

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/07/2019.

**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. Graduou-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 (Cu^{2+} e 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^a. 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

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. <i>Rhizobium tropici</i>	18
2.2. Exopolissacarídeos (EPS) de Rizobactérias.....	19
2.3. Polihidroxitirato (PHB) de Rizobactérias	20
2.4. Metais pesados e microrganismos.....	20
2.5. Controle genético da síntese de EPS em Rizóbios.....	21
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	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^{2+} e Cr^{6+}) sobre produção de exopolissacarídeo (EPS) e polihidroxitirato (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
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	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
5.8. Efeito dos íons metálicos na expressão gênica em <i>Rhizobium tropici</i>	48

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

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Modelo de correlação das vias metabólicas de produção de exopolissacarídeos, quorum sensing e repressão catabólica em <i>S. meliloti</i>	p.22.
Figura 2. 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.....	p.30.
Figura 3. Ensaio da Concentração Mínima Inibitória (CMI) analisado por Densidade Óptica (DO ₆₀₀) o crescimento celular de <i>Rhizobium tropici</i> (LBMP-C01) em meio de cultivo PSY _{líq} contendo (A) cobre (CuSO ₄ .5H ₂ O) e (B) cromo e (K ₂ Cr ₂ O ₇), incubados a 28 °C sob agitação de 150 rpm, até 144 horas.....	p.34.
Figura 4. Curva de crescimento celular de <i>R. tropici</i> em meio PSY _{líq} por leitura de Densidade Óptica (DO ₆₀₀) nos respectivos tratamentos: Controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu ²⁺ a 0,1 mmol L ⁻¹); cromo (Cr ⁶⁺ a 0,05 mmol L ⁻¹) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu ²⁺ a 0,1 mmol L ⁻¹ + Cr ⁶⁺ a 0,05 mmol L ⁻¹), mantidos até 144 horas sob agitação de 150 rpm a 28 °C.....	p.36.
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 (Cu ²⁺ a 0,1 mmol L ⁻¹); (C e G) cromo (Cr ⁶⁺ a 0,05 mmol L ⁻¹), (D e H). cobre + cromo (Cu ²⁺ a 0,1 mmol L ⁻¹ + Cr ⁶⁺ a 0,05 mmo L ⁻¹).	p.39
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 (Cu ²⁺ a 0,1 mmol L ⁻¹); (C) cromo (Cr ⁶⁺ a 0,05 mmol L ⁻¹), (D). cobre + cromo (Cu ²⁺ a 0,1 mmol L ⁻¹ + Cr ⁶⁺ a 0,05 mmol ⁻¹), 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_{líq} suplementado com íons metálicos cobre (Cu^{2+} a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$); de cromo (Cr^{6+} a $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) e cobre +cromo [Cu^{2+} ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) + 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_{líq} suplementado com íons metálicos cobre (Cu^{2+} a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$); de cromo (Cr^{6+} a $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) e cobre +cromo [Cu^{2+} ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) + 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_{líq} 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_{líq} 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_{líq} acrescido de íons metálicos cobre (0,1 mmol L⁻¹); cromo (0,05 mmol L⁻¹) e Cobre (0,1 mmol L⁻¹) + cromo (0,05 mmol L⁻¹), nos tempos 0 e 72 horas sob agitação 150 rpm a 28°C..... **p.37**

Tabela 2. Percentual de células vivas da rizobactéria *R.tropici* em meio PSY_{líq} após a análise de Citometria de fluxo de dispersão luminosa nas condições controle (sem a presença de íons metálicos); cobre (Cu²⁺a 0,1 mmol L⁻¹); cromo (Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹) e solução das misturas dos dois íons metálicos cobre + cromo (Cu²⁺a 0,1 mmol L⁻¹ + Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹), 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_{líq} por *R. tropici* e eficiência relativa de produção de EPS, controle (sem a presença de íons metálicos); Cobre (Cu²⁺a 0,1 mmol L⁻¹); Cromo (Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹) e solução das misturas dos dois íons metálicos Cobre + Cromo (Cu²⁺a 0,1 mmol L⁻¹ + Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹), 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_{líq} nas respectivas condições: Controle (sem a presença de íons metálicos); Cobre (Cu²⁺a 0,1 mmol L⁻¹); Cromo (Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹) e solução das misturas dos dois íons metálicos Cobre + Cromo (Cu²⁺a 0,1 mmol L⁻¹ + Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹), 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_{líq} acrescido de íons metálicos Cobre (0,1 mmol L⁻¹); Cromo (0,05 mmol L⁻¹) e Cobre (0,1 mmol L⁻¹) + Cromo (0,05 mmol L⁻¹), 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 (Cu^{2+}) e cromo hexavalente (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 Cu^{2+} e $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ para o íon Cr^{6+} . O estudo do efeito destas concentrações de íons metálicos sobre a produção de EPS e PHB, este foi cultivado em meios PSY_{liq} sem a presença dos íons (controle) e suplementados com os íons separadamente (Cu^{2+} e Cr^{6+}) e em mistura ($\text{Cu}^{2+} + \text{Cr}^{6+}$). A curva de cultivo mostrou diferenças significativas entre o meio PSY_{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 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 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 (Cu^{2+}) and hexavalent chromium (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 mmol L^{-1} for Cu^{2+} and 0.05 mmol L^{-1} for the Cr^{6+} ion. The study of the effect of these metal ion concentrations on EPS and PHB production was carried out in PSY_{liq} media without the presence of ions (control) and supplemented with ions separately (Cu^{2+} and Cr^{6+}) and in a mixture (Cu^{2+} Cr^{6+}). The culture curve showed significant differences between the control PSY_{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 (Cu^{2+} + Cr^{6+}) reduced the production of both biopolymers. However, the treatment supplemented with 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 Cu^{2+} or Cu^{2+} + 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 polihidroxibutirato (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 (Cu^{2+}) e cromo (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.

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⁻¹ e 0,1 mmol L⁻¹, mostrando-se sensibilidades às demais concentrações testadas. Os íons metálicos Cu²⁺ e Cr⁶⁺ 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 Cr⁶⁺ (0,05 mmol L⁻¹) e a mistura dos dois (Cu²⁺ a 0,1 mmol L⁻¹ + Cr⁶⁺ a 0,05 mmol L⁻¹), quando comparado ao tratamento controle. Quando acrescido ao meio de cultivo o íon metálico Cu²⁺ na concentração 0,1 mmol L⁻¹ 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- β -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 N₂-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 biossorvente 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- β -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.