4.8.6. Reação de PCR em tempo real

Para avaliação da expressão dos genes *exoR* e *exoZ* em *R. tropici* (LBMP-C01) em meio PSY<sub>líq</sub>, contendo os íons metálicos nas concentrações determinadas pelo ensaio de CMI, para cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e a junção dos dois íons cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) nas três fases de desenvolvimento (lag, log e estacionária) totalizando 16 amostras. A concentração de cDNA utilizada foi de 2 ng µL<sup>-1</sup> e a concentração do primer utilizada de 100 µM. A reação de marcação foi feita com 10 µM fluorcromo SYBR Green máster mix (kit-Abbott Real time HBV) e como controle endógeno o gene Sigma A rRNA, na mesma concentração proposta para o gene *exoR* e *exoZ*. A amplificação e detecção do cDNA amplificado foram executadas com o aparelho “7500 Real time PCR System” (Applied Biosystems), utilizando o programa 7500 systems SDS software versão 1.3 (Copyright 2001-2004-Applied Biosystems).

#### 4.8.7. Análise dos dados e estudo da quantificação relativa

A análise dos dados gerados e quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foram executadas utilizando-se o método comparativo do Ct (threshold cycle) de quantificação relativa baseada no algoritmo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que gera o valor da expressão do gene alvo, normalizada pelo calibrador endógeno. O ajuste da linha de base e do “threshold” podem ser automaticamente determinados e utilizados para a construção dos gráficos dos níveis de expressão.

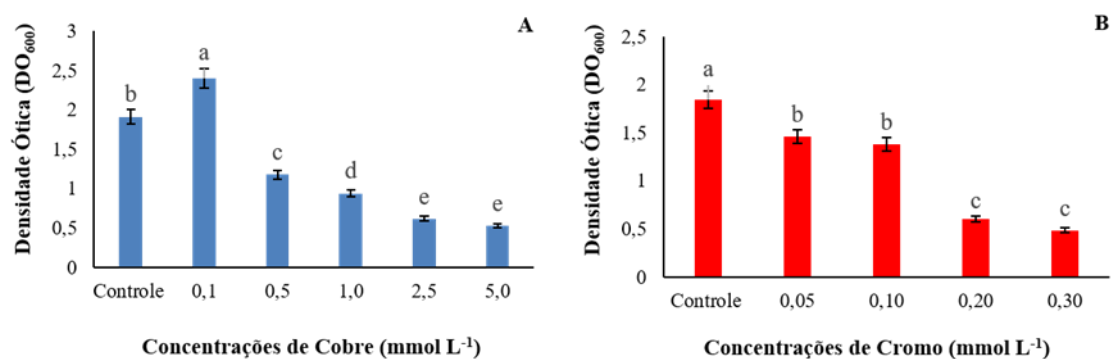
#### 4.9. Análise estatística

Os dados obtidos dos padrões de comparação dos biopolímeros foram analisados pelo Software R, submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre médias de tratamento.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A bactéria *R. tropici* foi cultivada em meio PSY<sub>líq</sub> contendo os íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) individualmente para avaliar a concentração mínima inibitória. Os dados demonstram que a rizobactéria apresentou sensibilidade às concentrações acima de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 3.A). O desenvolvimento celular desta rizobactéria na concentração  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , não se diferencia do tratamento controle, mostrando colônias viáveis como pode ser observado em placas de Petri contendo o meio PSY<sub>sol</sub> nesta mesma concentração. Quanto ao grau de toxicidade ao íon cromo ( $\text{Cr}^{6+}$ ) a rizobactéria apresentou maior sensibilidade às concentrações do que ao íon  $\text{Cu}^{2+}$  (Figura 3). Além disso, a bactéria apresentou crescimento celular nas concentrações  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , mostrando-se altamente sensíveis nas demais concentrações testadas acima não sendo, portanto, observadas colônias viáveis em culturas sólidas.



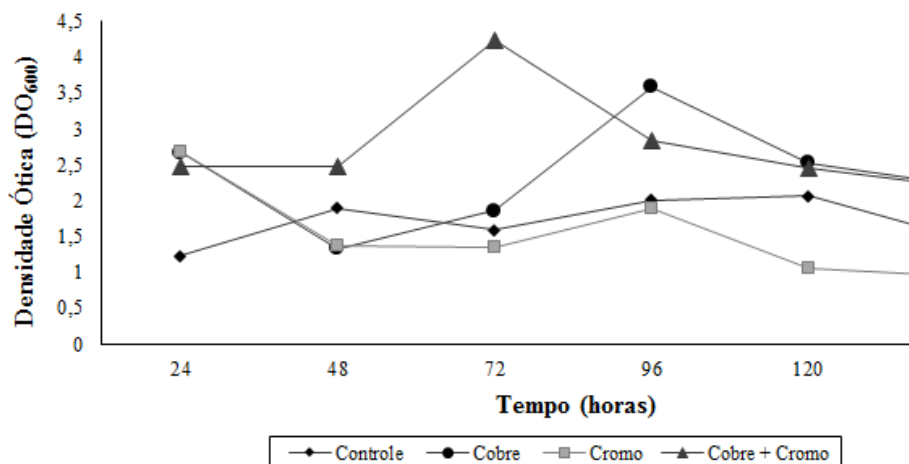
**Figura 3.** Ensaio da Concentração Mínima Inibitório (CMI) analisado por Densidade Óptica (DO<sub>600</sub>) com desvio padrão de 5%, crescimento celular de *R. tropici* em meio de cultivo PSY<sub>liq</sub> contendo (A) cobre (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O) e (B) cromo e (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), incubados a 28 °C sob agitação de 150 rpm, até 144 horas,

Alguns metais são essenciais, para o desenvolvimento de bactérias e outras células em concentrações traços, porém, em concentrações elevadas, os metais pesados interferem no crescimento celular dos microrganismos e na síntese dos ácidos nucleicos (OGAWA et al., 1989). Mohamad et al. (2012) relataram que o isolado *Mesorhizobium amorphae* CCNWGS0123 apresentou crescimento celular em meio YML com 0,6 mmol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> e 2.2 mmol L<sup>-1</sup> de Cu<sup>2+</sup> meio líquidos TY. O *R. tropici* em estudo, mostrou-se muito sensível ao íon Cr<sup>6+</sup> só apresentando desenvolvimento em meio de cultivo complementado com concentrações abaixo de 0,05 mmol L<sup>-1</sup> do íon metálico, diferentemente do *M. amorphae* CCNWGS0123 que quando cultivado em meio de cultura TY ágar suplementado com várias concentrações de diversos íons metálicos, sobreviveu em altas concentrações: 2,4 mM para Cr (III) and Cu (II); 1,6 mM para Cr (VI) e Zn (II) e 1,2 mM para Ni (II) (XIE et al., 2013).

## 5.2. Curva de Crescimento Bacteriano

*R. tropici* foi cultivado em meio PSY<sub>liq</sub> suplementado com íons metálicos (Cu<sup>2+</sup> e Cr<sup>6+</sup>) nas concentrações pré-determinada pelo ensaio de concentração mínima inibitória (item 5.1) e na Figura 4 observa-se os resultados. No tratamento controle, a rizobactéria apresentou uma fase lag até 8 h e, em seguida, entrou na fase exponencial, onde, atinge o final desta fase após 96

horas de cultivo. No entanto, quando cultivado em meio PSY<sub>líq</sub> contendo cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), observamos uma fase de crescimento exponencial mais longa, onde ocorre a intensificação do metabolismo celular porque, para crescer exponencialmente é preciso muita energia, isto é, a célula necessita produzir grandes quantidades de ATP à custa de um grande consumo de uma fonte de carbono (BARNETT, 1976). Quando se tem nutrientes e condições adequadas para assimilá-los, as bactérias irão absorvê-los e transformá-los para suas funções básicas do metabolismo (SCHAECHTER et al., 1958). Em relação, ao tratamento com a presença de cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) o final da fase exponencial ocorre em 96 horas. Os dados apontam que o tratamento em que as células foram cultivadas com meio PSY<sub>líq</sub> complementado com a mistura dos dois íons metálicos [cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) + cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ], no tempo de 72 horas entram na fase estacionária, apresentando uma  $DO_{600} = 2,8$ . As leituras indicam o tempo exato em que as células atingiram o final da fase log da curva de crescimento celular; este fato demonstra a importância do estudo do crescimento bacteriano, pois permite a análise das fases de crescimento, mostrando o início da produção de metabólicos, incluindo o EPS.



**Figura 4.** Curva de crescimento celular de *R. tropici* em meio PSY<sub>líq</sub> por leitura de Densidade Óptica (DO<sub>600</sub>) nos respectivos tratamentos: controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), mantidos até 144 horas sob agitação de 150 rpm a 28 °C.

### 5.3. Análise de Unidade Formadora de Colônia

Para analisar a viabilidade das células de *R. tropici* em meio PSY<sub>líq</sub>, contendo os íons metálicos nas concentrações determinadas pelo ensaio de CMI, a viabilidade celular dos respectivos tratamentos foi analisada após 0 e 72 horas (Tabela 1). Os dados apresentados mostram que todos os tratamentos no tempo zero contém uma concentração 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, isto se deve, ao fato do pré-inóculo ser o mesmo. Foram plaqueados 100 µL da suspensão de células, na concentração 10<sup>5</sup> em meio PSY<sub>sol</sub> contendo os respectivos tratamentos. No tempo 0, pode-se observar que as células não sofreram com a ação dos íons metálicos, houve predominância de colônias por toda a placa, impossibilitando a quantificação, indicando que as células estavam viáveis. Os dados de DO<sub>600</sub> confirmam estes resultados embora apresentem uma pequena variação

podendo indicar interferência devido aos metabólitos produzidos pelas bactérias que são liberados no meio de cultura. Após 72 horas, não houve diferença em todos os tratamentos estudados, uma vez apresentaram praticamente o mesmo número de células ( $3,17 - 5,83 \times 10^9 \text{ cel mL}^{-1}$ ) como pode se observar pelo UFC ( $1,7 - 2,6 \times 10^{10} \text{ cel mL}^{-1}$ ).

**Tabela 1.** Análise da viabilidade das células de *R. tropici* em meio PSY<sub>liq</sub> acrescido de íons metálicos cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) + cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), nos tempos 0 e 72 horas sob agitação 150 rpm a 28°C.

Tratamentos	DO <sub>600</sub>		Unidade Formadora de colônias (UFC)	
	T <sub>0</sub>	T <sub>72</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>72</sub>
<b>Controle</b>	0,74	4,78	$10^7$	$1,7 \times 10^{10}$
<b>cobre 0,1 mM</b>	0,52	6,65	$10^7$	$1,9 \times 10^{10}$
<b>cromo 0,05 mM</b>	0,79	2,26	$10^7$	$2,0 \times 10^{10}$
<b>cobre + cromo</b>	0,86	3,29	$10^7$	$2,6 \times 10^{10}$

#### 5.4. Análise da Viabilidade Celular por Citometria de Fluxo

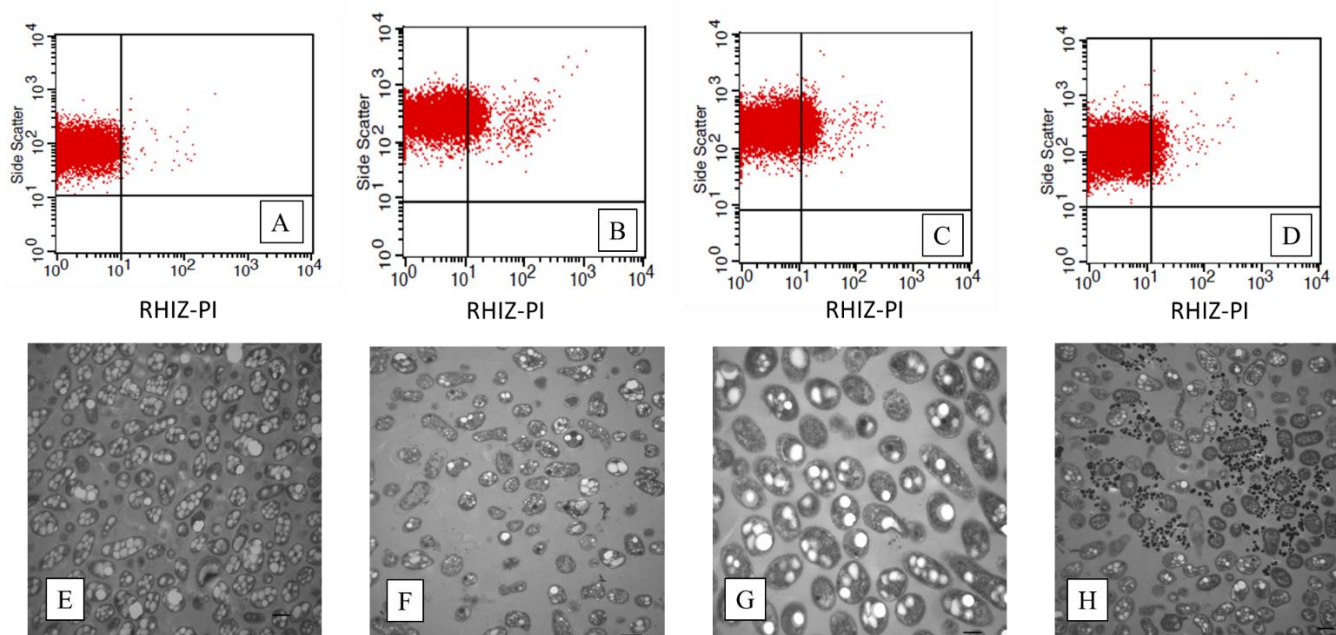
As análises feitas por citometria de fluxo foi empregada para investigar a viabilidade celular de *R. tropici* na presença e ausência de íons metálicos, utilizando como parâmetro a intensidade de fluorescência emitida pela sonda Iodeto de Propídio (PI), ligada a ácidos nucleicos quando ocorre morte celular (HEWITT & NEBE VON CARON, 2004). Para o controle negativo, utilizou-se as células não tratadas com os íons metálicos, para que se pudesse monitorar a exclusão do fluorocromo na presença de integridade da membrana bacteriana (dados não mostrados). Para cada tempo de análise de viabilidade por citometria de fluxo, foi produzida uma imagem para o mesmo tratamento analisada por microscopia eletrônica de transmissão (Fig. 5). Os parâmetros FSC e SSC para cada suspensão bacteriana e o controle de fluorescência na região de emissão do iodeto de propídio, 530/30nm (FL1), foram previamente estabelecidos. O controle de viabilidade celular foi realizado com a suspensão bacteriana, sem

tratamento com os compostos metálicos, mas mantida em cultura nas mesmas condições experimentais. O ajuste do limite de fluorescência negativa para as células viáveis, ou seja, aquelas que excluíram o fluorocromo iodeto de propídio, foi determinado como threshold FL1; a partir do qual, a presença de células marcadas com fluorescência foi considerada como morte celular e expresso em percentual (% Gate) como mostra a tabela 2. Os resultados das análises de citometria de fluxo estão mostrados nas figuras 5(A-E). O controle sem a influência de íons metálicos apresentou 98,69 % de células viáveis com 1,3 % de morte celular (Figuras 5.B e 5.F). O tratamento com cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) reduziu a viabilidade para 84,5 %, com 15,49 % de morte celular (Figuras 5.C e 5.G). O tratamento com cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) apresentou 85,58 % de viabilidade e 14,41 % morte (Figuras 5.D e 5.H). O tratamento com cobre + cromo [ $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ )] apresentou 85,58 % de viabilidade e apenas 10,49 % de morte celular. A determinação da viabilidade celular por citometria de fluxo usando o fluorocromo iodeto de propídio, como sonda fluorescente que possibilita revelar alterações de permeabilidade na membrana celular como consequência da morte bacteriana em cultura em meio líquido, demonstrou alta sensibilidade, rapidez em sua realização em relação aos métodos tradicionais.

**Tabela 2.** Percentual de células vivas da rizobactéria *R.tropici* em meio PSY<sub>liq</sub> após a análise de Citometria de fluxo de dispersão luminosa nas condições controle (sem a presença de íons metálicos); cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  +  $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), onde a porcentagem de células vivas é expressa em gates (%).

Tratamento	Gates		Morte celular	
	(%)		(%)	
<b>controle</b>	98,69	a	1,3	c
<b>cobre</b>	84,5	b	15,49	a
<b>cromo</b>	85,58	b	14,41	a b
<b>cobre + cromo</b>	85,58	b	10,49	b





**Figura 5.** Cultivo bacteriano durante o período de 72 horas, submetidos a Citometria de fluxo de dispersão luminosa, mostrando a diminuição da população na presença dos íons metálicos, e microscopia eletrônica de transmissão, mostrando a população bacteriana no respectivo tempo, barra de 500 nm. Os tratamentos são: (A e E) controle sem a influência de íons metálicos; (B e F) cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); (C e G) cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), (D e H) cobre + cromo ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  +  $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Apesar do tratamento com cobre, não apresentar diferença significativa no desenvolvimento de *R. tropici* estudado no presente trabalho, ao ser comparado com o controle (sem a presença dos íons metálicos), os dados mostram que o íon proporcionou que as células se mantivessem vivas por 144 horas. Com isso concluímos que as bactérias em contato o íon  $\text{Cu}^{2+}$  pode estar ativando algumas vias bioquímicas como e.g. o aumento de produção de EPS e PHB, garantindo a sobrevivência por maiores períodos, para a utilização destas moléculas como fonte de carbono. O elemento cromo está ligado a ativação de outras proteínas que são expressas pelo gene *chrA* relacionado ao efluxo de cromato. Este gene está envolvido em um mecanismo de resistência conferido pela proteína ChrA, que funciona como uma bomba quimiosmótica de efluxo cromato no citoplasma (PIMENTEL et al., 2002). O efluxo de cromato é um mecanismo eficiente e generalizado à resistência, o que impede o acúmulo de íons metálicos em níveis tóxicos no interior da célula (AGUILAR-BARAJAS et al.,

2012). Os resultados obtidos quanto a curva de crescimento celular da rizobactéria, na presença dos íons  $\text{Cr}^{6+}$  as células bacterianas conseguiram sobreviver, fato que pode ser explicado, pela presença na célula bacteriana de mecanismos de defesa. Os resultados sugerem que os exopolissacarídeos secretados pela bactéria promovam uma proteção adsorvendo os íons metálicos e reduzindo a disponibilidade destes às células (KILIC e DONMEZ et al., 2008; HARISH et al., 2012), fato que pode ser observada na curva de  $\text{DO}_{600}$  que contém além de células os metabólicos produzidos.

### **5.5. Produção de exopolissacarídeo (EPS) com e sem metal**

A Tabela 3 apresenta as médias dos resultados obtidos no ensaio de determinação da produção de EPS e biomassa celular seca após 96 e 144 horas de cultivo em meio  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  com e sem a presença de íons metálicos. No tratamento controle, a produção de EPS após 96 e 144 horas do rizóbio foram 3,97 e 3,14  $\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Enquanto que, quando cultivados em meio  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  contendo o íon metálico cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a produção de EPS após 96 e 144 horas foi 5,22 e 4,67  $\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, não diferenciando estatisticamente do tratamento controle. Apesar da análise estatística demonstrar que não há diferença entre os tratamentos controle e meio contendo cobre, a rizobactéria na presença deste íon metálico demonstrou aumentos de 31 e 48%, nos respectivos tempos testados (96 e 144 horas), em comparação à produção no meio sem a presença do íon metálico (controle). No entanto, com a influência do íon cromo ( $\text{Cr}^{6+} 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), ocorreu uma diminuição na produção de EPS, tendo os valores de produção de 1,58  $\text{g L}^{-1}$  em 96 horas e 0,58  $\text{g L}^{-1}$  em 144 horas.

O tratamento controle apresentou biomassa estatisticamente semelhante nos respectivos tempos 1,56 e 1,53  $\text{mg L}^{-1}$ , enquanto a condição de tratamento cobre + cromo, não variou estatisticamente com a massa de 1,04  $\text{mg L}^{-1}$  em ambos os tempos testados; já o tratamento com cobre produziu maior quantidade de biomassa no tempo de 96 horas (1,48  $\text{mg L}^{-1}$ ) do que no tempo de 144 horas (1,31  $\text{mg L}^{-1}$ ).

**Tabela 3.** Produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular em meio de PSY<sub>líq</sub> por *R. tropici* e eficiência relativa de produção de EPS, controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu<sup>2+</sup>a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), mantido sob agitação 150 rpm, 28 °C por 96 horas e 144 horas.

Tratamentos	EPS		Biomassa		Relação EPS/Biomassa		pH
	(g/L)		(mg/L)		(%)		
	96 h	144 h	96 h	144 h	96 h	144 h	
<b>controle</b>	3,97 ab	3,14 ab	1,56 a	1,53 a	2,63 ab	2,01 ab	6,68
<b>cobre</b>	5,22 a	4,67 a	1,48 ab	1,31 ab	3,75 a	3,79 a	6,68
<b>cromo</b>	1,58 b	0,58 b	0,91 b	0,88 b	1,75 ab	0,67 b	6,60
<b>cobre + cromo</b>	0,77 b	1,53 b	1,04 ab	1,04 ab	0,74 b	1,50 ab	6,73

Médias seguidas das mesmas letras não diferenciam entre si estatisticamente.

Os EPSs possuem diversas funções uma delas é proteger as células de vida livre, organizadas em biofilmes ou mesmo em simbiose com plantas (LAUS et al., 2005; GLENN et al., 2007). As bactérias podem sintetizar uma ampla gama de biopolímeros que apresentam material com propriedades adequadas para serem empregados em inúmeras aplicações no setor industrial (REHM, 2010). Tanto os fatos naturalmente intrínsecos às alterações do ambiente, como as condições artificiais de cultivo podem influenciar a produção de EPS e outras biomoléculas produzidas pelos microrganismos. O meio de cultivo influência no crescimento celular e na produção de EPS e, alteração em algumas fontes de carbono podem estimular ou diminuir a produção de EPS (STAUDT et al., 2012). Diferentes concentrações de óleo diesel (0,1 – 10%) e sucrose (como fonte de carbono) suplementado ao meio de cultivo PSY<sub>líq</sub> estimulou a produção de EPS do isolado de *R. tropici* (SEMIA 4080) (CASTELLANE et al., 2017).

Os principais monossacarídeos detectados por RP-HPLC são D-glucose, D-galactose, L-rhamnose e D-manose com variações em suas proporções de acordo com o tratamento de metal usado (Tabela 3). Castellane et al. (2014) indentificaram as unidades de açúcar de repetição de EPS a partir de cepas de *Rhizobium tropici* e encontraram como componentes majoritários os monossacarídeos glicose e galactose, com baixo teor de manose, ramnose,

ácido glucurônico e ácido galacturônico, ao usar sacarose como substrato. Estes EPS relatados aqui também contêm ácidos urônicos, como o ácido D-glucurônico e o ácido D-galacturônico. Staehelin et al. (2006) verificaram que o EPS ácido sintetizado por *Rhizobium* sp. NGR234 foram compostos por resíduos de galactosilo glucosilo, galactosilo, glucuronosilo e 4,6-piruvilados com ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4,  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,4. Priyanka et al. (2015) observou que EPS sintetizado por *Rhizobium* sp. PRIM-18 foi formado por glicose, galactose e manose (6.1: 1.8: 1). Nenhum trabalho, relata até o momento a produção e caracterização de EPS produzidos por microrganismos em meios de cultivo suplementados com metais pesados, fato este que mostra a relevância desta pesquisa.

### **5.6. Produção de polihidroxibutirato (PHB) com e sem metal**

A quantidade de PHB produzida foi determinada após o término do tempo de cultivo de 144 horas, a partir de 1 g de célula seca (m/m). Ao cultivarmos a bactéria *R. tropici* em meio PSY<sub>líq</sub> controle e com a presença de cobre a quantidade de PHB não foi estatisticamente diferente. Apesar do tratamento contendo cobre não diferir estatisticamente do tratamento controle, a presença do íon cobre promoveu um aumento de 46,66% de PHB. Este dado é muito importante, pois a produção em larga escala para uma futura aplicação em processo industrial de produção deste biopolímero, em que apenas com o incremento do sal metálico, o que não onera o processo, por se tratar de uma concentração irrisória, tendo em vista que proporcionará um aumento de quase 50% de produção de PHB. Em relação ao cultivo em meio PSY<sub>líq</sub> suplementado com cromo e cobre + cromo apresentou uma redução da produção de PHB em torno de 73,33% e não diferiram com o tratamento controle. Os PHBs (constituído de unidades repetidas de 4 átomos de carbono) e os PHAs são acumulados intracelularmente por bactérias como reservas de fontes de carbono e/ou energia sob a limitação de um nutriente que é essencial para seu desenvolvimento como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio (FIGUEIREDO et al., 2014). É considerada uma alternativa para a substituição de plásticos não biodegradáveis, pois são completamente biodegradáveis, podendo ser utilizado na medicina, devido a sua biocompatibilidade. De acordo com Wang et al.

(2007), que testou diversas fontes para quantificar a produção de PHB e EPS, os resultados mostraram que a produção específica de PHB apresentou uma correlação exponencial com as células, taxa de crescimento e taxa de produção EPS. Além disso, o PHB foi observado como o principal armazenamento de carbono e fonte de energia por *Ralstonia eutropha* em condições limitadas de nitrogênio. O rendimento de PHB na glicose atingiu valor de 0,34 g/g em concentrações de glicose de 38,2 g L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 3,2 g L<sup>-1</sup>, mostrando como a fonte, influência tanto a produção de PHB quanto de EPS (WANG et al., 2007). Isolado de *Bacillus* spp. apresentou melhor produção de PHB com glicose como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio, capaz de acumular 55,6; 51,6; 37,4 e 25% de PHB quando foram utilizados como fontes de carbono o bagaço de cana-de-açúcar (pré-tratado), espiga de milho, palha de tefe (*Eragrostis tef*) e casca de banana (GETACHEW & WOLDESENBET, 2016).

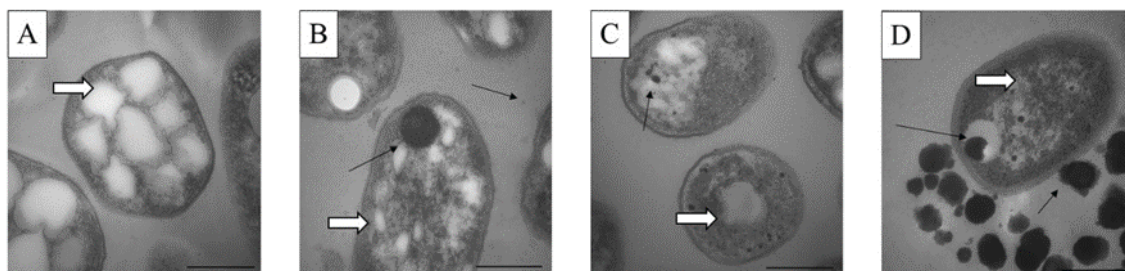
O polihidroxibutirato é um produto utilizado para sintetizar plástico biodegradável, sendo capaz de ser produzido por uma grande variedade de organismos por se tratar de recursos renováveis, esta biomolécula tem potencial para substituir os plásticos convencionais cuja matéria-prima são combustíveis fósseis. Apesar destas vantagens, o PHB ainda é uma matéria-prima comercialmente subutilizada em relação aos plásticos sintéticos à base de petróleo (MOZUMDER et al., 2014). Embora o aumento do preço do petróleo e da consciência sobre a produção comercial de PHB, os principais inconvenientes é o alto custo de produção desta biomolécula. Segundo Mozumder e colaboradores (2014) os fatores que afetam a economia do PHB incluem os custos das matérias-primas e dos processamentos. Os mesmos autores relatam a importância de compreender e otimizar o processo de fermentação para a produção desta de PHB. Diante disto nosso trabalho tem muito a contribuir uma vez que não há relatos na literatura de meios de cultivo suplementados com sais metálicos, além da importância do cobre para um aumento de aproximadamente 50% da produção de PHB.

**Tabela 4.** Produção de polihidroxibutirato (PHB) e eficiência relativa de produção de PHB produzido por *R. tropici* cultivado em meio PSY<sub>líq</sub> nas respectivas condições: controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), mantido sob agitação 150 rpm, 28°C por 144 horas.

Tratamento	PHB	Relação PHB / célula	
	(g)	(%)	
<b>controle</b>	0,15 ab	15,31	ab
<b>cobre</b>	0,22 a	21,64	a
<b>cromo</b>	0,04 b	4,09	b
<b>cobre + cromo</b>	0,04 b	4,21	b

Dados seguidos de mesmas letras não diferenciam estatisticamente entre si.

De acordo com a Figura 6 podemos observar a produção de PHB no interior das células da rizobactéria *R. tropici* nas diferentes condições de cultivo testada: controle (meio de cultura PSY<sub>líq</sub>), cobre (meio PSY<sub>líq</sub> + Cu<sup>2+</sup> 0,1 mmol L<sup>-1</sup>), cromo (meio PSY<sub>líq</sub> + Cr<sup>6+</sup> 0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e cobre + cromo (meio PSY<sub>líq</sub> + Cu<sup>2+</sup> 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> 0,05 mmol L<sup>-1</sup>). A Figura 6.A é a imagem de microscopia de transmissão do interior de células do *R. tropici* cultivada em meio PSY<sub>líq</sub> sem a presença dos íons metálicos. As células bacterianas referentes ao tratamento controle demonstra a presença de grandes grânulos de PHB no interior das células (indicados pela seta branca). Células de *R. tropici* cultivadas em meio PSY<sub>líq</sub> + Cu<sup>2+</sup> (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) apresenta grânulos menores comparados ao tratamento controle, mas presente em todo o citoplasma da célula (seta branca) e a presença de íons Cu<sup>2+</sup> concentrado no vacúolo (seta preta), ilustrados na figura 6.B. O tratamento com meio PSY<sub>líq</sub> + Cr<sup>6+</sup> (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) apresenta poucos grânulos de PHB e pequenos vacúolos contendo o íon cromo, seta branca e preta, respectivamente na Figura 6.C, o metal pode ser observado aderido à parede celular. A Figura 6.D apresenta poucos e pequenos grânulos de PHB e a presença de íons em mistura Cu<sup>2+</sup> (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + Cr<sup>6+</sup> (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) em vacúolos no interior do citoplasma.



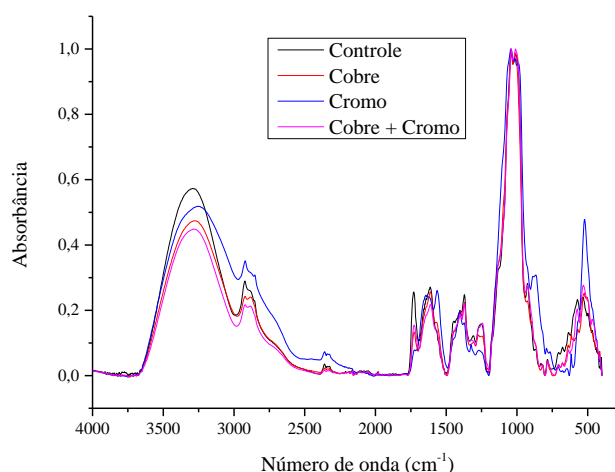
**Figura 6.** Microscopia eletrônica de transmissão (MET), as células foram examinadas no final do experimento no tempo de 72 horas, (A) controle sem a influência de íons metálicos, (B) cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); (C) cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), (D) cobre + cromo ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  +  $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), mostrando o acúmulo dos grânulos de PHB (setas brancas), e o acúmulo dos íons metálicos (setas pretas). Barra de 500 nm.

Apesar da literatura relatar que a produção de EPS é inversamente proporcional á produção de PHB pelas células de bactérias (TAVERNIER et al., 1997) observamos o presente trabalho que a células bacterianas de *R. tropici* quando cultivadas em meio suplementado com cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) promoveu elevação da produção dos dois biopolímeros. Diante disto, ressaltamos a importância de novos estudos investigando as vias metabólicas da EPS e PHB na presença de cobre

### 5.7. Análise de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (Fourier Transform, FTIR)

A análise de espectroscopia de FTIR da composição molecular do exopolissacarídeos (EPS), e também dos polihidroxibutiratos (PHB), produzidos em meio  $\text{PSY}_{\text{liq}}$  na ausência (controle) e presença dos íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); de cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e a mistura dos dois íons metálicos [ $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ]. Os espectros obtidos a partir da análise dos EPSs obtidos, produzidos pela rizobactéria *R. tropici*, cultivada nas condições descritas, foram analisados e as e bandas de absorção foram identificadas para revelar a estrutura polimérica (Figura 7). Em polissacarídeos, a banda larga com máximo de absorção na região de  $3250$  a  $3300 \text{ cm}^{-1}$  resulta do estiramento das ligações de grupamentos hidroxilas presentes no EPS. As presenças de grupamentos hidroxílicos estão diretamente ligadas à solubilidade do EPS em água (KARBOWIAK et al., 2007). As bandas

na região de  $2.920\text{ cm}^{-1}$  representam estiramento de ligações C-H de grupos metil ( $-\text{CH}_2-$ ), encontrados em hexoses ou em desoxihexoses. Pode-se atribuir a banda a  $1.726\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento C=O do grupo carbonila de ésteres. Pode-se observar uma banda em  $1.611\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída deformação angular do grupamento -OH. No espectro do EPS produzido na presença de cromo, esta banda está mais deslocada para a região de  $1643\text{ cm}^{-1}$ , região também atribuída à deformação angular de -OH. Estes sinais ( $1.611$  e  $1.643\text{ cm}^{-1}$ ) estão mais relacionados ao esqueleto de monossacárido do EPS. O espectro de FTIR do EPS também apresenta sinais próximos a  $1.400\text{ cm}^{-1}$  e  $1.250\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos ao estiramento assimétrico do carboxilato e ao estiramento do grupo C=O, respectivamente. As bandas de absorção com maior intensidade na região de  $1.000-1.040\text{ cm}^{-1}$  sugerem a presença de monômeros de açúcar no EPS, como glicose e galactose.

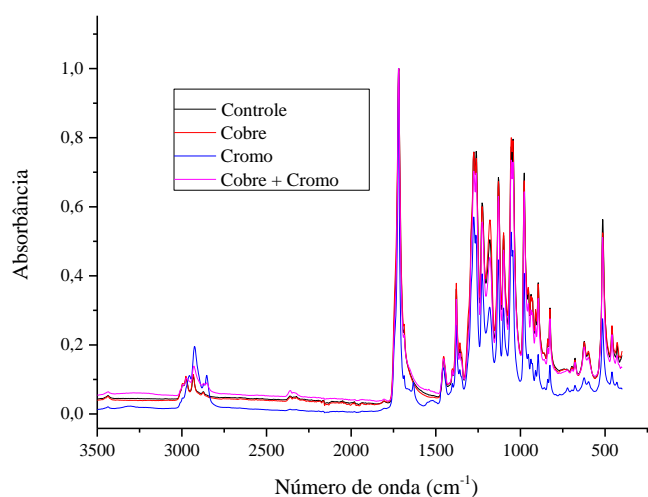


**Figura 7.** Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do exopolissacarídeos (EPS) produzido por *R. tropici*, em meio PSY<sub>liq</sub> suplementado com íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1\text{ mmol L}^{-1}$ ); de cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05\text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre +cromo [ $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,1\text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  ( $0,05\text{ mmol L}^{-1}$ ) ] sob agitação de 150 rpm,  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 144 h.

Os espectros obtidos a partir da análise de PHBs produzidos pela rizobactéria sob as condições descritas acima, foram analisados e apresentaram bandas características da estrutura do PHB (Figura 8). Observou-se bandas de estiramento de ligações C-H de grupos metil com picos em  $2.975$ ,  $2.930$  e  $2.853\text{ cm}^{-1}$ , resultado semelhante foi relatado por Getachew e Woldesenbet (2016). A banda intensa a  $1.719\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a deformação axial da ligação



C=O no grupo éster. As bandas de absorção de 1728 e 1741  $\text{cm}^{-1}$  são bandas de marcadores Polihidroxialcanoato (PHA) alocadas aos alongamentos carbonil C=O dos grupos éster localizados na cadeia de estruturas cristalinas extremamente ordenadas (RANDRIAMAHEFA et al., 2003). A deformação angular assimétrica e simétrica da ligação C-H no grupo metil resultou em bandas em 1.453 e 1.379  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas observadas em 1.275  $\text{cm}^{-1}$  e 1.225  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas a deformação axial da ligação C-O-C, no grupo éster. As bandas identificadas em 1.130  $\text{cm}^{-1}$  e 1.180  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo C-O-C. O alongamento de outros picos entre 990 - 430  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à presença de halogenetos de alquilo (SELVAKUMAR et al., 2011; GETACHEW & WOLDESENBET, 2016). Estas todas as bandas de absorção proeminentes confirmam que o polímero extraído de todas as amostras era polihidroxibutirato.



**Figura 8.** Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) de polihidroxibutiratos (PHB) produzido por *R. tropici*, em meio PSY<sub>liq</sub> suplementado com íons metálicos cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ); de cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a 0,05  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e cobre +cromo [ $\text{Cu}^{2+}$  (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  (0,05  $\text{mmol L}^{-1}$ )], sob agitação de 150 rpm, 28 °C, por 72 h.

Todas as amostras de polihidroxibutirato (PHB) apresentaram o mesmo padrão de picos de absorbância, pela presença dos íons metálicos cobre (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ); cromo (0,05  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e os dois íons em mistura nas mesmas concentrações. Com os dados coletados constatamos que a presença dos íons metálicos (cobre e cromo) adicionado ao meio de cultivo, não altera os grupos funcionais presentes nas biomoléculas de EPS e PHB produzidos por *R. tropici*

## 5.8. Efeito dos íons metálicos na expressão gênica em *Rhizobium tropici*

### 5.8.1. Expressão dos genes *exoR* e *exoZ*

A avaliação da expressão dos genes *exoR* e *exoZ* da rizobactéria *Rhizobium tropici* foi realizada através da técnica de quantificação relativa em PCR em tempo real, em diferentes condições de tratamentos: meio de cultivo PSY<sub>liq</sub> suplementado com íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$  a  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); cromo ( $\text{Cr}^{6+}$  a  $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre + cromo [ $\text{Cu}^{2+}$  ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) +  $\text{Cr}^{6+}$  ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ], nas três fases de desenvolvimento, (lag, log e estacionária), nos tempos 24; 48; e 120 horas. Após amplificação dos genes e do controle endógeno Sig A rRNA, observa-se os seus respectivos valores de Ct (Cycle threshold), (Figura 9 e Tabela 5) (TCHOUNWOU et al.,2012). De acordo com os valores do Ct pode-se detectar o limiar onde a fase exponencial da curva de amplificação se inicia; este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência, exemplificado na Figura 9 (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004). Nas reações de PCR utilizou-se o *SYBR Green* esta molécula absorve e emite luz em um comprimento de onda específico, proporcionando o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos, por se tratar de um intercalante de fitas duplas que emite fluorescência, inclusive quando se liga a moléculas não-alvo, como dímeros de oligonucleotídeos iniciadores amplificados ou algum outro produto não específico. Portanto, é necessário avaliar a especificidade da reação. Para solução destes problemas, realizou-se a análise de dissociação.



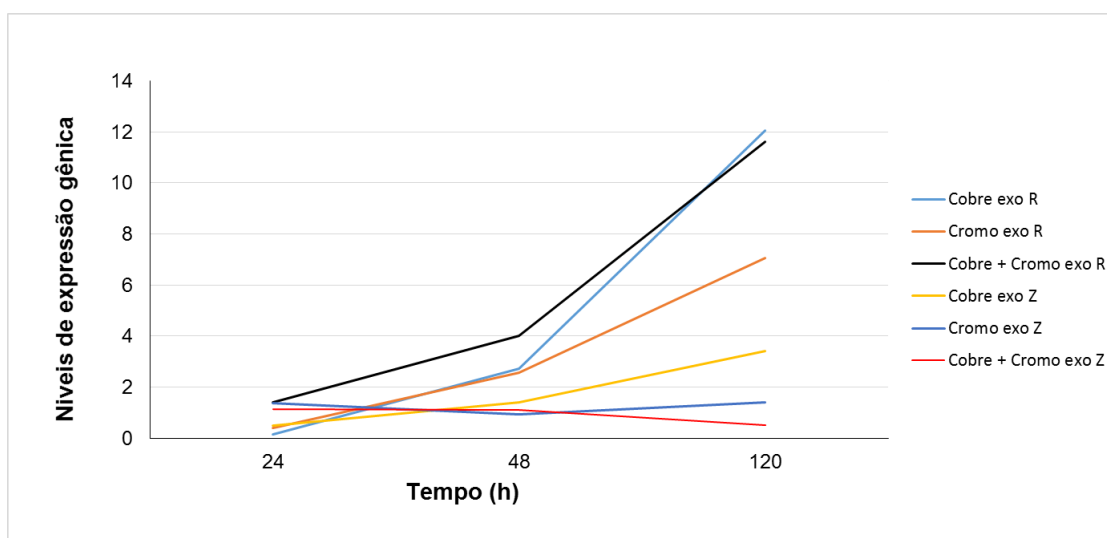
**Figura 9.** Gráfico de amplificação do gene *exoR* e *exoZ* da rizobactéria *R. tropici* em meio PSY<sub>liq</sub> acrescido de íons metálicos cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ); cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) + cromo ( $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ), nas fases de desenvolvimento (24, 48 e 120 horas).

**Tabela 5.** Valores de Ct da reação em tempo real de *R. tropici* em meio PSY<sub>liq</sub> acrescido de íons metálicos cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>), nas fases de desenvolvimento (24, 48, 72, 120 horas).

Amostras	Ct do gene de interesse		
	exo R	exo Z	Sig A
controle 24h	26,84	30,74	30,27
controle 48h	26,02	27,77	27,89
controle 120h	26,69	28,47	27,38
cobre 24h	25,23	27,46	26,01
cobre 48h	25,36	29,04	28,65
cobre 120 h	22,83	26,43	27,11
cromo 24h	26,83	28,34	28,97
cromo 48 h	26,88	30,07	30,11
cromo 120h	23,59	27,68	27,1
Cu+Cr 24h	22,39	26,6	26,33
Cu+Cr 48h	24,9	28,5	28,78
Cu+Cr 120h	25,25	31,54	29,48

A estimativa da expressão dos genes *exoR* e *exoZ* foi realizada pelo método comparativo Ct (SCHMITTGEN et al., 2008). Os resultados das expressões dos genes *exoR* e *exoZ*, estimados pela aplicação do método comparativo Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), em relação à expressão do gene de referência, Sigma, entre as amostras tratadas com cobre, cromo e cobre + cromo, nos tempos de 24, 48 e 120 horas, e não tratadas (controle), estão demonstrados na figura 10. A partir dos resultados mostrados nesta figura pode se extrair que a média das expressões do gene *exoR*, quando comparado no tempo de 120h com o gene *exoZ*, foi 5,8 vezes maior. Também é possível observar que o tratamento com cromo reduziu a expressão do gene *exoR*, quando comparado aos demais tratamentos. Os tratamentos com cobre ou cobre+cromo apresentaram efeitos opostos sobre as expressões dos genes *exoR* e *exoZ*: para o *exoR* houve aumento na expressão, enquanto para o *exoZ* houve redução, este fato condiz

também com os demais testes realizados aonde a produção de exopolissacarídeos da rizobactéria *R. tropici* tratamento cobre + cromo teve uma baixa produção. As imagens de microscopias de transmissão mostram que muitos destes metais formam complexos, a bactéria possui diversos mecanismos de resistências a concentrações elevadas de metais; um deste é a bomba de efluxo, que elimina os metais que não serão utilizados pelo metabolismo celular, proporcionando desta forma a viabilidade celular. Quando cultivada com o íon metálico cobre, que é essencial para o funcionamento de diversas enzimas, observamos o aumento da produção deste biopolímero; fato este comprovado na análise de expressão gênica. Com o decorrer do tempo a expressão destes genes, responsáveis pela bio síntese de exopolissacarídeos, se dá provavelmente na fase de declínio onde diminui o número de células em relação ao crescimento, isso ocorre devido à depleção de nutrientes essenciais e o acúmulo de substâncias inibidoras.



**Figura 10.** Nível de expressão gênica do gene *exoR* e *exoZ* para as amostras de *R. tropici*, nos tempos de 24; 48; e 120 horas no meio PSY<sub>iiq</sub> suplementado com íons metálicos cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>); cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e cobre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) + cromo (0,05 mmol L<sup>-1</sup>).

As células bacterianas possuem diversos mecanismos de defesas, o que permite a adaptação aos fatores adversos e variações do meio. Foram encontrados e registrados genes de bactérias, que codificam resistência específica para diversos íons metálicos (Ag<sup>+</sup>, AsO<sub>2</sub><sup>-</sup>, AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, GrOg<sub>2</sub>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Sb<sup>3+</sup>, TeO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e Zn<sup>2+</sup>), que confere proteção às células

bacterianas contra ambientes hostis (JI & SILVER, 1995). Dentre os mecanismos de resistências, o principal que as bactérias utilizam para superar a toxicidade aos íons metálicos é através do efluxo destes elementos do citoplasma (LI et al, 2013). Em rizóbios, proteínas capazes de identificar a presença de íons metálicos regulam bombas de efluxo de metais. Um exemplo é o gene *omp* que codifica uma proteína putativa de membrana externa, similar às proteínas de efluxo. Este gene e outros três genes a jusante do *omp* formam um operon que são induzidos pelo íon metálico  $\text{Cu}^{2+}$ , este operon parece estar envolvido na homeostasia de cobre bivalente em *Sinorhizobium meliloti* (CCNWSX0020) (LI et al., 2013). Su et al. (2011) relatam que bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, utilizam complexos de efluxo tripartido na família de nodulação-de-células de resistência (RND) para expulsar diversos compostos tóxicos da célula. Os três componentes dos complexos RND de efluxo são: (1) uma proteína de fusão de membrana ligando (2) a um transportador de membrana interna de ligação de substrato a (3) um canal ancorado na membrana externa no espaço periplásmico. O cobre é necessário dentro das mitocôndrias para fornecer os sítios CuA e CuB intramembrana do citocromo oxidase, dentro da rede trans-Golgi para fornecer cuproproteínas secretadas e dentro do citosol para fornecer superóxido dismutase 1 (Sod1) (ROBINSON & WINGER, 2010). As cuproproteínas procarióticas são encontradas na membrana celular e no periplasma de bactérias Gram-negativas. Os autores presumem que a fenda periplasmática de CusA permanece fechada quando não há a presença de íons cobre e prata, sendo esta uma região carregada conservada que caracteriza o revestimento do canal de retransmissão de metioninas essenciais (DELMAR et al., 2013; SU et al., 2011). Portanto, é possível que estes aminoácidos conservados carregados sejam responsáveis pela entrega dos íons metálicos. Dentre os estudos relatados observamos o quão importante é o íon cobre em concentrações ideais para bactérias, estando ligado à uma malha de processos bioquímicos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a rizobactéria *Rhizobium tropici* apresentou maior sensibilidade à concentração do íon cromo que ao íon cobre. A rizobactéria apresentou crescimento celular nas concentrações de 0,05 mmol L<sup>-1</sup> e 0,1 mmol L<sup>-1</sup>, mostrando-se sensibilidades às demais concentrações testadas. Os íons metálicos Cu<sup>2+</sup> e Cr<sup>6+</sup> e sua mistura, nas concentrações determinada pelo ensaio de CMI não afetou a viabilidade das células de *R. tropici*. Houve redução na produção de EPS e PHB nos tratamentos cujo meio de cultivo foi suplementado com Cr<sup>6+</sup> (0,05 mmol L<sup>-1</sup>) e a mistura dos dois (Cu<sup>2+</sup> a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> + Cr<sup>6+</sup> a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>), quando comparado ao tratamento controle. Quando acrescido ao meio de cultivo o íon metálico Cu<sup>2+</sup> na concentração 0,1 mmol L<sup>-1</sup> houve um aumento da produção em até 48% de EPS e 46,66% de PHB, em relação ao controle, após 144 horas. O estudo de FTIR indicaram mínimas diferenças nos grupos funcionais presentes nas moléculas tanto de EPS quanto de PHB produzidos nos meios suplementados com os íons metálicos, em relação ao tratamento controle. As análises de RT-PCR mostraram que os íons metálicos influenciam na expressão dos genes *exoR* e *exoZ* responsáveis pela biossíntese do biopolímero EPS, os tratamentos com cobre ou cobre + cromo apresentaram efeitos opostos sobre as expressões dos genes *exoR* e *exoZ*: para o *exoR* houve aumento na expressão, enquanto para o *exoZ* houve redução

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-BARAJAS, E.; JERÓNIMO-RODRÍGUEZ P.; RAMÍREZ-DÍAZ, M.I.; RENSING C.; CERVANTES C. The ChrA homologue from a sulfur-regulated gene cluster in cyanobacterial plasmid pANL confers chromate resistance. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 865–869, 2012.

ALLMAN, R.; HANN, A.C.; MANCHESS, R.; LLOYD, D. Characterization of bacteria by multiparameter flow cytometry. **Journal Applied Bacteriology**, v.73, p.438-444, 1992.

ANDERSON, A.J.; HAYWOOD, G.W.; DAWES, E.A. Biosynthesis and composition of bacterial poly (hydroxyalkanoates). **International Journal Biology Macromoleculas** 12, 102–105, 1990.

ARNOLD, W.; BECKER, A.; KELLER, M.; ROXLAU, A.; PUHLER, A. The role of *Rhizobium meliloti* surface polysaccharides in the infection of *Medicago sativa* nodules. **Endocytobiosis and Cell Research**, Tuebingen, v.10, p. 17-28, 1994.

BARNETT, M. J.; LONG S. R The *Sinorhizobium meliloti* SyrM Regulon: Effects on Global Gene Expression Are Mediated by *syrA* and *nodD3*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 10, p. 1792-1806, 2015.

BARNETT, M., LOTHE J. Consideration of the existence of surface wave solutions in anisotropic solids, v 4, p 671-686, 1976.

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

BERNAL GR, TLUSTY B, DE JENSEN CE, VAN BERKUM P, GRAHAM PH: Characteristics of rhizobia nodulating beans in the central region of Minnesota. **Can J Microbiol/Rev Can Microbiol**, 50:1023–1031, 2004.

BOHLOOL, B.B.; LADHA, J.K.; GARRITY, D.P.; GEORGE. T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: a perspective. **Plant Soil**, 141(1-2):1 11, 1992.

BOYD ES, PETERS JW Novos insights sobre a história evolutiva da fixação biológica do nitrogênio. *Frente. Microbiol.* 4 : 201 10.3389 / fmicb.2013.00201 [ artigo livre de PMC ] [ **PubMed** ] [ Cross Ref ] (2013).

BREEDVELD, M. WET AL. Response of intracellular carbohydrates to NzCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii TA-1 and *Rhizobium meliloti* SU-47. **Journal of general microbiology**, p. 3157-3163 ,1993.

CAMPANHARO, J. C. Produção e avaliação de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios. 66f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade

de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CARASCHI, J. C.; RAMOS, U. M.; LEAO, A. L. Compositos biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) reforçado com farinha de madeira propriedades e degradação. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 6, p. 1609-1614, 2002.

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono.** ( 2007). 74f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CASTELLANE, T.C.L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; LOPES E. M.; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.96, p.361–369, 2017.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E.G.M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v.111, p. 191–197, 2014.

CASTELLANE, T.C.L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J.C.; M. Production Of Exopolysaccharide From Rhizobia With Potential Biotechnological And Bioremediation Applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, V. 74, P. 515-522, 2015.

CHA, J. S., AND D. A. COOKSEY. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. Proc. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 88:8915–8919, 1991

COOKSEY, D. A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review. Phytopathol.** 28:201–219, 1990.

COOKSEY, D. A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 14:381–386 1994.

DELMAR, J. A.; SU C-C.; YU, E. W. Structural mechanisms of heavy-metal extrusion by the Cus efflux system. *Biometals*, v. 26, p.593–607. Figueiredo, T. G. B.; Campos, M.; Sousa, L. S.; da Silva J. R.; Druzian, J. I. (2014). Produção e caracterização de polihidroxicanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1111-1117, 2013.

DIMPLE LAKHERWAL, Adsorption of heavy metals: a review, **International Journal Environmental. Res. Dev.** 4 41–48, 2014.

DOS SANTOS PC, FANG Z., MASON SW, SETÚBAL JC, DIXON R. Distribuição da fixação de nitrogênio e seqüências semelhantes à nitrogenase entre os



genomas microbianos. **BMC Genomics** 13 : 162 10.1186 / 1471-2164-13-162 [ artigo livre de PMC ] [ PubMed ] [ Ref Cruz ], 2012.

ELHOTTOVA D, TRISKA J, SANTRUCKOVA H, KVETON J, SANTRUCEK J, SIMKOVA M. Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in environmental samples by GC-MS/MS. **Fresenius J Anal Chem** 367:157–164, 2000.

ERNESTO ORMEÑO-ORRILLO, P MENNA, LGP ALMEIDA, FJ OLLER. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) **BMC genomics**, 2012.

ERNESTO ORMEÑO-ORRILLO, ROSENBLUETH M, LUYTEN E, VANDERLEYDEN J, MARTÍNEZ- ROMERO E: Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Environmental Microbiology**, 10:1271–1284, 2008.

FINAN, T.M.; WEIDNER, S.; WOMG, K.; BUHRMESTER, J.; CHAIN, P.; VORHÖLTER, F.J.;HERNANDEZ-LUCAS, I.; BECKER, A.; COWIE, A.; GOUZY, J.; et al. The complete sequence of the 1683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, 9889–9894, 2001.

FU, D.; O'NEILL, R. A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high - performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 227, p. 377-384, 1995.

FUJISHIGE, N.A.; LUM M.R.; DE HOFF P.L.; WHITELEGGE J.P.; FAULL K.F.;HIRSCH A.M.. *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 67: 504–515, 2008.

GETACHEW, A.; WOLDESENBET, F. (Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste materia. **BM genomics Res Notes**, v. 9, p.509. doi 10.1186/s13104-016-2321,-2016.

GIBSON, U. E. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome research**; p 995-1001 1996.

GLENN, S. A.; GURICH, N.; FEENEY M. A.; GONZÁLEZ J. E. The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.7077–7088, 2007.

GLUCKSMANN, M.A.; REUBER, T.L.; WALKER, G.C. Genes needed for the modification, polymerization, export and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: A model for succinoglycan biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 175, 7045–7055, 1993

GRAHAM P.H. AND VANCE C.P. Legumes: Importance and constraints to greater use. **Plant Physiology**, 131(3):872-877, 2003.

HARISH. R.; SAMUEL. J.; MISHRA. R.; CHANDRASEKARAN. N.; MUKHERJEE, A. Bio-reduction of Cr (VI) by exopolysaccharides (EPS) from indigenous bacterial species of Sukinda chromitine, India. **Biodegradation** v.23, p. 487–496, 2012.

HEID. C.A., S., J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research** 6, 986-994, 1996.

HENNE, KRISTENE L, C.H. NAKATSU, D.K. THOMPSON, A.E. KONOPKA, High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes, **BMC Microbiology**. 9 -199, 2009.

HEWITT, C. J.; NEBE-VON-CARON G..The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state. In: Physiological Stress Responses in Bioprocesses. Springer Berlin Heidelberg. Adv **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. v.89, p.197-223, 2004.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company** 11, 1026-1030, 1993.

HUNGRIA M, STACEY G: Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry** 29:819–830, 1997.

JAISHANKAR M., TSETEN T., ANBALAGAN N.. MATHEW B.B, K.N. BEEREGOWDA, Toxicity: mechanism and health effects of some heavy metals, **Interdiscip. Toxicology** 7 60–72, 2014.

JANCZAREK, M. Review: Environmental Signals and Regulatory Pathways That Influence Exopolysaccharide Production in Rhizobia. **International Journal Molecular Science**, v. 12, p. 7898-7933,. doi: 10.3390/ijms12117898, 2011.

JI, G.; SILVER, S. Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 61-75, 1995.

JOFRE, E.; BECKER, A. Production of succinoglycan polymer in *Sinorhizobium meliloti* is affected by Smb21506 and requires the N-terminal domain of ExoP. **Molecular Plant Microbe Interactions Journal**. 2009, 22, 1656–1668, 2009.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**., 9, 225–256, 2002.

KELLER, M.; ROXLAU, A.; WENIG, W.M.; SCHMIDT, M.; QUANDT, J.; NIEHAUS, K.; JORDING, D.; ARNOLD, W.; PÜHLER, A. Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti* mucR gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. **Molecular. Plant Microbe Interactions**, 8, 267–277, 1995.

KIDWELL J, VALENTIN HE, DENNIS D Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology** 61:1391–1398, 1995.

KILIC, N. K.; DONMEZ, G. Environmental conditions exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp. *J Hazard Mater* 154: 1019–1024, 2008.

KUBISTA, J. F., BRADSHAW, J I Production, properties and applications of xanthan **Progress Industrial. Microbiology**. p. 319-371, 1984.

LAUS, M. C.; VAN BRUSSEL, A. A.; KIJNE, J. W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia* 198Karsativa root hairs. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.18, p.533–538, 2005.

LI, Z.; LU, M.; WEI G. An omp gene enhances cell tolerance of Cu (II) in *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.1655–1660, 2013.

LINTON, J. D. S .Microbial polysaccharides; Macmillan Byrom biomaterials; p. 217-261, 1991.

LOUARN, G., CORRE-HELLOU, G., FUSTEC, J., LO-PELZER, E., JULIER, B., LITRICO, I., HINSINGER, P., LECOMTE, C. Determinants ecologiques et physiologiques de la productivité et de la stabilité des associations graminées-légumineuses. **Innovations Agronomiques**. v.11, p.79-99, 2010.

MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization Caister Academic Press Norfolk, UK, 2007.

MARTÍNEZ-ROMERO E, SEGOVIA L, MERCANTE FM, FRANCO AA, GRAHAM P, PARDO MA: *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 41:417–426, 1991.

MELLANO, M. A., AND D. A. COOKSEY. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Journal Bacteriology**. 170:2879–2883, 1988.

MILLS, S. D., C. A. JASALAVICH, AND D. A. COOKSEY. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper

resistance operon of *Pseudomonas syringae*. **Journal Bacteriology**. p.175:1656–1664, 1993.

MINO T, VAN LOOSDRECHT MCM, HEIJNEN JJ Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal **Process Water Res** 32:3193–3207, 1998.

MOHAMAD, O. A.; HAO, X.; XIE, P.; HATAB S.; LIN Y.; WEI, G., Biosorption of Copper (II) from Aqueous Solution Using Non-Living *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123. **Microbes Environmental**, v.27, n.3, p.234–241, 2012.

MOHAMAD, O.A.; HAO, X.; XIE, P.; HATAB S.; LIN Y.; WEI, G., Biosorption of Copper (II) from Aqueous Solution Using Non-Living *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123. **Microbes Environmental**, v.27, n.3, p.234–241, 2012.

MORETTO, C. Potencial biotecnológico de rizóbios como bioemulsificante e bioissorvente de cobre e cromo. (2014). 107f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; OMORI, W. P.; SACCO, L. P.; LEMOS, E. G. DE M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of rhizobia. **International Journal Biological Macromolecules**. v. 81, p.291-298. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.07.056, 2015.

MOZUMDER, S.I.; GOORMACHTIGH, L.; GARCIA-GONZALEZ, L.; WEVER H. DE.; VOLCKE E.I.P. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB) Md. **Bioresource Technology**, v.155, p.272–280, 2014.

MUGLIA, CECILIA I.; GRASSO, DANIEL H.; AGUILAR, O. MARIO. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. **Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 1286-1296, 2007.

NIES DH. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology Biotechnology**. p.51:730–750 1999.

NOVAIS, C. M. & PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 33, p. 10-13, 2004.

OGAWA, T., USUI, M., YATOME, C. Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, p.254-260, 1989.

OLDROYD GED, DOWNIE AJ: Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review Plant Biology** 2008, 59:519–546, 2003.

PAULSEN, I.T.; BENESS, A.M.; SAIER, M.H. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalyzing export of complex carbohydrates in bacteria. **Microbiology**, 143, 2685–2699, 1997.

PETERS, PJ E W. HUNZIKER. Localização subcelular de Rab17 por microscopia eletrônica de crio-imunogold em células epiteliais cultivadas em filtros de policarbonato. **Métodos Enzymol.** v.329, p. 210-225, 2001.

PIMENTEL, B. E.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; CERVANTES, C. Efflux of chromate by cells of *Pseudomonas aeruginosa* expressing the ChrA protein. **FEMS Microbiology Lett.**, v. 212, p.249–254, 2002.

PRUD'HOMME M. and HEFFER P. World agriculture and fertilizer demand, global fertilizer supply and trade 2008 - 2009. summary report. **Technical report, International Fertilizer Association**, 34th IFA Enlarged Council Meeting, o Chi Minh City, Viet Nam, 2008.

QUINES, L. K. M. Extração de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* dsm 545 com 1,2-carbonato de propileno. (2010). 99 p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Santa Catarina.

RANDRIAMAHEFA, S.; RENARD, E.; GUÉRIN, P.; LANGLOIS, V. Fourier transform infrared spectroscopy for screening and quantifying production of PHAs by *Pseudomonas* grown on sodium octanoate. **Biomacromolecules.** v.4, p.1092–1097, 2003.

RAYMOND J., SIEFERT JL, STAPLES CR, BLANKENSHIP RE A história natural da fixação denitrogênio. **Molecular Biology and Evolution.** 21-541-554. 10.1093/molbev/ msh047 PubMed Cross Ref, 2004.

REHM B.H.A.; VALLA S. Bacterial alginates: Biosynthesis and applications. **Appl. Microbiology Biotechnology.**, 48, 281–288. 3, 1997.

REHM, B.H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.578-592, 2010.

RIBEIRO RA, ROGEL MA, LÓPEZ-LÓPEZ A, ORMEÑO-ORRILLO E, GOMES BARCELLOS F, MARTÍNEZ J, LOPES THOMPSON F, MARTÍNEZ-ROMERO E, HUNGRIA M: Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. **Int J Syst International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 62:1180–1185, 2012.

RINAUDI, L.V.; SORROCHE, F.; ZORREGUIETA, A.; GIORDANO, W. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS Microbiology Letters**, v.302, p.15-21, 2010.

ROBERTSON, B. R.; BUTTON, D. K.; KOCH, A. Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light

scatter measurements by flow cytometry. **Applied. Environmental. Microbiology**. V.64, p.3900-3909, 1998.

ROBINSON, N. J.; WINGE, D. R. Review: Copper Metallochaperones. **Annual Review of Biochemistry** ; 79: 537–562. doi:10.1146/annurev-biochem-030409-143539, 2010.

ROSA, D. S.; CHUL, Q. S. H.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. Avaliação da biodegradação de poli-beta-(hidroxibutirato), poli-beta-(hidroxibutirato-co-valerato) e poli-( -coprolactona) em solo compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, p.311-317, 2002.

ROSSBACH, S.; MAI, D. J.; CARTER, E. L.; SAUVIAC, L.; CAPELA, D.; BRUAND, C.; BRUIJN F. J. Response of *Sinorhizobium meliloti* to Elevated Concentrations of Cadmium and Zinc. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 4218–4221, 2008.

SACCO LP, CASTELLANE TCL, LOPES EM. Properties of Polyhydroxyalkanoate Granules and Bioemulsifiers from *Pseudomonas* sp. and *Burkholderia* sp. Isolates Growing on Glucose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.178, p.:990–1001, 2016.

SAMIRAN S. GAURI, SANTI M. MANDAL, BIKAS R. PATI. Impact of Azotobacter exopolysaccharides on sustainable agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology** 95:331–338, 2012.

SAYYED RZ, Gangurde NS Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Pseudomonas* sp. RZS 1 under aerobic and semi-aerobic condition. **Indian Journal of Experimental Biology** 48:942–947, 2010.

SCHAECHTER M. Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of *Salmonella typhimurium* **Journal of General** , v.19, p.592, 1958.

SCHMITTGEN, T.D.AND LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, 3(6), 1101-1104, 2008.

SELVAKUMAR, K.; SRINIVASAN, G.; BASKAR, V.; MADHAN, R. Production and isolation of Polyhydroxybutyrates from *Haloarcula marismortui* MTCC 1596 using cost effective osmotic lysis methodology. **European Journal of Experimental Biology**. v 3, n.1, p.180-187, 2011.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**., 5, doi: 10.1186/1475-2859-5-7, 2006.

SMITH, L. S.; LONG, S. R. Requirements for syrM and nodD genes in the nodulation of *Medicago truncatula* by *Rhizobium meliloti* 1021. **Molecular Plant Microbe Interact.** v. 11, p.937–940. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.9.937>, 1998.

SPAIN, A, Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment **Reviews in Undergraduate Research**, Vol. 2, 1-6, 2003.

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v.194, p.197–206, 2012.

STRAIN. Comparative Study of Chromium Biosorption by *Mesorhizobium Amorphae* Strain CCNWGS0123 in Single and Binary Mixtures **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.570–587, 2013

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio: In: aidar, H.; Kluthocouski, J.; Stone, L.F. eds. Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás: **Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Arroz e Feijão**, p.123-153, 2002.

SU, C-C.; LONG, F.; YU, E. W. Review: The Cus efflux system removes toxic ions via a methionine shuttle. **Protein Science**, v. 20, p.6-18, 2011.

TAVERNIER P., PORTAIS J., NAVA. S., COURTOIS J., COURTOIS B, BARBOTIN J. Exopolysaccharide and Poly-(beta)-Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.1, p.21-26 1997.

TCHOUNWOU P.B., YEDJOU C.G., PATLOLLA A.K., SUTTON D.J. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, Springer, pp. 133–164, 2012.

TRAINER, M. A.; CHARLES, T. C. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 71, p.377–386. doi 10.1007/s00253-006-0354-1, 2006.

UNKOVICH, M., HERRIDGE, D., PEOPLES, M., CADISCH, G., BODDEY, R., GILLER, K., ALVES, B. AND CHALK, P. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. **Clarus design**, Canberra, 2008.

UTTARO, A.D.; CANGELOSI, G.A.; GEREMIA, R.A.; NESTER, E.W.; UGALDE, R.A. Biochemical characterization of avirulent exoC mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, 172, 1640–1646, 1990.

WANG, J.; YU, H.-Q. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) and extracellular polymeric substances (EPS) by *Ralstonia eutropha* ATCC 17699 in batch cultures **Applied Microbiology Biotechnology**. v.75, p. 871–87, 2007.

WATNICK, P.; KOLTER, R. minireview Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WHITFIELD, C.; PAIMENT, A. Biosynthesis and assembly of Group I capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. **Carbohydrate. Research**, 338, 2491–2502, 2003

XIE, P.; HAO, X.; MOHAMAD, O. A.; LIANG, J.; WEI, G. Comparative Study of Chromium Biosorption by *Mesorhizobium amorphae*

YASHOTHA K, AROUA MK, RAMCHANDRAN KB, TAN IKP. Recovery of medium chain length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. **Biochemical Engineering** p.30:260–268, 2006.

ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogenfixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Washington, v.91, p.143-153, 2001.