

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE UM
CONSÓRCIO DEGRADADOR DE BIOMASSA: AVALIAÇÃO
DA POTENCIALIDADE PARA PRODUÇÃO DE
BIOPOLÍMEROS PELOS ISOLADOS**

Guilherme Carvalho Caires

Médico Veterinário

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE UM
CONSÓRCIO DEGRADADOR DE BIOMASSA: AVALIAÇÃO
DA POTENCIALIDADE PARA PRODUÇÃO DE
BIOPOLÍMEROS PELOS ISOLADOS**

Discente: Guilherme Carvalho Caires

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves

Coorientadora: Dra. Tatiane Fernanda Leonel

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

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
disponível na página da Biblioteca na “web”

Caires, Guilherme Carvalho

C136i

Isolamento e identificação de bactérias de um consórcio degradador de biomassa: avaliação da potencialidade para produção de biopolímeros pelos isolados / Guilherme Carvalho Caires. -- Jaboticabal, 2023

74 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lucia Maria Carareto Alves

Coorientadora: Tatiane Fernanda Leonel

1. Exopolissacarídeos. 2. Celulose. 3. metais pesados. 4. Biorremediação. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE UM CONSÓRCIO DEGRADADOR DE BIOMASSA: AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELOS ISOLADOS


AUTOR: GUILHERME CARVALHO CAIRES

ORIENTADORA: LUCIA MARIA CARARETO ALVES


COORIENTADORA: TATIANE FERNANDA LEONEL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LUCIA MARIA CARARETO ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuaria e Ambiental / FCAV UN

Documento assinado digitalmente
 LUCIA MARIA CARARETO ALVES
Data: 23/10/2023 20:05:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuaria e Ambiental / FCAV UNESP

Documento assinado digitalmente
 DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Data: 21/10/2023 19:16:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. RODRIGO MATHEUS PEREIRA (Participação Virtual)
FCBA UFGD / Dourados/MS

Documento assinado digitalmente
 RODRIGO MATHEUS PEREIRA
Data: 19/10/2023 17:30:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 19 de outubro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Guilherme Carvalho Caires- nasceu na cidade de São Paulo (SP), em 3 de janeiro de 1992. Formou-se em Medicina Veterinária pela Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (SP) no ano de 2020. Em 2021, ingressou no curso de Mestrado pelo programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. Durante o mestrado, desenvolveu sua dissertação junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da UNESP/FCAV. Sua pesquisa teve como foco a área de Bioquímica de Microrganismos, investigando a potencialidade de produção de exopolissacarídeos e celulose por isolados de um consórcio bacteriano degradador de biomassa, bem como a resistência desses isolados a metais potencialmente tóxicos.

EPÍGRAFE

“Não somos ricos pelo que possuímos, mas pelo que podemos viver sem”.

Immanuel Kant

DEDICATÓRIA

A minha família,

José, Maria, Beatriz, Therezinha e Mariana - As pessoas que mais estimo e que são as mais importantes da minha vida, que sempre oraram pela minha saúde e futuras conquistas, me confortaram em momentos de angústia e dificuldades, me apoiaram durante todo meu trajeto na graduação e na pós-graduação. Agradeço a Deus por fazer parte dessa família e por ter me dado forças para alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos,

Todas as pessoas que fizeram parte da minha vida durante toda a trajetória da pós-graduação, que conviveram comigo nos momentos de alegria e também me deram suporte nos momentos de dificuldade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Carareto Alves, por ter me aceitado como seu orientando e ter me dado todo o suporte ao longo de todo a mestrado, permitindo o desenvolvimento de todo esse trabalho.

À minha coorientadora Dr^a. Tatiane Fernanda Leonel pela coorientação, e por todo carinho e paciência ao me ajudar e me ensinar. Sou grato pela sua amizade e por todo o apoio que me ofereceu nos momentos difíceis. Sua companhia foi uma das coisas que mais me ajudaram a conseguir seguir em frente, sempre me dando coragem para não desistir de nada.

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

Ao CNPQ - pela bolsa de Mestrado, que permitiu me dedicar ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao LBMP - Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Plantas, aos amigos que sempre me apoiaram, me ajudaram dividindo seu conhecimento, e também me alegravam na rotina do laboratório, especialmente Michelli Funicelli, Elisangela Soares Gomes Pepe, Natália, Luis Chicoma, Dayanne Fernandes, Ane Vaz, Bárbara e Pâmela.

A Dr^a Terezza Castellane – Me auxiliou em algumas etapas desse trabalho, com toda paciência e carinho.

Ao Dr. João Carlos Campanharo – Sempre me ajudou passando seu conhecimento e auxiliou em diversas etapas do experimento.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. EXPLORANDO O GÊNERO <i>Agrobacterium</i> sp.: POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	3
2.2. GÊNERO <i>Cohnella</i> sp.: EXPLORANDO SUAS CARACTERÍSTICAS E POTENCIAIS BIOTECNOLÓGICOS.....	5
2.3. BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS: ESTRUTURA E APLICAÇÕES	6
2.3.1. EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)	6
2.3.2. CELULOSE BACTERIANA (CB): UMA VISÃO ABRANGENTE.....	9
2.4. BIORREMEDIAÇÃO: UMA SOLUÇÃO AMBIENTAL.....	12
2.4.1. BIORREMEDIAÇÃO COM AGENTES SURFACTANTES	15
2.5. METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS	15
2.5.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA A METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. ORIGEM DO CONSÓRCIO BACTERIANO DEGRADADOR DE LIGNOCELULOSE	19
3.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	20
3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO 16S RRNA.....	20
3.4. OBTENÇÃO DE BIOPOLÍMEROS BACTERIANOS: EPS E CB.....	21
3.4.1. EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)	21
3.4.2. CELULOSE BACTERIANA (CB)	22
3.5. AVALIAÇÃO DA AÇÃO SURFACTANTE DO EPS	23
3.6. ANÁLISE DE HPLC PARA COMPOSIÇÃO DO EPS	23
3.7. ANÁLISE DE FTIR	24
3.8. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS A METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25

4.1. PRODUÇÃO DE EPS.....	25
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO SANGER DO GENE 16S RRNA	27
4.3. PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA	30
4.4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO SURFACTANTE DO EPS	33
4.5. ANÁLISE DO EPS POR HPLC E FTIR	37
4.6 AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA DOS ISOLADOS A METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS	40
5. CONCLUSÕES	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.	8
Figura 2.	10
Figura 3.	26
Figura 4.	27
Figura 5.	32
Figura 6.	34
Figura 7.	35
Figura 8.	36
Figura 9.	36
Figura 10.	40

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1.	29
Tabela 2.	31
Tabela 3.	38
Tabela 4.	41

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DE UM CONSÓRCIO DEGRADADOR DE BIOMASSA: AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE PARA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PELOS ISOLADOS

RESUMO - Os microrganismos possuem ferramentas metabólicas que desempenham um papel crucial na restauração do equilíbrio dos ciclos naturais, que atualmente estão ameaçados pelo alto consumo de recursos naturais e pela intensa produção de resíduos gerados pela população humana. Diversas moléculas produzidas pelos microrganismos, principalmente as bactérias, auxiliam na reciclagem de produtos e na síntese mais sustentável de elementos-chave para avanços tecnológicos importantes. O bioprocessamento dos resíduos de lignocelulose e dos carboidratos que os constituem pode originar vários compostos valiosos. Assim, a partir de um consórcio bacteriano que tem a capacidade de utilizar material lignocelulósico (bagaço de cana) como fonte de carbono, foram isoladas bactérias e foi avaliada a capacidade desses isolados em produzir compostos de interesse no desenvolvimento biotecnológico atual. Dentre os compostos estudados, destacam-se os polímeros bacterianos, que são aplicáveis em diversas áreas industriais e tecnológicas. Neste estudo, foram avaliadas a capacidade de produção dos polímeros bacterianos, o exopolissacarídeo (EPS) e a celulose (CB). Além disso, também foram analisadas a capacidade biorremediadora por meio da atividade emulsificante do EPS produzido sobre hidrocarbonetos e óleo de fritura vegetal residual e pela resistência dos isolados a metais potencialmente tóxicos que podem causar impacto negativo ao meio ambiente. Nas condições estudadas os 4 isolados com destaque na produção de EPS e CB foram identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo classificados dentro gênero *Agrobacterium* (isolados 9, 11 e 12) e *Cohnella* (isolado 13). Os isolados 9, 11, 12 e 13 foram os principais destaques na produção de EPS, enquanto os isolados 9 e 13 foram os destaques na produção de CB. Os melhores resultados da ação surfactante do EPS ocorreram com o óleo de fritura usado. A capacidade de formar emulsões atingiu um percentual superior a 70% com o uso dos EPS dos isolados 11, 12 e 13. Além disso, a taxa de emulsificação aumentou em todas as medições do período de 168 horas, comparado ao período de 24 horas, para todas as substâncias avaliadas. Além disso, os isolados 9 e 13 apresentaram capacidade de sintetizar celulose e mostraram alta resistência a metais potencialmente tóxicos. Esses resultados revelam o potencial dos isolados para serem explorados em aplicações biotecnológicas de importância sustentável. A capacidade emulsificante dos EPSs produzidos geram perspectivas para seu uso futuro em aplicações voltadas para a biorremediação de ambientes contaminados com óleos e materiais derivados de petróleo. Além disso, também observamos resistência dos isolados aos metais potencialmente tóxicos o que salienta o seu potencial para futuros usos na descontaminação de, por exemplo, águas residuárias contaminadas por esses poluentes.

Palavras-Chave: Exopolissacarídeos, *Cohnella*, Celulose, Emulsificação, Metais Potencialmente Tóxicos.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA FROM A CONSORTIUM THAT DEGRADES BIOMASS: EVALUATION OF THE POTENTIALITY FOR THE PRODUCTION OF BIOPOLYMERS BY THE ISOLATES

ABSTRACT – Microorganisms have metabolic tools that play a crucial role in restoring the balance of natural cycles, which are currently threatened by the high consumption of natural resources and the intense production of waste generated by the human population. Several molecules produced by microorganisms, mainly bacteria, help in the recycling of products and in the more sustainable synthesis of key elements for important technological advances. The bioprocessing of lignocellulose waste and the carbohydrates that constitute it can give rise to several valuable compounds. Thus, from a bacterial consortium, that has the capacity to use lignocellulosic material (sugarcane bagasse) as a carbon source, bacteria were isolated and the ability of these isolates to produce compounds of interest in current biotechnological development was evaluated. Among the compounds studied, bacterial polymers stand out, which are applicable in various industrial and technological areas. In this study, the production capacity of bacterial polymers, exopolysaccharide (EPS) and cellulose (CB) were evaluated. Furthermore, the bioremediation capacity was also analyzed through the emulsifying activity of EPS produced on hydrocarbons and residual vegetable frying oil and the resistance of the isolates to potentially toxic metals that can cause a negative impact on the environment. Under the conditions studied, the 4 isolates highlighted in the production of EPS and CB were identified by sequencing of the 16S rRNA gene, being classified within the genus *Agrobacterium* (isolates 9, 11 and 12) and *Cohnella* (isolate 13). Isolates 9, 11, 12 and 13 were the main highlights in the production of EPS, while isolates 9 and 13 were the highlights in the production of CB. The best results from the surfactant action of EPS occurred with the frying oil used. The ability to form emulsions reached a percentage greater than 70% with the use of EPS from isolates 11, 12 and 13. Furthermore, the emulsification rate increased in all measurements of the 168-hour period, compared to the 24-hour period, for all substances evaluated. Furthermore, isolates 9 and 13 showed the ability to synthesize cellulose and showed high resistance to potentially toxic metals. These results reveal the potential of the isolates to be explored in biotechnological applications of sustainable importance. The emulsifying capacity of the EPSs produced generates prospects for their future use in applications aimed at bioremediation of environments contaminated with oils and petroleum-derived materials. Furthermore, we also observed resistance of the isolates to potentially toxic metals, which highlights their potential for future uses in the decontamination of, for example, wastewater contaminated by these pollutants.

Keywords: Exopolysaccharides, *Cohnella*, Cellulose, Emulsification, Heavy Metals.

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico
MPT: metais potencialmente tóxicos
LB: Luria Bertani
HS: Hestrin Schramm
BHB: Bushnell Hass Broth
M: molar
mM: milimolar
mg: miligrama
pH: potencial hidrogeniônico - log [H+]
µg: micrograma
µL: microlitro
cm: centímetro
mm: milímetro
µm: micrometro
nm: nanometro
α: alfa
β: beta
rpm: rotações por minuto
h: horas
min: minutos
s: segundos
°C: graus Celsius
v/v: volume por volume
PGY: peptona/ extrato de levedura/ glicose
PSY: peptona/ extrato de levedura/ sacarose
FTIR: espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
RMN: ressonância magnética nuclear
CB: celulose bacteriana
EPS: exopolissacarídeo
CIM: concentração mínima inibitória
L: litro
RDP: Ribosomal Database Project
PCR: Reação em cadeia de polimerase
FDA: Food and Drugs Administration
Cr³⁺: íon cromo (III)
Cr⁶⁺: íon cromo (VI)
Zn²⁺: íon zinco
Ni²⁺: íon níquel
Cu²⁺: íon cobre
Pb²⁺: íon chumbo
Hg²⁺: íon mercúrio
Cd²⁺: íon cádmio
NaCl: Cloreto de sódio
K₂HPO₄: Fosfato de potássio dibásico anidro
KH₂PO₄: Fosfato de potássio

MgSO₄.7H₂O: Sulfato de magnésio heptahidratado

NaOH: Hidróxido de sódio

KBr: Brometo de potássio

Ex: índice de emulsificação

Ht: altura da mistura

He: altura da emulsão

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população mundial e da demanda de energia, têm resultado em um maior consumo de combustíveis de origem fóssil, principalmente do petróleo, para atender às necessidades humanas em diversos processos industriais e no transporte. Desta forma, o uso excessivo dos derivados petroquímicos, como gasolina, óleo diesel e plásticos, tem causado um grande impacto ambiental, contribuindo para o aumento do efeito estufa e a poluição de fontes de água (Jang; Hart, 2015). Diante dessa situação, têm-se buscado formas de proporcionar uma economia circular ambiental, reaproveitando recursos naturais para produzir materiais biotecnológicos menos prejudiciais ao meio ambiente, que sejam renováveis, sustentáveis e que atendam às necessidades da população mundial (IPEA, 2021)

Uma alternativa promissora em substituição ao uso de produtos derivados do petróleo em diversos processos industriais é o uso de biopolímeros bacterianos na indústria, como os exopolissacarídeos (EPS) e a celulose bacteriana (CB). A síntese desses biopolímeros é realizada através do cultivo de bactérias consumidoras de monossacarídeos presentes em materiais lignocelulósicos e resíduos agroindustriais (Freitas & Dathein, 2013). Esses materiais apresentam vantagens significativas em relação aos derivados do petróleo, pois são produzidos de forma mais sustentável e renovável, reduzindo os impactos ambientais negativos associados ao consumo excessivo de combustíveis fósseis.

Além dos problemas ambientais causados pelo alto consumo de combustíveis fósseis, atividades antropogênicas como mineração, eliminação inadequada de resíduos industriais e domésticos, uso excessivo de fertilizantes e pesticidas, e atividade industrial metalúrgica, química, e outras, são também responsáveis pela contaminação ambiental por MPT (metais potencialmente tóxicos). A poluição ambiental por esses compostos tem grande relevância, uma vez que são poluentes não biodegradáveis e que se acumulam nos seres vivos. Tendo isso em vista, e considerando que os processos de remoção de MPT são extremamente caros, têm sido desenvolvidas novas técnicas de recuperação de ambientes contaminados, como a biorremediação por microrganismos (Bravo, 2018; Silva; Argondizo; Gubulin, 2021)

Portanto, avaliar a capacidade bacteriana de tolerar ambientes com MPT e de transformar esses poluentes por meio de reações bioquímicas é extremamente

importante, tanto para garantir a sustentabilidade quanto para diminuir gastos de recursos financeiros (Halttunen et al., 2007)

Microrganismos possuem a capacidade de secretar exopolissacarídeos (EPSs) no meio que estão. Esses biopolímeros podem ser liberados pelas células e/ou ficar aderidos a superfície celular, conferindo ao microrganismo proteção contra diversos fatores ambientais estressantes, ou ainda promovendo a absorção de minerais e nutrientes (Mohapatra et al., 2019; Seesuriyachan et al., 2012).

Os EPS são moléculas que podem auxiliar na biorremediação de componentes tóxicos do ambiente (Sandhya et al., 2022), por exemplo, através do sequestro de MPT, ligação e solubilização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, absorção e degradação de corantes e pesticidas (Mohapatra et al., 2019). O EPS promove a emulsificação de hidrocarbonetos e componentes tóxicos de óleos brutos, aumentando sua biodisponibilidade para as células bacterianas e acelerando o processo de degradação (Li et al., 2021). Desta forma, por ser sustentável e economicamente viável, o EPS é uma excelente ferramenta para auxiliar em processos de biorremediação de hidrocarbonetos.

Além disso, o EPS também pode ser usado como agente espessante e emulsificante em diversos setores industriais, como o alimentício, têxtil, cosmético, e farmacêutico através da produção de imunoestimuladores (Pereira et al., 2009). O principal espessante derivado do EPS é a goma xantana, usada principalmente na indústria de alimentos, como espessante, emulsificante e estabilizante de alimentos (Harding et al. 1995; Leite et al., 2015)

A celulose bacteriana (CB) é um biomaterial com grande potencial biotecnológico para diversas aplicações, devido às suas propriedades físicas e químicas (Esa et al., 2014; Gao et al., 2019). A CB pode ser aplicada com facilidade em diversos setores da indústria, como na alimentícia e farmacêutica, através da produção de embalagens antibacterianas e biodegradáveis, filmes, emulsificantes e revestimentos de fármacos (Dourado et al., 2016). Filmes de CB podem ser usados na ultrapurificação de água, purificação de esgotos, tratamento de lixo com remoção de óleos e minerais, e absorção de toxinas (Donini et al., 2010). A versatilidade do uso da CB, aliada ao baixo custo de produção e alta sustentabilidade, torna a celulose de origem bacteriana uma excelente alternativa à celulose vegetal.

Embora os biopolímeros bacterianos sejam alternativas de aplicação biotecnológica extremamente promissoras, sua aplicação industrial enfrenta diversas dificuldades, pois há pouco conhecimento sobre as espécies produtoras e sua aplicação direta no meio ambiente. Portanto, é de extrema importância promover pesquisas que avaliem a capacidade produtora de biopolímeros por diversas cepas bacterianas ainda não estudadas, bem como formas de aumentar o rendimento de produção e reduzir os custos (Treichel, 2004).

Considerando a relevância biotecnológica e a necessidade de estudos sobre a produção e aplicação de biopolímeros bacterianos, este estudo teve como objetivo o isolamento de bactérias de um consórcio degradador de lignocelulose para avaliar o potencial biotecnológico desses organismos tanto com relação à produção de biopolímeros como com relação à aplicação deles em processos de biorremediação.

A capacidade de produção de polímeros por tais isolados pode levar à sua aplicação no processo de reciclagem biológica de materiais residuais da agroindústria. Isso contribuiria para transformar os resíduos de lignocelulose em moléculas com aplicações biotecnológicas ou biorremediadoras. Tal biotransformação pode agregar valor aos bioprodutos e promover a economia circular em regiões onde o processamento de material vegetal é considerável. Além disso, a tolerância desses isolados a MPT abre perspectivas futuras para utilizá-los como alternativa para uso em processos de biorremediação de ambientes ou resíduos contaminados por esses poluentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Explorando o Gênero *Agrobacterium* sp.: Potencialidades e Aplicações Biotecnológicas

As bactérias do gênero *Agrobacterium* sp., também conhecidas popularmente como agrobactérias, são microrganismos tipicamente encontrados em solo e classificadas como Gram-negativas. Pertencem à família Rhizobiaceae em que são reconhecidas 168 espécies distribuídas em 17 gêneros. As agrobactérias possuem forma de bacilos contendo de um a seis flagelos peritríquios e não produzem esporos. Medem em torno de 0,6-1,0 x 1,5-3,0 µm, e são majoritariamente aeróbicas.

Entretanto, alguns isolados desse gênero podem ter respiração anaeróbica, em ambientes ricos em nitrato, e outros podem sobreviver em ambientes com concentração baixa de oxigênio, como no interior dos tecidos de plantas hospedeiras. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 25 a 28 °C, apresentando colônias geralmente convexas, circulares, lisas, sem pigmentação ou de coloração levemente creme (Holt et al., 1994).

O gênero *Agrobacterium* sp. possui espécies tanto fitopatogênicas quanto não patogênicas. São encontradas no mundo todo, no entanto, elas prevalecem em regiões de clima temperado, em função de sua sensibilidade às altas temperaturas. Podem ser encontradas na maioria dos tipos de solos e também na rizosfera de plantas, sendo elas cultivadas ou não (Lippincott et al., 1981).

Apesar de algumas espécies serem consideradas fitopagênicas, existem espécies como a *Agrobacterium tumefaciens* que tem aplicação na engenharia genética de plantas, gerando avanços em seu melhoramento genético, por meio da transferência de DNA, em um processo de chamado de transformação genética (Moraes e Fernandes, 1987).

Além de aplicações em engenharia genética de plantas, as agrobactérias também são conhecidas pela sua importância para a biotecnologia, uma vez que são capazes de produzir EPS em grandes quantidades (Xu et al., 2017;).

O trabalho de Kaur et al. (2022), no qual foi usada a cepa JAS1 de *Agrobacterium* sp. cultivada em meio PTC contendo 3% de sacarose, apresentou uma grande produção de EPS, correspondendo a 360mg/ 50 mL de meio. A partir de análises de espectroscopia de infravermelho transformado de Fourier (FTIR) desse EPS, verificou-se a presença de 2 grupos funcionais importantes. O grupo hidroxila que garante uma capacidade emulsificante do EPS de JAS1, e uma característica hidrofílica (Banat, 2010). A presença de carboxilatos fornece uma natureza aniônica, o que permite alta afinidade com moléculas de carga oposta, como os metais potencialmente tóxicos (Wei et al., 2011). Por conseguir quelar metais e íons, esse EPS possui capacidade anticorrosiva ao ser aplicado em metais (Donot et al., 2012). Essas características do EPS de JAS1, se assemelha a características pertencentes aos EPS curdlan secretados por diversas bactérias (Boukhelata et al., 2019). Esses autores destacam o potencial desses isolados para aplicação em biotecnologia por

exemplo na indústria alimentícia (estabilizante, espessante e emulsificante de alimentos), na indústria de cosméticos (produção de loções e creme hidratantes), na indústria farmacêutica (agente gelificante, matriz imobilizadora de drogas, agente imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterômico), na agricultura (agente estabilizante e espessante de pesticidas e fertilizantes) (Kumar et al., 2007) Além disso, destaca-se o uso do EPS na biorremediação de áreas contaminadas por poluentes derivados de petróleo, metais potencialmente tóxicos e óleos (Kalogerakis, 2005).

2.2. Gênero *Cohnella* sp.: Explorando suas Características e Potencial Biotecnológico

As bactérias do gênero *Cohnella* sp., pertencente à família Paenibacillaceae que está atualmente composta por 17 gêneros, muitos dos quais relacionados à transformação de polissacarídeos. O gênero *Cohnella* conta atualmente com 31 espécies descritas (<https://lpsn.dsmz.de/genus/cohnella>), sendo algumas delas encontradas em locais específicos como solo de minério de ferro, lagoas vulcânicas e líquidos lubrificantes (Mayilraj et al. 2011, Cho et al. 2007, Kämpfer et al. 2017). Dentro dessa família podem ser destacados o gênero *Paenibacillus*, composto por espécies de grande importância biotecnológica pela grande quantidade de enzimas hidrolíticas produzidas, ou o novo gênero proposto *Insulambacter*, com espécies que apresentam capacidade xilanolítica (Grady et al. 2016). O gênero *Cohnella* abriga bactérias bacilares aeróbias, gram-positivas, formadoras de endósporos, que possuem forma de haste (Khiannan et al., 2012), e que foram descritas pela primeira vez por Kämpfer et al. (2006), que isolou o gênero a partir de amostras de amido.

Notavelmente, essas bactérias também estabelecem associações simbióticas com nódulos de leguminosas, contribuindo para o processo crucial de fixação de nitrogênio. García-Fraile et al. (2008) fizeram o primeiro relato dessa associação, ao isolar a bactéria *Cohnella phaseoli* de nódulos de feijão-da-espanha.

Uma grande parte das espécies do gênero *Cohnella* possui atividade celulolítica e xilanolítica e são bactérias que podem ser isoladas de diversos ambientes, como amostras industriais e nódulos de raízes de plantas, como descrito

acima, assim como no solo, água doce (Shiratori et al., 2010), fezes de animais (Khiangam et al., 2012) e trato digestivo de cupins (Guerrero et al., 2015)

Bactérias pertencentes ao gênero *Cohnella* apresentam grande potencial biotecnológico em função de sua capacidade de sintetizar enzimas responsáveis pela degradação da biomassa lignocelulósica (Mohammadkazemi et al., 2015). As celulases e endoglucanases são exemplos de enzimas responsáveis pela degradação e hidrólise desse material lignocelulósico. As enzimas sintetizadas pela *Cohnella* sp. podem ser aplicadas em diversos setores industriais, como indústrias de ração animal, onde atuam como auxiliaadoras da digestão de ração em ruminantes e monogástricos; assim como na indústria de biocombustíveis, promovendo a hidrólise da biomassa vegetal para produção do combustível (Shiratori et al., 2010; Khiangam et al., 2012).

2.3 Biopolímeros Bacterianos: Estrutura e Aplicações

2.3.1 Exopolissacarídeos (EPS)

O consumo excessivo de combustíveis fósseis e de óleos vegetais residuais, os quais são descartados inadequadamente no meio ambiente, gera liberação de gases do efeito estufa, provocando aumento da temperatura média do planeta. Além disso, seu descarte inadequado no meio ambiente polui fontes de água tornando-as inviáveis para consumo (IPEA, 2021)

Diante dessa situação, os biopolímeros de origem bacteriana surgem como alternativa para promover a biorremediação dos compostos poluentes citados, assim como promover uma reciclagem circular de materiais naturais (IPEA, 2021).

Polissacarídeos microbianos são biomoléculas sintetizadas por bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas. Quando secretados para o meio extracelular, esses polissacarídeos, que servem como proteção celular, são denominados exopolissacarídeos (EPS) (Donot et al., 2012).

Os EPSs microbianos são classificados como gomas hidrossolúveis, possuindo distintas propriedades físicas, estruturais e químicas. Além da designação “goma hidrossolúvel”, são também empregados termos como “hidrocolóide”, “colóide hidrofílico” e “muco” (Sutherland, 2001). Essas moléculas são compostas por monossacarídeos interligados por ligações glicosídicas e formam estruturas tanto lineares quanto ramificadas (Kono et al., 2017). Suas propriedades biológicas

possuem relação direta com o grau de ramificação da cadeia e sua massa molecular (Chen et al., 2014; Orlandelli et al., 2017). A análise da composição e estrutura dos EPSs pode ser realizada por diversos procedimentos, como a espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Cunha et al., 2012), análise de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), técnicas de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN C), determinação de massa molecular e propriedades reológicas, entre outras. (Castellane et al., 2017).

A biossíntese desse biopolímero é influenciada por fatores como temperatura, agitação, aeração e composição do meio de cultura, principalmente a proporção das fontes de carbono e nitrogênio (Mahapatra e Benerjee, 2013). A presença de fonte de carboidratos em excesso no meio de cultivo é essencial para garantir a produção do EPS (Pace & Righelato, 1980).

Entre os EPSs produzidos, destacam-se alguns comercialmente relevantes, como a goma xantana, proveniente da *Xanthomonas campestris*, a goma gelana, derivada da *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea*, e a goma dextrana (Sutherland, 2001). Entre essas, a goma xantana é particularmente estudada, visto que a Food and Drug Administration autorizou seu uso na indústria alimentícia como espessante, estabilizante e emulsificante (FDA, 1969). Adicionalmente, outros polissacarídeos de relevância incluem a celulose bacteriana, algionato e ácido hialurônico.

Os EPSs produzidos por diferentes bactérias apresentam estruturas relativamente simples, podendo ser classificados como homopolímeros ou heteropolímeros, com diferentes grupos não carboidratados. Os homopolímeros, como os sintetizados pelas bactérias que interagem com plantas, como a *Agrobacterium radiobacter*, são constituídos por unidades de D-glicose. Por outro lado, os heteropolissacarídeos incluem sequências desde dissacarídeos até octassacarídeos constituídos por dois a quatro tipos de monossacarídeos diferentes, com grupos acetila e piruvato (Sutherland, 2001).

A goma xantana exibe uma estrutura ramificada, composta por unidades de glicose e trissacarídeos (α -D-manose com grupo acetil, ácido β -D-glucurônico e uma unidade terminal de β -D-manose ligada a um grupo piruvato). A goma gelana, por sua vez, é formada por repetições de tetrassacarídeos (duas moléculas de D-glicose,

ácido D-glucurônico e L-rhamnose), enquanto o ácido hialurônico consiste em unidades repetidas de dissacarídeos, tais como ácido glucurônico e N-acetilglucosamina, unidos por ligações $\beta(1-4)$. O alginato, por exemplo, é constituído por uma cadeia linear de monossacarídeos não repetitivos, ácido manurônico e gulurônico, unidos por ligações $\beta(1-4)$ (More et al., 2014; Rehm, 2010; Vu et al., 2009). A dextrana possui uma estrutura formada por ligações glicosídicas e também por ligações do tipo $\alpha(1-4)$, $\alpha(1-3)$ e $\alpha(1-2)$. Todas essas ligações são responsáveis por originar estruturas de ramificações na cadeia polimérica (Francisco, 2017). A celulose é um homopolissacarídeo formado somente por moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1-4)$ (Carvalho et al., 2009). A Figura 1 ilustra as fórmulas estruturais dos exopolissacarídeos citados acima.

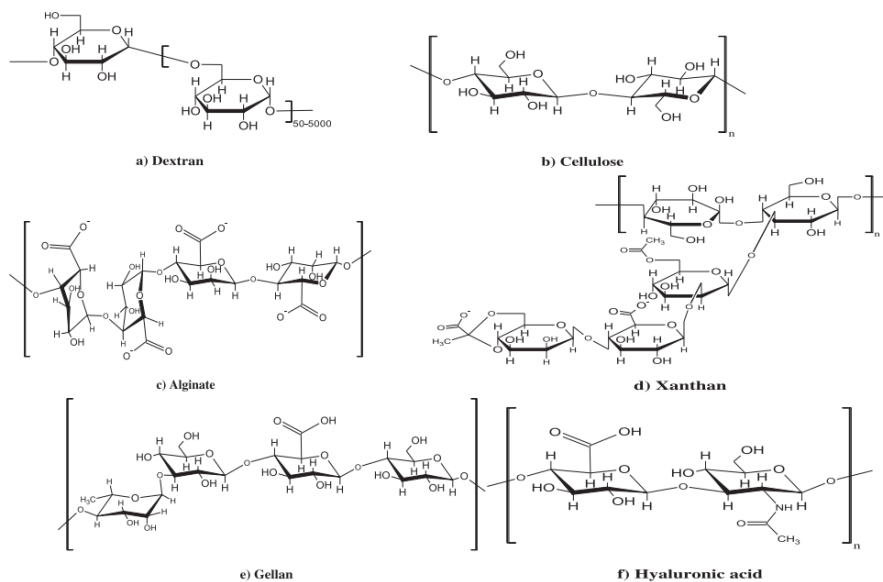


Figura 1. Fórmula estrutural dos exopolissacarídeos dextrana, celulose, alginato, xantana, gelana e ácido hialurônico. Fonte: More et al. (2014).

A liberação dos EPSs pelas bactérias pode ocorrer tanto na forma de um muco viscoso, mantendo-se soltos, quanto por meio de ligações covalentes à superfície celular. Esse biopolímero desempenha múltiplas funções, incluindo a facilitação da captação de minerais e nutrientes na vizinhança da bactéria (Whitfield, 1988), contribuição para a agregação e estabilidade do solo (Zevenhuizen, 1997), aderência das bactérias a superfícies sólidas, formação de biofilmes e participação na fixação biológica de nitrogênio por plantas leguminosas que desenvolvem nódulos simbióticos (Looijesteijn et al., 2001).

Além de sua influência em várias atividades naturais, os EPSs também têm relevância na esfera da biotecnologia, incluindo a biorremediação. Os EPSs são muito usados na indústria alimentícia como dito anteriormente, principalmente como espessante, emulsificante e estabilizante de alimentos, fornecendo textura, consistência e viscosidade aos alimentos (Souza et al., 2004). Além disso, podem ser usados na indústria de cosméticos como agentes espessantes e estabilizantes de loções e creme hidratantes, na indústria farmacêutica para a produção de agentes gelificantes, matriz imobilizadora de drogas, agente imunomodulador, anticarcinogênico e hipocolesterômico, e na agricultura como agente estabilizante e espessante de pesticidas e fertilizantes (Kumar et al., 2007).

Os EPS são moléculas que promovem biorremediação de componentes tóxicos do ambiente, como por exemplo, de MPT, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), corantes, pesticidas, hidrocarbonetos derivados do petróleo e componentes tóxicos de óleos brutos (Sandhya et al., 2022). Para essa remediação, as moléculas de EPS agem promovendo sequestro de MPT, ligação e solubilização de HPA, absorção e degradação de corantes e pesticidas (Mohapatra et al., 2019). Além disso, esses polímeros também promovem a emulsificação de hidrocarbonetos e componentes tóxicos de óleos brutos, aumentando sua biodisponibilidade para as células bacterianas e acelerando o processo de degradação (Li et al., 2021).

A capacidade biorremediadora aliada a características de resistência do EPS a diversos fatores ambientais estressantes (pH, temperatura e salinidade), assim como, o fato de ser economicamente viável e sustentável, o tornam um biopolímero excelente para usar no meio ambiente. (Xu et al., 2017).

2.3.2 Celulose Bacteriana (CB): uma visão abrangente

A celulose é o polímero mais abundante do planeta, com uma produção pelos vegetais de aproximadamente 10^{14} toneladas por ano (Donini et al., 2010). A celulose vegetal é um recurso extremamente importante para a economia global, uma vez que é extensamente usada por diversas indústrias, como a de papel, têxtil e de materiais de construção (EMBRAPA, 2019). Também é muito usada em aplicações

médicas por possuir alta biocompatibilidade, estrutura fibrosa, alta rigidez e ser pouco onerosa (Huang et al., 2014).

Esse biopolímero, produzido por bactérias, foi descrito por Brown (1886), através de estudos com *Acetobacter xylinum*. Esse pesquisador conseguiu que a bactéria *A. xylinum* sintetizasse um filme de celulose, em uma cultura estática (Fernandes, 2019). A CB é formada a partir de fermentação por algumas bactérias como a *Glucanobacter* sp., *Acetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Aerobacter* sp., *Sarcina* sp., *Azobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., dentre outras. Sua fórmula molecular é $(C_6H_{10}O_5)_n$, sendo semelhante nos dois tipos de celulose (vegetal e bacteriana) (Fernandes, 2019). A estrutura da celulose é demonstrada abaixo na Figura 2.

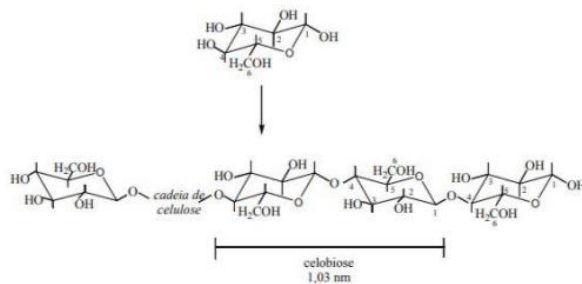


Figura 2. Fórmula estrutural da celulose. Fonte: Moreira, (2009).

A celulose é constituída por cadeias poliméricas de D-glicose, dispostas na configuração piranosil e unidas por ligações glicosídicas β-1,4. Essa estrutura apresenta hidroxilas que auxiliam nas ligações de hidrogênio inter e intra-cadeia, gerando filamentos estendidos (Fernandes, 2019).

A biossíntese desse material envolve a inoculação de microrganismos em um meio de cultura apropriado, contendo fontes de fósforo, nitrogênio e carbono, e mantendo um pH e temperatura adequados e com a concentração adequada de oxigênio dissolvido (Lee, 2014). O cultivo pode ser estático ou dinâmico. No cultivo estático a CB sintetizada consiste em uma película viscosa presente na superfície do meio, e no cultivo sob agitação consiste em fios fibrosos (Fernandes, 2019).

A celulose pode ser sintetizada tanto por plantas como por bactérias, e é um recurso extremamente importante para a economia global (Huang et al., 2014). Esse

biopolímero se divide em duas categorias: celulose complexa (celulose vegetal) e a celulose pura (celulose bacteriana). Ambas possuem a mesma fórmula molecular. No entanto, a celulose vegetal está frequentemente associada a outros biopolímeros como a hemicelulose, a pectina e a lignina, que por sua vez não estão presentes na CB (Loran et al, 2013). Esse fato faz com que a celulose vegetal seja um produto com limitações em aplicações biotecnológicas, uma vez que sua extração é realizada com diversos produtos químicos corrosivos e prejudiciais. Esses processos de purificação aumentam o custo e o tempo de produção da celulose purificada produzida por culturas de microrganismos (Loran et al, 2013).

Considerando esses fatores e a busca por um material sustentável, biodegradável e renovável, com características e aplicabilidade que possam atender as necessidades da população mundial, a celulose bacteriana aparece como uma alternativa promissora. Ela é livre de impurezas, tem baixo custo de produção e possui uma estrutura molecular que lhe confere grande resistência mecânica e à tração (Donini, et al., 2010). Além disso, ela é um material biodegradável e renovável (Duarte et al., 2019).

Devido as suas propriedades particulares a celulose bacteriana pode ser amplamente empregada em matrizes biomédicas, adesivos, absorventes, lubrificantes, embalagens de fármacos e alimentos, materiais de alta performance, dispositivos computacionais, entre outros (Zhu et al., 2011). Além disso, por ser biocompatível, e possuir propriedades não alergênicas, é muito usada tanto na biomedicina, como na reconstrução de novos tecidos, cicatrização de feridas pele artificial e enxertos vasculares (Silva, 2012; Shan et al., 2013; Olyveira et al., 2016).

Na indústria alimentícia, a CB pode ser utilizada como agente estabilizador de espumantes, agente gelificante de soluções aquosas, emulsões e dispersões (Dourado et al., 2016). Na indústria eletrônica é usada como membrana de alta condutividade, nanoplacas de grafite para melhorar a condutividade elétrica entre outras aplicações (Zhou et al., 2013)

Conforme mencionado anteriormente, a CB também pode ser utilizada na biorremediação de fontes de água contaminadas com óleos e minerais remanescentes. Isso é feito por meio da síntese de filtros de celulose que irão

promover a filtração e a ultrapurificação da água, purificação de esgoto e de resíduos (Donini et al., 2010).

2.4 Biorremediação: uma solução ambiental

A biorremediação atualmente pode ser considerada como uma alternativa promissora para mitigar os danos causados pela atividade humana. O aumento populacional, da produção agropecuária e da atividade industrial, causa um aumento da produção de resíduos que podem afetar a biodiversidade dos ecossistemas e a saúde dos seres vivos em geral. Desta forma o processo de biorremediação se destaca entre as técnicas de remediação por ser uma tecnologia limpa, de baixo custo e que usa a capacidade fisiológica de microrganismos autóctones ou alóctones de degradar compostos (Maciel; Takaki; Gusmão, 2010). Essa estratégia pode ser realizada por meio da biorremediação *in situ* e *ex situ*. A biorremediação *in situ* consiste nos processos de bioaumentação, bioestimulação, atenuação natural monitorada, bioventilação, biolixiviação, biofiltros e “bioaspinging”. Já a biorremediação *ex situ* consiste nos processos de biorreatores biopilhagem, compostagem e “landfarming” (Cristaldi et al., 2017). Todos os processos citados são altamente eficientes e necessitam de baixo investimento financeiro (Bornhorst et al., 2018).

A bioaumentação refere-se à introdução de microrganismos cultivados para degradar cadeias de hidrocarbonetos em um sistema natural poluído. Os agentes de bioacumulação são usados devido a sua capacidade de degradar contaminantes, sua resistência as condições ambientais, estabilidade genética e, também, pela sua capacidade de sobreviver em competição com a comunidade nativa (Gkorezis et al., 2016; Kebede et al., 2021; J. Sarkar et al., 2020).

A bioestimulação envolve a adição de nutrientes ao local contaminado, com o objetivo de estimular o crescimento de microrganismos nativos degradadores de poluentes ambientais (Miller, 2010) e acelerar o processo de degradação dos contaminantes (Kanissery; Sims, 2011). Com a implementação de nutrientes e otimização das condições, é possível que os microrganismos aumentem sua taxa de crescimento, sua taxa metabólica e, conseqüentemente, sua capacidade de

degradação dos contaminantes. Bioestimulantes para os microrganismos podem ser desde melhor oxigenação do solo, assim como nutrientes inorgânicos e fertilizantes oleofílicos (Andrade et al., 2010; Kebede et al., 2021; J. Sarkar et al., 2020).

A atenuação natural monitorada, também conhecida como biorremediação intrínseca consiste na degradação do poluente, a níveis aceitáveis, sem alteração das condições ambientais. Nesse cenário, a eliminação do contaminante ocorre usando apenas os microrganismos nativos do ambiente, que irão utilizar os compostos orgânicos poluentes como fonte de carbono, resultando na sua redução no ambiente (Kebede et al., 2021).

A biolixiviação, também conhecida como lixiviação bacteriana é um processo que utiliza microrganismos acidófilos e quimiolitotróficos em minérios de baixo teor no solo e em dejetos de mineração, com o intuito de obter metais de interesse. Esse processo, que permite obtenção de metais presentes em pequenas quantidades no solo de maneira sustentável, mostra-se uma excelente opção de mineração (Giaveno et al., 2011; Watling, 2006).

Os biofiltros também são mecanismos usados na biorremediação. Um exemplo de biofiltro é o de ilhas flutuantes, que consiste num sistema no qual as plantas permanecem flutuando na coluna de água, com suas raízes realizando filtração. Isso permite que os microrganismos formem biofilmes (Samal; Kar; Trivedi, 2019). Para esse sistema ser eficaz deve-se retirar as plantas após o limite de remoção de contaminates ser atingido, como forma de evitar a reentrada dos compostos na água (Wang et al., 2021). Além disso, a destinação adequada dessa biomassa após sua remoção do corpo de água é fundamental para evitar poluições secundárias, ao mesmo tempo que permite gerar produtos de valor agregado, como biogás, adsorventes, entre outros. A conversão de biomassa garante a produção limpa e uma economia circular (Kurniawan et al., 2021).

A compostagem consiste em um processo biológico nos quais contaminantes orgânicos, como hidrocarbonetos, são transformados em subprodutos estabilizados por ação de microrganismos. Esse processo pode ser realizado tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Após o tratamento, o solo pode ser aproveitado como adubo orgânico (Abena et al., 2019; Guo et al., 2020; Lin et al., 2022; Lu et al., 2019; Ozaki et al., 2017).

Biorreatores são equipamentos constituídos por um sistema de processamento bioquímico *ex situ*, que pode operar em condições aeróbicas e anaeróbicas, criando um ambiente biologicamente ativo, no qual as condições são necessárias para o crescimento ideal dos organismos. Isso permite que matérias-primas sejam convertidas em produtos específicos (Amruta, 2022c; Mohan et al., 2004).

“Landfarming” é uma técnica de escavação e mistura de solos contaminados, que serão espalhados sobre a superfície do solo, com o intuito de estimular a atividade microbiana para biorremediar o solo. Para essa técnica, a preparação do solo, através da adição de nutrientes, minerais e umidade, assim como proporcionar uma boa aeração, são indispensáveis para estimular a atividade microbiana autóctone e a biorremediação. Apesar de ser uma técnica simples e de baixo custo, ela requer grandes áreas para ser aplicada (Amruta, 2022c; Becarelli et al., 2021; Silva-Castro et al., 2015; Nikolopoulou et al., 2013).

“Bioasparging” consiste na injeção de ar ou gás pressurizado no solo poluído, para estimular a atividade de bactérias aeróbicas, e conseqüentemente remover os poluentes do local. Isso favorece a transferência dos hidrocarbonetos da fase residual para a fase a vapor (Amruta, 2022a; Philip e Atlas, 2005).

Por fim, a bioventilação estimula a biodegradação aeróbica natural dos contaminantes do solo, através do controle do fluxo de ar ou oxigênio. Para isso, são usados poços verticais ou horizontais, nos quais o ar é injetado diretamente na área contaminada, para melhorar a voltaização dos contaminantes e melhorar a capacidade biorremediadora dos microrganismos, decompondo os hidrocarbonetos presentes no solo (Amruta, 2022b; Philip e Atlas, 2005).

Para garantir maior biodegradabilidade, é necessário considerar diversos fatores químicos e físicos que influenciam nesse processo. Os parâmetros físicos são a natureza física da matriz onde o poluente é encontrado, ou seja, se o poluente está no solo ou na água; além da temperatura e da luz. Dentre os fatores químicos, é possível citar a composição química da matriz ambiental, que irá delimitar a capacidade nutritiva para as bactérias, o pH, umidade, teor de oxigênio dissolvido, o potencial de oxirredução do meio e a estrutura química do poluente (Vidali, 2001; Tate, 1995).

2.4.1 Biorremediação com agentes surfactantes

Os agentes surfactantes utilizados na biorremediação, produzidos por microrganismos na forma de exopolissacarídeos, são compostos ativos de superfície que reduzem a tensão superficial e interfacial dos líquidos, desempenhando o papel de emulsificantes (Bueno; Silva; Garcia-Cruz, 2010). Esses emulsificantes consistem em uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, aumentando a solubilidade e a disponibilidade dos poluentes hidrofóbicos para os microrganismos, e conseqüentemente pode resultar em um aumento da taxa de biodegradação (Costa et al., 2010).

As moléculas dos agentes surfactantes pode agir através de adsorção, formação de micelas e de macro e micro emulsões, lubrificação, solubilização, detergência e formação de espumantes (Silva et al., 2019). Essas moléculas podem ser produzidas por síntese química, conhecidas como surfactantes químicos, ou produzidas por síntese biológica, também chamadas de biossurfactantes. Os biossurfactantes surgem como uma ótima alternativa aos surfactantes químicos, uma vez que são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e capacidade de atuar em condições estressantes de temperatura, pH e salinidade (Silva et al., 2019).

Tanto bactérias quanto fungos filamentosos e leveduras são capazes de sintetizar biossurfactantes (Pinto; Martins; Costa, 2009; Bueno, 2008; Fontes; Amaral, Coelho, 2008; Colla et al., 2010) que desempenham um papel crucial na biorremediação de compostos oleosos, como óleo diesel e óleos residuais vegetais (Nitschke; Pastore, 2002). Esses agentes aumentam a biodisponibilidade desses contaminantes por aumentar a superfície de contato das gotas de óleo, permitindo desta forma o melhor acesso das bactérias ao poluente. Além disso, essas moléculas podem ser usadas para fabricar películas ultrafinas, ajudar no processamento químico de papel, dentre outras aplicações (Silva et al., 2019).

2.5 Metais Potencialmente Tóxicos (MPT)

Os MPT, que incluem elementos como, alumínio, arsênio, bário, cádmio, chumbo, mercúrio, níquel e zinco, são compostos naturais que apresentam risco tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiental, dependendo das concentrações e do tempo de exposição (Andreoli, 2001). Esses compostos possuem uma densidade relativamente maior ao ser comparado com a água, assim como em relação a outros metais, como os alcalinos, alcalinos terrosos e metais leves (Tchounwou et al., 2012; Mockaitis, 2011).

Os metais são extremamente importantes para o desenvolvimento de diversos processos biológicos vitais, quando presentes em concentrações adequadas, entretanto, em concentrações elevadas são tóxicos para o meio ambiente e seres vivos em geral. Alguns efeitos tóxicos manifestam-se em função da bioacumulação dos íons metálicos, como inibição enzimática, oxidação de biomoléculas, alteração na estrutura de proteínas, danos irreversíveis ao material genético e nos processos de divisão celular (Jaishankar et al., 2014; Moschem; Gonçalves, 2020).

Esses compostos são encontrados em diversos habitats, inclusive em ambientes microbianos, devido ao seu descarte em processos naturais, mas principalmente como resultado das atividades industriais, incluindo metalurgia, indústria química e agrícola, bem como em aplicações industriais de produtos farmacêuticos, pesticidas, plásticos, entre outros (Tchounwou et al., 2012). A presença desses elementos em ambientes naturais e a ampla gama de aplicações industriais que os envolvem enfatizam a importância de monitorar e gerenciar adequadamente esses elementos para minimizar seus impactos adversos na saúde humana e no ecossistema.

2.5.1 Resistência Bacteriana a Metais Potencialmente Tóxicos

Diversas bactérias têm a capacidade de resistir a ambientes contaminados por MPTs. Porém, isso depende de diversos fatores, como fatores bioquímicos, fisiológicos, genéticos e estruturais da bactéria. Geralmente, quando as concentrações de MPT superam o limite tolerado pelo microrganismo, vários mecanismos de resistência são ativados, para que a bactéria possa sobreviver nesse ambiente. Dentre esses mecanismos é possível citar a exclusão por barreira

permeável, sequestro intra e extracelular, bombas de efluxo e redução da sensibilidade dos alvos celulares a íons metálicos (Bruins et al., 2000).

Alguns mecanismos desencadeadores dessa resistência são genes de resistência agrupados em operons presentes no genoma cromossômico e plasmídeos (Fashola et al., 2016b). Esses genes são transferidos de uma célula bacteriana a outra por meio de transferência horizontal (Osman et al., 2019).

Um exemplo de resistência aos MPTs ocorre nas bactérias da espécie *Rhizobium tropici*. Os genes *cop* e *fix*, presentes no genoma dessa espécie de bactéria estão diretamente envolvidos com a homeostase do cobre (Elizalde-Díaz et al., 2019). O gene *cop* atua em resposta a presença do íon cobre através de dois mecanismos de resistência independentes, que são os operons *copMRS* e *copABC*. As proteínas *copABC* atuam no sequestro de cobre fora do citoplasma, através do efluxo desse metal, o que impede a entrada desses íons tóxicos no citoplasma bacteriano (Granja-Travez and Bugg, 2018). Enquanto o *copM*, é responsável por codificar uma proteína capaz de se ligar ao íon cobre com alta afinidade. Por essa proteína se localizar no periplasma e no espaço extracelular, ocorre a prevenção do acúmulo de cobre por meio de ligação direta do cobre no exterior da célula (Giner-Lamia et al., 2015).

A exposição bacteriana ao níquel pode desencadear uma resposta de resistência através dos genes *nikR* e *hoxN*. O gene *nikR* é ativado em concentrações excessivas de níquel intracelular. Através dele, bombas de efluxo eliminam o excesso desse íon no citoplasma bacteriano (Sharma e Shukla, 2021a). Já o gene *hoxN* é responsável por codificar uma proteína captadora do níquel. Um exemplo da atuação do *hoxN*, é o caso da bactéria *Cupriavidus metallidurans*. Uma cepa mutante D7 dessa espécie que não possuía o *hoxN* apresentou menor capacidade de exclusão do níquel quando comparada a cepa controle (Herzberg et al., 2016).

Quanto ao íon cádmio, é possível apresentar inúmeras proteínas responsáveis pelo efluxo desse íon através da membrana plasmática e membrana externa, como os sistemas *Czc*. Nesse sistema, proteínas *CzcA*, *CzcB*, *CzcC*, *CzcD* e *CzcR* são responsáveis pelo efluxo de cádmio do citosol para vacúolos ou espaço extracelular (Xia et al., 2021).

Também existem genes responsáveis por codificarem proteínas de resistência ao cromato, como os genes *chrABCDEFI*. Um estudo realizado com uma cepa de *Ochrobactrum tritici* 5bv11, conseguiu crescer em concentrações de cromato superiores a 50mmol/dm³, em função da presença dos genes *chrA* e *chrB*. O gene *chrA* codifica uma proteína responsável pela atividade de uma bomba de efluxo de cromato, evitando acúmulo excessivo desse íon no interior da célula bacteriana (Branco et al., 2008).

A cepa FB24 de *Arthrobacter* sp., também apresenta um gene de resistência ao cromato responsável pela codificação de uma proteína que promove o mecanismo de efluxo desse metal (Henne et al., 2009). Além disso, para as bactérias resistirem a altos níveis de cromo, elas podem realizar bioabsorção e bioacumulação de Cr⁶⁺, podem reduzir Cr⁶⁺ para Cr³⁺, e realizar a redução do estresse oxidativo, por meio de proteínas do sistema de recombinação, replicação e reparo do DNA (Viti et al., 2014).

As bactérias também possuem a capacidade de transportar íons zinco para dentro e fora da célula, por meio de transportadores que possuem afinidade com esse metal. Quando o íon zinco está escasso, as bactérias empregam os transportadores *ZnuA*, *ZnuB* e *ZnuC*. A proteína *ZnuC* fornece energia para o transporte do íon zinco, através da hidrólise do ATP. Já a *ZnuA* é uma proteína periplasmática de ligação que atua em conjunto com a *ZnuB* (permease da membrana interna) (Suryawati, 2018).

O gene responsável pela absorção do íon zinco é o gene *zupT*. Esse gene atua como um transportador dos íons metálicos Zn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺ e Cd²⁺, porém com maior afinidade ao íon zinco. Esse gene é portanto, extremamente necessário a bactéria para evitar uma intoxicação por zinco (Ge e Ge, 2016).

Geralmente, a exposição crônica aos MPTs estimula o sistema sensorial de tradução das bactérias alterando a expressão gênica e, assim desencadeando a síntese de genes de resistência (Gadd, 2009).

Hassen et al. (1998) comprovaram que algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentavam resistência a diversos metais, como cobre, zinco, cromo, cádmio, cobalto e mercúrio, uma vez que toleravam uma concentração máxima inibitória alta, além de serem resistentes a muitos antibióticos. Isso provou que essa

espécie poderia ser usada como modelo para estudos ecotoxicológicos. Akinbowale et al. (2007) demonstraram que isolados de *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp. apresentaram alta resistência a sete MPTs (cobre, chumbo, cromo, zinco, cádmio e cobalto). Isso foi avaliado pela determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) em meio de cultivo.

Pathak e Gopal (2005) avaliaram a resistência de bactérias isoladas de peixes a cobre, chumbo, manganês, cádmio e cromo. Os autores desse estudo, verificaram a resistência das bactérias em diferentes concentrações dos metais, com maior resistência para o manganês e menor para o cromo. A liberação de cromo no meio é preocupante, devido a sua bioacumulação nos peixes. Isso prejudica as atividades celulares, e os patógenos dos peixes também expostos cronicamente a esse composto, criam alta resistência (Steinhagen et al., 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental da Faculdade de Ciências agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, campus de Jaboticabal. O experimento foi conduzido sem oferecer riscos à saúde humana e ambiental, seguindo todas as normas de biossegurança.

3.1 Origem do Consórcio Bacteriano Degradador de Lignocelulose

O consórcio bacteriano utilizado neste trabalho foi obtido de esforços anteriores do grupo de pesquisa, por amostragem de solo de cana-de-açúcar, seguindo a metodologia descrita por Constâncio et al. (2020). Para o enriquecimento, 500 µL do sobrenadante foram inoculados em meio de cultura estéril Bushnell Hass Broth (BHB) contendo 0,5% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar, moído e autoclavado, como única fonte de carbono, incubada pelo período de 168 horas, 30°C, 150 rpm. Em seguida uma alíquota foi transferida para um novo meio de cultura (BHB+ bagaço de cana-de-açúcar) e este processo foi repetido por 25 semanas, coletando cada fração e armazenando em glicerol a -80°C.

3.2 Isolamento e Identificação dos microrganismos

A fim de identificar as bactérias presentes no consórcio foi realizado o isolamento de bactérias a partir do cultivo do consórcio por 7 dias em meio de cultura BHB + bagaço de cana de açúcar. As colônias bacterianas foram obtidas por meio de diluição seriada, em solução de NaCl 0,85% (m/v) contendo 0,2% de Tween®20 e cultivo em placas com meio de cultura BHB sólido suplementado com glicose 2 mg/mL. As placas foram incubadas pelo período de 2 a 7 dias e as colônias bacterianas com características morfológicas diferentes foram separadas, cultivadas em meio BHB líquido contendo glicose e estocadas em meio com glicerol e posterior uso nos ensaios e extração do DNA genômico.

3.3 Identificação dos Isolados por Sequenciamento Sanger do Gene 16S rRNA

De um consórcio bacteriano foram isoladas 26 bactérias das quais 4 que eram grandes produtoras de EPS foram identificados por sequenciamento do gene 16S rRNA, para posterior identificação através de um banco de dados RefSeq, considerando a melhor porcentagem de identidade. Os isolados foram cultivados em meio PGY líquido (1,4 g/L K₂HPO₄, 1,0 g/L KH₂PO₄, 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O, 10 g/L glicerol, 3,0 g/L extrato de levedura, pH 7,0), por 48 h, mantidos sob temperatura de 30°C e agitação de 150 rpm (Campanharo, 2006). Uma alíquota da suspensão foi coletada, as células bacterianas separadas por centrifugação e o sedimento celular usado para a extração do DNA. O DNA foi extraído utilizando a metodologia descrita por Marmur (1961) e sua pureza verificada com o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) (relação 260/230 nm) e quantificada pelo fluorômetro Qubit® usando o dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TBE.

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), seguindo a seguinte reação: 25 µL de MasterMix, 7,5 pmol de

primer RD1 e FD1(Weisburg et al., 1991), onde: FD1(5'-CCg AAT TCg TCg ACA ACA gAg TTT gAT CCT ggC TCA g - 3') e RD1(5'-CCC ggg ATC CAA gCT TAA ggA ggT gAT CCA gCC - 3'); 1U da enzimaTaq polimerase (Fermentas), 16 µL de água nuclease free e 40 ng de DNA. A reação foi realizada no termociclador PTC-100™ ("Programmable Thermal Controller" – MJ Research, Inc), seguindo o programa, no qual se faz o pré-aquecimento a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s de desnaturação a 95°C. Em seguida, foi realizado o emparelhamento dos oligonucleotídeos a 53°C, por 40 segundos. A seguir, foi feito 1 min e 30 s de alongação a 72°C e 7 min de etapa de extensão final a 75°C, e por fim, foi mantido a 4°C até ser retirado do termociclador. Os produtos do PCR obtidos foram para um gel de agarose a 1,5% até a abertura total do marcador. Em seguida, recortou-se a banda com 1500 pares de base, e por fim, foi feita a purificação através da utilização do kit "DNA Clean & Concentrator™5" (Zymo Research).

Para o sequenciamento do gene 16S rRNA utilizou-se a plataforma ABI 3130xl. Para realizar a reação de sequenciamento, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do BigDye™ Terminator v3.1 nCycle Sequencing Kit, que foi aplicado para os primers FD1, RD1 e os primers internos 8f, 362f, 768f, 907r e 1203f de acordo com Inui et al. (2012). A montagem das sequências obtidas foi feita utilizando o script phredPhrap do conjunto de programas Phred/Phrap/Consed (Gordon, 2003; Green, 1998; Ewing et al., 1998; Ewing; Green, 1998;). As sequências resultantes foram submetidas à um processo de atribuição taxonômica, por um método de classificação de sequências utilizando a ferramenta Classifier do 'Ribosomal Database Project' (RDP) a partir do conjunto de sequência de treinamento de 16S rRNA (versão 18) (Wang, 2007). Enquanto a consulta de similaridade de nucleotídeos foi realizada utilizando o BLASTn (Altschul et al., 1990) com sequências do banco de dados do RefSeq (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21091/>) que contém sequências curadas de 16S rRNA de bactérias e archaea.

3.4 Obtenção de Biopolímeros Bacterianos: Exopolissacarídeos (EPS) e Celulose Bacteriana (CB)

3.4.1 Exopolissacarídeos (EPS)

Para a obtenção de exopolissacarídeos (EPS) os isolados foram pré-cultivados em meio de cultura líquido PGY (Campanharo, 2006) e incubados pelo período de 48 h a 30°C, sob agitação de 150 rpm até a DO_{600} 0,1. Após inoculou-se 10% v/v em meio de cultura PSY líquido (1,2 g/L K_2HPO_4 , 0,8 g/L KH_2PO_4 , 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 30 g/L sacarose, 1,0 g/L extrato de levedura, pH 7,0) (Campanharo, 2006) pelo período de 96 h e 144 h a 30°C e agitação de 150 rpm. A suspensão bacteriana foi centrifugada (10.000 rpm, a 4°C por 30 minutos) para a separação do sobrenadante, este foi utilizado para a obtenção do EPS de acordo com a metodologia descrita por Castellane et al. (2015). Por fim, os exopolissacarídeos obtidos foram secados e pesados. Todo esse experimento foi feito em triplicata.

3.4.2. Celulose Bacteriana (CB)

Para a produção de celulose apenas os 4 isolados que foram os maiores produtores de EPS foram pré cultivados em meio de cultura PGY líquido (Campanharo, 2006) e transferidos para meio de cultura sólido HS modificado (Hestrin e Schramm, 1954) (10 g/L glicose, 10 g/L frutose, 5 g/L peptona de soja, 5 g/L extrato de levedura, 27 g/L Na_2HPO_4 , 1,15 g/L ácido cítrico, 12 g/L ágar), por 48h, 30°C, 150 rpm e pH 6,0. Após essa incubação uma alçada bacteriológica foi usada para ser pré-inoculada em meio de cultura líquido HS até a DO 0,1, 0,5 e 1, e essa suspensão foi então inoculada na proporção de 1/10 (v/v) em meio de cultura líquido HS e o material mantido em repouso por 7 dias, a 30°C. Após este período avaliou-se a produção de celulose. A obtenção de celulose se dá pela formação de uma película na superfície do líquido, quando isso ocorre essa película é separada e lavada para a análise quantitativa, segundo Nguyen et al (2010). A lavagem inicial foi feita com a imersão da película em água destilada para se retirar o excesso de meio de cultura e dos componentes solúveis. Em seguida, as membranas foram transferidas para uma solução de NaOH 0,5 mM e submetidas a essa solução por 1 h a 90°C. Após este período foram lavadas com água destilada pelo período de 2 h até a estabilização em pH neutro. Por fim, as membranas purificadas foram mantidas sob refrigeração com água deionizada para remover resíduos de NaOH e reduzir o

crescimento de bactérias contaminantes. Em seguida, as películas foram secas e pesadas. Essa etapa do experimento também foi realizada em triplicata.

3.5 Avaliação da Ação Surfactante do EPS

A capacidade emulsificante do EPS em estabilizar emulsões hidrofóbicas foi avaliada conforme descrito por Freitas et al. (2009). Para isso foram testadas quatro concentrações de EPS em solução aquosa 0,5, 1, 2 e 3 mg/mL. Foram testados óleos vegetais residuais e materiais derivados do petróleo, como óleo diesel, hexano, gasolina e querosene. As soluções aquosas de EPS foram misturadas com os materiais citados na proporção de 3:2 (v/v) e agitadas no vórtice. A avaliação da taxa de emulsificação foi realizada no período de 24 e 168 h. O índice de emulsificação foi calculado como descrito por Cooper (1987), sendo: $Ex = (he / hT) \times 100$, onde Ex é o índice de emulsificação após agitação e respectivo tempo de avaliação, he é a altura da emulsão (mm) e hT é a altura da mistura (mm) (Meneghine et al., 2017).

3.6 Análise de HPLC para composição do EPS

Amostras de exopolissacarídeos (EPS) dos maiores produtores desse biomaterial (isolados 9, 11, 12 e 13) foram recebidas liofilizadas e secas. A composição dos monossacarídeos do EPS bruto das bactérias 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 Moretto et al. (2015). Amostra de 1,0 mg de EPS foi hidrolisada com 200 µL de ácido trifluoracético 4 mol/L em tubos de hidrólise de 13 x 100 mm, selados com uma chama de maçarico sob vácuo. Os tubos permaneceram a 120°C, durante 2 h. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e a solução foi evaporada em um liofilizador Hetovac vr-1. O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de isopropanol puro, novamente evaporado por no mínimo 4 h.

Após isso, o EPS hidrolisado e os padrões de monossacarídeos foram pré-derivatizados (marcação química) com PMP. As reações foram conduzidas em

microtubos, acrescentando-se em cada tubo 40 μL de solução de PMP (0,5 mol/L em metanol) e 40 μL de solução de hidróxido de sódio (0,3 mol/L). Os tubos foram agitados e incubados a 70°C por 2 h. Após o resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada pela adição de 40 μL de solução de ácido clorídrico 0,3 mol/L. Foram adicionados 0,5 mL de éter butílico, na extração dos derivados de monossacarídeos e os tubos agitados por 5 s. As fases foram separadas por centrifugação a 5.000 x.g por 5 min e a fase superior (orgânica) foi removida e descartada. Este procedimento de extração foi repetido por 3 vezes e a fase aquosa resultante foi evaporada em capela por 2 h, e então 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-M40). 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 (150x4,6 mm, i.d. x 5 μm) com velocidade de fluxo constante de 0,5 mL/min; usando os tampões A e B, constituídos por 100 mMol/L de acetato de amônio (pH 5,5), 25% de acetonitrila, com 10% e 25% de acetonitrila, respectivamente. Os monossacarídeos padrões utilizados foram glicose, manose, ramnose, galactose, e ácido galacturônico, e as seguintes concentrações: 0,175; 0,035; 0,7 e 1,4 mg/mL para a construção da curva de calibração. A quantidade de amostra injetada no cromatógrafo foi de 10 μL . Deste modo, foram possíveis determinar a caracterização química dos EPSs em relação a composição dos monossacarídeos.

3.7 Análise de FTIR

A análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas utilizando-se amostras de EPS dos isolados 9, 11, 12 e 13, purificadas e liofilizadas. Cada amostra (1mg) foi misturada com 100 mg de brometo de potássio seco, prensada em um molde de 16 mm de diâmetro. O espectro FTIR foi obtido em um espectrômetro Paragon 1000 (Perkin-Elmer) e registrado na região

4000–400 cm^{-1} , com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} e normalizado em pico de intensidade de 1,050 cm^{-1} Castellane et al. (2017). Esses estudos foram realizados pelo Dr. Luiz Alberto Colnago (Embrapa Instrumentação, São Carlos, Brazil).

3.8 Avaliação da Resistência dos Isolados a Metais Potencialmente Tóxicos

Essa avaliação foi feita usando apenas os isolados com maior produção de EPS no experimento. Para esse teste, os isolados em questão foram pré-cultivados em meio PGY líquido (Campanharo, 2006) por 48h, a 30°C e 150 rpm. Uma alíquota de 10 μL dessa suspensão bacteriana foi adicionada ao meio PGY sólido com metal pesado, e foi mantida em repouso por 10 dias, a 30°C para observar se ocorreria o crescimento bacteriano. Os MPT eleitos para o experimento foram cádmio (Cd^{2+}), cobre (Cu^{2+}), cromo (Cr^{3+}) e (Cr^{6+}), zinco (Zn^{2+}), níquel (Ni^{2+}), mercúrio (Hg^{2+}). Esses íons metálicos estavam na forma de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, ZnSO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e HgCl_2 , respectivamente. Inicialmente, as concentrações usadas para todos os metais foram 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM. A partir dos resultados obtidos nesse teste inicial, outras concentrações de metais foram testadas, maiores ou menores que as iniciais dependendo do comportamento do isolado. Para o cromo (Cr^{3+}) foram usadas as concentrações de 3,0 mM, 5,0 mM, 7,0 mM e 10,0 mM. Para o cromo (Cr^{6+}) e mercúrio, 0,25 mM. Para o cádmio 3,0 mM, 5,0 mM e 7,0 mM. Para o níquel 1,5 mM, 3,0 mM, 4,0 mM e 5,0 mM. Para o zinco 5,0 mM, 7,0 mM e 10,0 mM. Para o cobre 1,5mM e 3,0 mM e para o chumbo 5,0 mM.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Produção de Exopolissacarídeos (EPS)

Para avaliar a capacidade de produção de EPS os isolados foram cultivados em um meio específico. A avaliação da produção de EPS, foi realizada com 26 isolados do consórcio com 31 isolados, testados durante os períodos de 96 h e 144h de cultivo. A Figura 3 ilustra a quantidade do polímero produzido em ambos os períodos.

Observou-se que no período de 96 h de cultivo, 6 dos isolados não conseguiram produzir EPS, 13 produziram até 0,5 g/L, 3 produziram mais de 0,5 g/L, e apenas 3 produziram mais 1,5 g/L, e 1 isolado (9) foi capaz de produzir mais de 2,5 g/L. Foi possível constatar (Figura 3) que no período de 144 h apenas 5 isolados não foram capazes de produzir EPS, 12 isolados produziram até 0,5 g/L, 5 isolados produziram até 1g/L e os 4 isolados que mais produziram EPS em 96 h também foram os melhores produtores em 144 h, produzindo mais do que 2,5 g/L, com os isolados 11 e 12 chegando próximo a 3 g/L.

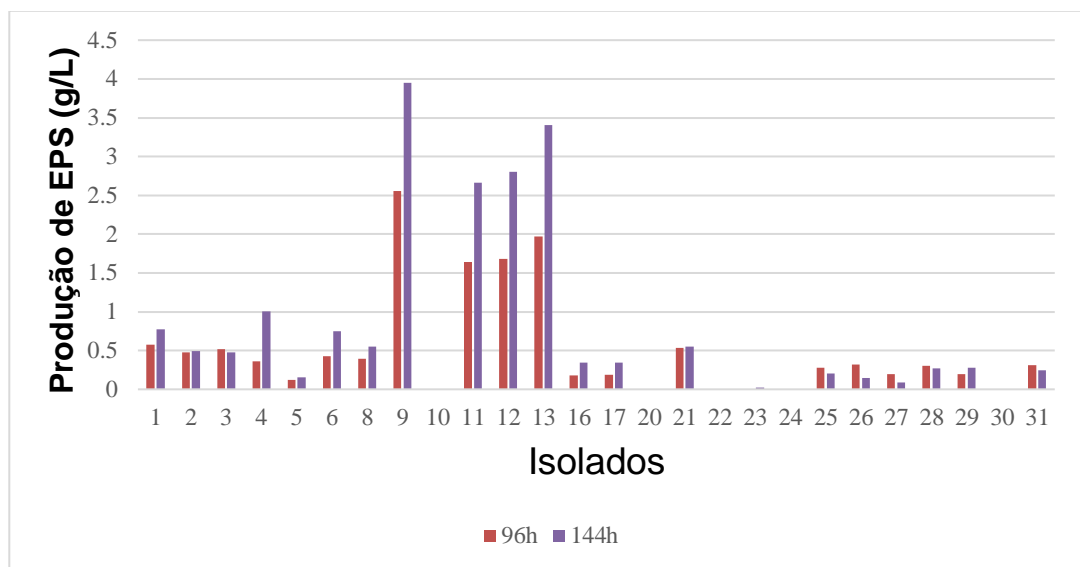


Figura 3. Médias da produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos 26 isolados do consórcio.

Em ambos os períodos estudados os 4 isolados que se destacaram como bons produtores de EPS foram os isolados 9, 11, 12 e 13. O isolado 9 foi o maior produtor de todos, gerando um total de 2,557g/L em 96 h e 3,953 g/L em 144 h. O isolado 13 foi o segundo maior produtor, sintetizando um total de 1,971 g/L de EPS em 96 h e 3,405 g/L em 144 h. O isolado 12 foi o terceiro maior produtor de EPS, apresentando um total de 1,684 g/L em 96 h e 3,01 g/L em 144 h. O quarto maior produtor de EPS foi o isolado 11 que apresentou um total de 1,641 g/L em 96 h e 2,644 g/L em 144h. Tendo isso em vista, a produção de EPS por esses 4 isolados foi repetida em triplicata e os dados da média e desvio padrão foram coletados e representados na Figura 4. O material produzido foi usado para as avaliações da

composição e estrutura do EPS, assim como para a avaliação da capacidade de atuar como emulsificante.

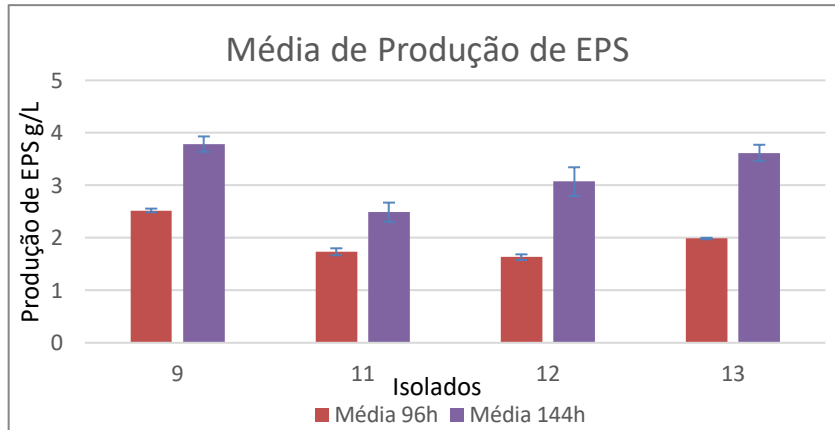


Figura 4. Apresenta as médias e desvios padrão da produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos isolados 9, 11, 12 e 13 do consócio em meio de PSYlíq, mantido sob agitação a 150 rpm e 28 °C, por períodos de 96 horas e 144 horas.

4.2 Identificação dos Isolados

As 4 principais bactérias produtoras de EPS (9, 11, 12 e 13) foram identificadas pela análise dos dados de sequenciamento do gene 16SrRNA. O gênero dos isolados foi obtido utilizando os bancos de dados RDP classifier (Wang, 2007) e sua similaridade de espécie pelo BLASTn (Altschul et al., 1990). Os dados obtidos permitiram a identificação das bactérias em nível de gênero, sendo os isolados 9, 11 e 12 pertencentes ao gênero *Agrobacterium* sp. e o isolado 13 ao gênero *Cohnella* sp. Todas as bactérias do gênero *Agrobacterium* sp., apresentaram maior grau de similaridade com a espécie *Agrobacterium fabrum*, enquanto o isolado do gênero *Cohnella* sp., apresentou maior grau de similaridade com a espécie *Cohnella phaseoli*. A Tabela 1 mostra o tamanho das sequências, a similaridade de espécie e a cobertura das sequências, dos 4 isolados que mais produziram EPS.

A presença do gênero *Agrobacterium* sp. no consócio retirado do solo pode ser explicada pela sua capacidade de degradar lignocelulose (Jindal, 2020; Xu et al., 2017; Zanini, 2016). No presente estudo, verificou-se uma alta produção de EPS pelas bactérias desse gênero assim como foi mostrado em estudos anteriores, que

relataram a capacidade desses isolados desse gênero em produzir EPS, destacando desta forma o potencial desses isolados para aplicação em biotecnologia (Xu et al., 2017).

Higashibara et al. (2016), usou as cepas NBRC 13126 e NBRC 13127 de *Agrobacterium* sp. cultivadas em meio com sacarose como fonte de carbono, por 15 dias. Em seu estudo, mesmo após os 15 dias de cultivo as cepas produziram no máximo 2,39 g/L (NBRC 13126) e 2,69 g/L (NBRC13127), contrastando negativamente com o presente estudo, no qual os isolados 9, 11 e 12 (todos *Agrobacterium* sp.) produziram respectivamente, 3,95 g/L, 2,64 g/L e 3,01 g/L, em apenas 7 dias de cultivo em meio com sacarose.

Stredansky et al. (1998), usou cepas de *Agrobacterium tumefaciens* cultivadas em meio YMB contendo sacarose como fonte de carbono também apresentou alta produção de EPS, atingindo 4,45 g/L de EPS em 96h. Esses dois experimentos citados demonstram a capacidade de produção de EPS em larga escala por bactérias do gênero *Agrobacterium* sp.

Bactérias do gênero *Cohnella* sp. são caracterizadas por possuírem alta capacidade de fixar nitrogênio atmosférico no solo (García-Fraile et al., 2008). A espécie *Cohnella phaseoli* é geralmente encontrada nos nódulos radiculares de uma planta específica conhecida como *Phaseolus coccineus* (feijão vermelho) com a qual se associa e permite a fixação de nitrogênio (García-Fraile et al., 2008). Além disso, encontrar esse gênero no consórcio, também pode estar relacionado com sua capacidade de degradar a biomassa lignocelulósica, principalmente a parede celular vegetal e lignina de alta polimerização tornando-as interessantes em função do seu potencial biotecnológico (Guerrero et al., 2015; Khianngam et al., 2012; Shiratori et al., 2010).

Ambos os gêneros também foram encontrados nos consórcios retirados de solos em outros trabalhos. Weiss et al. (2021) e et al. (2020) estudando por técnicas metagenômicas o mesmo consorcio degradador de biomassa vegetal observaram a presença de organismos desses gêneros bacterianos.

Isolado	Tamanho	Confidence Threshold	Blastn	Query Coverage	Identidade
9	1508	100%	<i>Agrobacterium fabrum</i>	99%	99.45%

	1508	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99%	99.10%
	1508	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98%	98.96%
	1508	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	97%	99.36%
	1508	100%	<i>Agrobacterium fabacearum</i>	99%	98.48%
	1508	100%	<i>Rhizobium pusense</i>	94%	99.56%
	1508	100%	<i>Agrobacterium leguminum</i>	95%	99.13%
	1508	100%	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	97%	98.17%
	1508	100%	<i>Agrobacterium rosae</i>	98%	97.78%
	1508	100%	<i>Agrobacterium rubi</i>	98%	97.29%
Isolado	Tamanho	Confidence Threshold	Blastn	Query Coverage	Identidade
11	1515	100%	<i>Agrobacterium fabrum</i>	99%	99.45%
	1515	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99%	99.10%
	1515	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98%	98.96%
	1515	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	97%	99.36%
	1515	100%	<i>Agrobacterium fabacearum</i>	99%	98.48%
	1515	100%	<i>Rhizobium pusense</i>	94%	99.57%
	1515	100%	<i>Agrobacterium leguminum</i>	95%	99.14%
	1515	100%	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	97%	98.18%
	1515	100%	<i>Agrobacterium rosae</i>	98%	97.78%
	1515	100%	<i>Agrobacterium rubi</i>	98%	97.30%
Isolado	Tamanho	Confidence Threshold	Blastn	Query Coverage	Identidade
12	1523	100%	<i>Agrobacterium fabrum</i>	98%	99.45%
	1523	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98%	99.10%
	1523	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	98%	98.96%
	1523	100%	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	97%	99.36%
	1523	100%	<i>Agrobacterium fabacearum</i>	98%	98.48%
	1523	100%	<i>Rhizobium pusense</i>	94%	99.57%
	1523	100%	<i>Agrobacterium leguminum</i>	95%	99.14%
	1523	100%	<i>Agrobacterium larrymoorei</i>	97%	98.17%
	1523	100%	<i>Agrobacterium rosae</i>	98%	97.78%
	1523	100%	<i>Agrobacterium rubi</i>	98%	97.30%
Isolado	Tamanho	Confidence Threshold	Blastn	Query Coverage	Identidade
13	1508	100%	<i>Cohnella phaseoli</i>	99%	99.33%
	1508	100%	<i>Cohnella luojiensis</i>	96%	96.76%
	1508	100%	<i>Cohnella endophytica</i>	96%	96.51%
	1508	100%	<i>Cohnella terricola</i>	94%	97.19%
	1508	100%	<i>Cohnella boryungensis</i>	95%	96.62%
	1508	100%	<i>Cohnella lupini</i>	97%	96.26%
	1508	100%	<i>Cohnella hongkongensis</i>	95%	96.53%
	1508	100%	<i>Cohnella cellulosilytica</i>	92%	97.20%
	1508	100%	<i>Cohnella abietis</i>	95%	96.00%
	1508	100%	<i>Cohnella collisoli</i>	95%	96.48%

Tabela 1. Similaridade da sequência do gene 16SrRNA dos isolados 9, 11, 12 e 13 com sequências depositadas no banco de dados Refseq.

No entanto, é importante destacar que a identificação desses isolados bacterianos por meio do sequenciamento de 16S rRNA é uma técnica que apresenta limitações, principalmente em relação à resolução taxonômica de espécie. Por isso,

é fundamental a realização de estudos complementares para confirmar a presença e a função dessas espécies em consórcios bacterianos e outros sistemas biológicos. Além disso, eles mostram a importância de complementar o sequenciamento de 16S rRNA com outras técnicas, como as análises funcionais, para obter uma compreensão mais completa da diversidade e função microbiana.

4.3 Produção de Celulose Bacteriana (CB)

Nas condições microbiológicas estudadas, verificou-se que apenas 2 dos 4 maiores produtores de EPS conseguiram sintetizar polímeros de celulose após 168 horas de cultivo estático. Esses dois produtores foram identificados como o isolado 9 (*Agrobacterium* sp.) e o isolado 13 (*Cohnella* sp.).

Ambos os isolados apresentaram um aumento na produção de celulose bacteriana conforme aumentava a concentração de células inoculadas no meio a (DO_{600} 0,1, 0,5 ou 1,0), com a maior média de produção ocorrendo em uma DO_{600} de 1. O isolado do gênero *Agrobacterium* sp. exibiu uma produção mais significativa de celulose bacteriana em comparação com o isolado de *Cohnella* sp. A Tabela 2 mostra os valores de produção de CB em cada uma das concentrações de células (DO) pelos isolados 9 e 13.

Isolados	Produção de Celulose Bacteriana (g/L)		
	DO_{600} 0,1	DO_{600} 0,5	DO_{600} 1,0
<i>Agrobacterium</i> sp.	1,394	1,552	1,852
<i>Cohnella</i> sp.	1,174	1,205	1,213

Tabela 2. Produção de celulose bacteriana pelos isolados de *Agrobacterium* sp. e *Cohnella* sp. nas DO_{600} 0,1, 0,5 e 1,0 após 168 h de cultivo.

De acordo com a literatura, médias de produção de CB ficam em torno de 1,7 g/L e essas produções são consideradas como rendimentos excelentes (Duarte et al., 2019). Em um estudo realizado por Jung et al. (2005), que cultivou *Acetobacter* sp., em meio contendo glicose como fonte de carbono, e oxigênio como aditivo,

atingiu-se um rendimento de 1,72 g/L de CB. Comparando esse dado, com os resultados obtidos nesse experimento pode-se afirmar que o rendimento de CB de 1,85 g/L, usando meio rico em glicose e frutose (fonte de carbono) e sem uso de aditivos, foi bem expressivo. Além disso não foi encontrado na literatura a dados sobre a produção de celulose por isolados do gênero *Cohnella*, pelo contrário, esse gênero se destaca pela capacidade de produção de celulase, xilanase e outras enzimas que hidrolisam a lignocelulose. A Figura 5 ilustra películas de celulose formadas nesse estudo.



Figura 5. Celulose produzida pelo isolado 9 na DO_{600} 1,0

Em estudos anteriores sobre produção de CB, que exibiram uma alta produção desse biomaterial, demonstrou que para cada gênero bacteriano há um meio ideal para sua produção (Matthysse et al., 1995; Sperotto et al., 2021). Portanto, o meio eleito para o presente estudo pode ainda ser adequadamente modificado no sentido de se aumentar a produção dessa molécula pelos isolados 9 e 13. Além disso, o uso conjunto da frutose e da glicose no meio HS do experimento, aliado à falta de aditivos poderia ter representado fatores limitantes para a produção de CB. Nesse contexto, são necessárias investigações futuras que envolvam a utilização de diferentes fontes

de carbono para que o consórcio possa alcançar uma produção mais significativa de CB. Por exemplo, o emprego de substâncias como glicerol e manitol, bem como a incorporação de aditivos, como o etanol, podem ser considerados, conforme destacado por Sperotto et al. (2021).

Em um estudo realizado por Son et al. (2001), verificou-se que o isolado A9 de *Acetobacter* sp., quando cultivado em meio contendo glicose e utilizando etanol como aditivo alcançou uma grande produção de celulose, atingindo 15,20 g/L de celulose. Resultados significativos também foram obtidos por Chao et al. (2000), que sintetizou 10,4 g/L por meio do cultivo de isolados *Acetobacter xylinus* usando frutose como fonte de carbono, e oxigênio como aditivo. Mohammadkazemi et al. (2015), demonstrou que o uso de manitol como fonte de carbono, sem o uso de aditivo, gerou uma produção de 1,85 g/L de CB, provando que o manitol pode ser uma alternativa de fonte de carbono viável em comparação com a glicose e frutose.

Outro fator que pode ter influenciado na produção de CB é o fato de o ensaio ter sido realizado em condições de cultivo estático. Alguns organismos produzem a CB preferencialmente em cultivo dinâmico ou com agitação, ou em biorreatores (Andriani et al., 2020; Berti et al., 2013; Czaja et al., 2004; Klemm et al., 2001.; Krystynowicz et al., 2002; Lu & Jiang, 2014; Recouvreux et al., 2011; Wang et al., 2019).

4.4 Avaliação da Ação Surfactante do EPS

O EPS é uma substância altamente recomendada para uso na biorremediação envolvendo emulsificação e degradação de hidrocarbonetos do petróleo e óleos vegetais residuais, justamente por possuir diversas propriedades físico-químicas importantes como alta tolerância a diversas situações de estresse envolvendo pH, salinidade, temperatura, além de ser renovável, sustentável e possuir alta biodegradabilidade (Abouseoud et al., 2008; Mnif e Ghribi, 2015).

A escolha do óleo diesel, hexano, gasolina, querosene e óleo vegetal residual para este estudo se deve ao fato de serem materiais que causam um significativo impacto ambiental em todo mundo (Meneghine et al., 2017). Baseando-se nisso e nas características emulsificantes do EPS, este estudo focou em avaliar

a capacidade emulsificante dos EPSs dos isolados 9, 11, 12 e 13, que foram os maiores produtores desse biopolímero. As taxas de emulsificação do EPS frente aos diferentes compostos estão descritas na Figura 6. Foi possível verificar que o EPS do isolado 9 (*Agrobacterium* sp.) apresentou baixas taxas de emulsificação para o óleo diesel e para o querosene, não ultrapassando 20% em ambos os períodos estudados. No caso da gasolina, o EPS do isolado 9 apresentou taxas de emulsificação acima de 40% em 24 h e 168 h, enquanto para o hexano as taxas de emulsificação ultrapassaram os 55% em ambos os tempos. A melhor taxa de emulsificação do EPS do isolado 9 foi para o óleo vegetal residual, que atingiu 69,34% no período de 168 h.

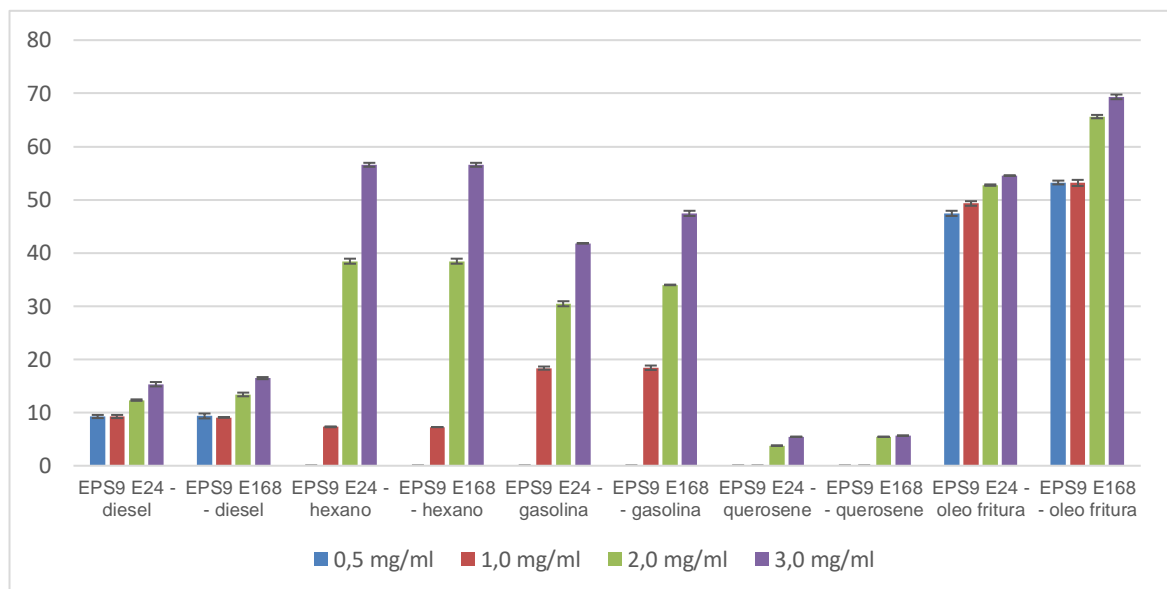


Figura 6. Taxas de emulsificação pelo EPS do isolado 9 (EPS9) nos períodos de 24 h e 168 h (E24 e E168), usando soluções contendo diferentes concentrações de EPS

O EPS do isolado 11 (*Agrobacterium* sp.) também apresentou baixas taxas de emulsificação para o óleo diesel, querosene e hexano após 24 h de experimento, não ultrapassando 20% (Figura 7). Porém no período de 168 h, consegui obter média acima de 30% para o querosene, e acima de 25% para o hexano, não havendo alteração significativa para o diesel. O EPS do isolado 11 apresentou taxas de emulsificação melhores para a gasolina e para o óleo vegetal residual, ultrapassando os 60% na gasolina em ambos os períodos estudados e ultrapassando os 70% no

óleo vegetal residual no período de 168 h. Além disso, nas soluções com concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL avaliadas na gasolina, o EPS 11 apresentou valores acima de 50% em ambos os períodos.

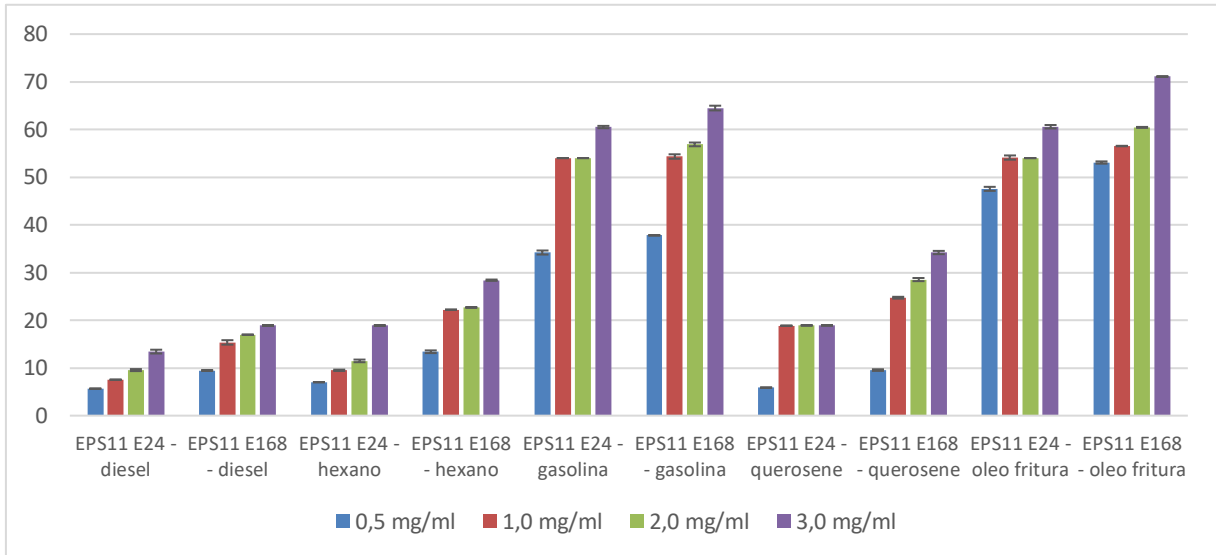


Figura 7. Taxas de emulsificação pelo EPS do isolado 11 (EPS11) nos períodos de 24 h e 168 h (E24 e E168), usando soluções contendo diferentes concentrações de EPS

O EPS do isolado 12 (*Agrobacterium* sp.), assim como os demais citados anteriormente, também apresentou taxas de emulsificação menores do que 20% para o óleo diesel em ambos os períodos (Figura 8). No caso do querosene, as taxas de emulsificação do EPS do isolado 12 não ultrapassaram os 35% em ambos os períodos. Suas melhores taxas de emulsificação foram para o hexano, a gasolina e óleo vegetal residual. Nos períodos de 24 h e 168 h, em concentração de 3 mg/ml de EPS as taxas de emulsificação para o hexano foram de 51% e 57% e para a gasolina 60% e 64%, respectivamente nos dois períodos. Além disso, o EPS do isolado 12 apresentou valores de emulsificação para a gasolina acima de 55% na concentração de 2 mg/mL. O destaque para o EPS do isolado 12 foi nos ensaios com o óleo vegetal residual que atingiu taxas de 70% em 24 h e de 77% em 168 h.

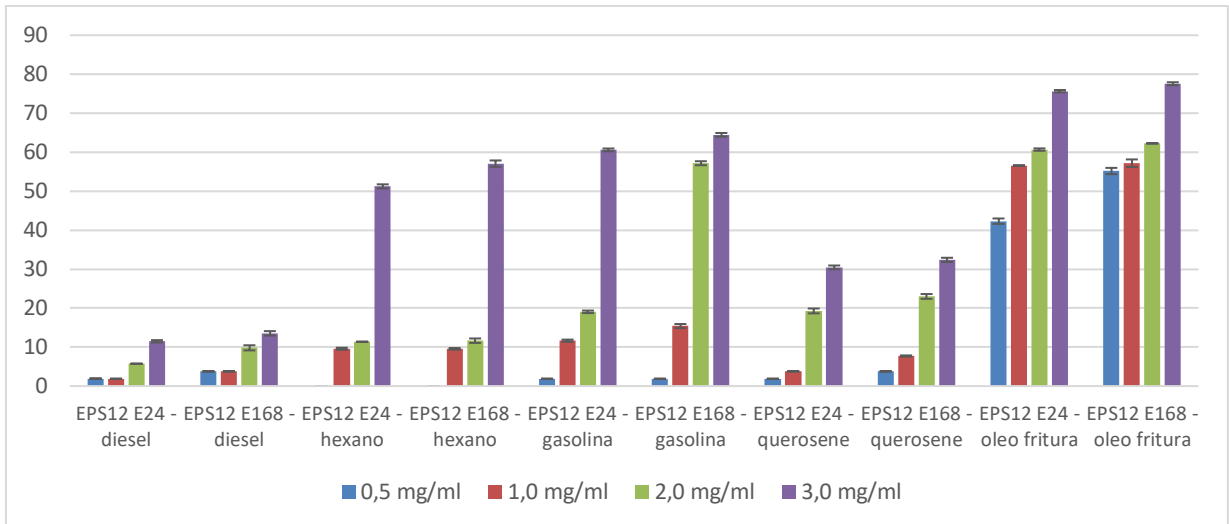


Figura 8. Taxas de emulsificação pelo EPS do isolado 12 (EPS12) nos períodos de 24 h e 168 h (E24 e E168), usando soluções contendo diferentes concentrações de EPS

A Figura 9 mostra que as taxas de emulsificação para o EPS 13 (*Cohnella* sp.) foram baixas para o querosene e o hexano, não ultrapassando 20% em ambos os períodos estudados. Para o óleo diesel, a taxa de emulsificação foi superior a 30% no período de 168 h e inferior a esse valor em 24 h. Os ensaios com a gasolina apresentaram valores acima de 40% em 24 h e 168 h. Novamente o destaque foi na emulsificação do óleo vegetal residual, que apresentou valor 78% em 168 h.

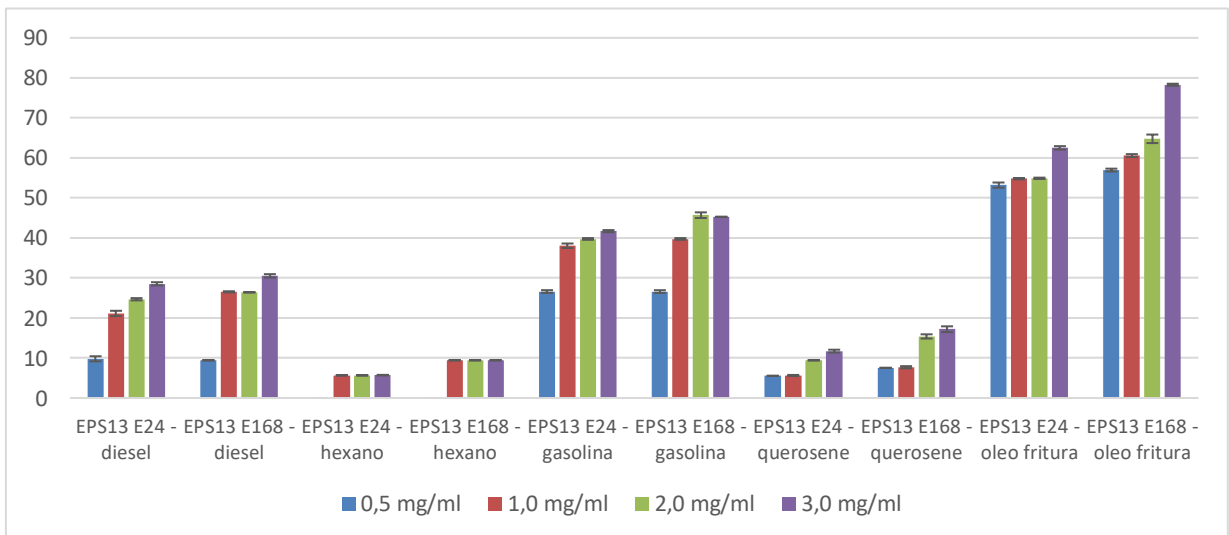


Figura 9. Taxas de emulsificação pelo EPS do isolado 13 (EPS13) nos períodos de 24 h e 168 h (E24 e E168), usando soluções contendo diferentes concentrações de EPS

Em todas as análises realizadas, verificou-se que quanto maior a concentração da solução de EPS, maior foi a taxa de emulsificação, portanto, as soluções com 3,0 mg/mL foram as que apresentaram valores mais elevados de emulsificação do que as demais

Os resultados mais destacados das taxas de emulsificação foram observados para os testes com óleo vegetal residual, que apresentaram taxas de emulsificação maiores do que 70% para os EPSs 11, 12 e 13 no período de 168 h, e no EPS 12 no período de 24 h. Além disso, as taxas de emulsificação usando 2mg/mL de EPS sempre foram maiores do que 50%. Além disso, as emulsões do presente estudo apresentaram maior estabilidade, tendo em vista que as taxas de emulsificação do período de E24 para E168 aumentaram. Esses resultados de estabilidade de emulsões foram contrastantes com os obtidos por Meneghine (2017), uma vez que suas amostras apresentaram diminuição no índice de emulsificação no decorrer do seu experimento, também avaliadas em 24 e 168 horas.

A baixa taxa de emulsificação do óleo diesel e do querosene pode ser explicada pela sua maior hidrofobicidade em comparação ao hexano e a gasolina, devido ao tamanho maior de suas cadeias de hidrocarbonetos e, conseqüentemente uma parcela apolar (hidrofóbica) substancialmente maior, isso dificulta o processo de emulsificação (Garcia, 2019).

4.5. Análise do EPS por HPLC e FTIR

Em geral, o EPS pode ser dividido em duas macrocategorias dependendo da composição da cadeia sacarídica: heteropolissacarídeos e homopolissacarídeos. De acordo com a Tabela 3, observa-se que todos os quatro isolados foram capazes de produzir EPS contendo glicose, manose, galactose, ramnose, e ácido galacturônico como açúcares principais. Portanto, todos os EPS são heteropolissacarídeos que consistem em mais que duas porções de açúcar em uma cadeia ramificada com resíduos não-carboidratos em sua composição (Figura 10), incluindo grupos carregados, que foram sintetizados dentro da célula e depois transportados para fora da célula.

Dentre os açúcares identificados, a glicose e a galactose são os mais abundantes, conforme também demonstrado no estudo de Zhou et al. (2021). A glicose corresponde a aproximadamente 85% da totalidade de açúcares encontrados, enquanto a galactose representa em média 12% para os isolados 9, 11 e 12, classificados como pertencentes ao gênero *Agrobacterium*. As moléculas de EPS desses isolados apresentaram quantidades pequenas de manose, ramnose e ácido galacturônico. Porém, é possível verificar que o teor de glicose e galactose no isolado 13 (*Cohnella*) se mostrou diferente, diminuindo a glicose para 75% e aumentando a galactose para 18%. Além disso, a manose no EPS 13 é 5 vezes maior que dos outros EPS.

EPS	% Manose	% Ramnose	% Acido Galacturônico	% Glicose	% Galactose
Isolado 9	1,0	0,8	0,3	86,8	11,2
Isolado 11	1,1	0,9	0,3	85,7	12,1
Isolado 12	1,1	1,2	0,3	84,0	13,5
Isolado 13	4,8	1,3	0,2	74,8	18,9

Tabela 3. Porcentagem dos monossacarídeos encontrados no EPS produzido pelos isolados 9, 11, 12 e 13.

Já foi evidenciado que a composição de açúcares dos EPSs formados depende fortemente da bactéria estudada, assim como, a ligação dos monômeros, a proporção da unidade repetida e o grau de polimerização, bem como a presença de grupos que não são carboidratos (Skorupska et al., 2006). Em um estudo anterior Castellane et al. (2015), demonstrou que bactérias da família Rhizobiaceae produzem EPS compostos principalmente por D-glicose e D-galactose. *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. são heteropolissacarídeos ácidos compostos principalmente por Glicose e Galactose em proporção molar de 4:1 e 5:1. Resíduos de manose, fucose e ramnose podem ser encontradas em diferentes espécies desse gênero bacteriano (Monteiro et al., 2012, Kaci et al., 2005; Gharzouli et al., 2013), esses açúcares são conhecidos como açúcares raros.

Açúcares raros são monossacarídeos que não são abundantes na natureza, como a D-glicose, D-galactose, D-frutose, D-xilose, D-ribose e L-arabinose. Monossacarídeos que não são frequentemente encontrados, chamados raros, apresentam muitas propriedades interessantes, tornando-os atraentes para vários campos de aplicações. Nos resultados apresentados nesse estudo observou-se a presença de aumento da manose no EPS do isolado 13, classificado como pertencente ao gênero *Cohnella* o qual tem poucos estudos sobre esse grupo molecular. Além disso, as propriedades físicas e químicas dos polímeros determinam suas aplicações potenciais como espessantes, produtores de filmes, estabilizadores de emulsões, floculantes ou materiais para nano/micropartículas, e suportes para engenharia de tecidos, entre outros (Roca et al, 2015).

A análise do espectro FITIR dos ESP produzidos pelos isolados 9,11, 12 e 13, estão descritos na Figura 10. Essa figura mostra a imagem dos espectros compilados e alinhados verticalmente. Em uma primeira avaliação pode-se destacar a grande similaridade entre os EPS dos isolados sem se conseguir diferenciar nenhuma propriedade entre as amostras. Não existem grupos especiais como o acetato que possa ser observado, os grupamentos sugerem a presença de apenas carboidratos. A comparação com os espectros descritos na literatura mostra a presença de bandas de absorção características na região de 3.400 cm^{-1} , consideradas como resultados da vibração de estiramento dos grupos hidroxila do polissacarídeo. As bandas na região de 2.918 cm^{-1} representam a vibração de estiramento C–H dos grupos metil e metileno ($-\text{CH}_2-$), geralmente presentes monossacarídeos como glicose, galactose ou ramnose. Na região de 1642 cm^{-1} observa-se marcação que pode corresponder a vibrações de estiramento de grupos carbonila (C=O) em grupos amida CONH ou também pode ser interpretada como vibrações de estiramento de anel de galactose e manose. Na região de 1402 cm^{-1} estão relacionados ao grupo C–O–C da estrutura das glicopiranoses. O pico de absorção em 1038 cm^{-1} é designado para demonstrar a presença de C–O–H, C–O–C e C–O, inferindo polissacarídeos na amostra.

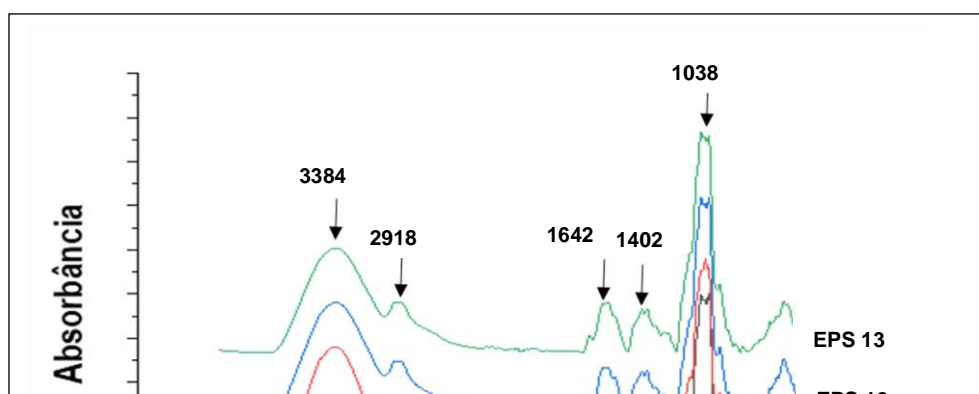


Figura 10. Espectro FTIR do EPS liofilizado produzido pelos isolados 9,11, 12 e 13 registrados na região 4000–400 cm^{-1}

4.6. Avaliação da Resistência dos Isolados a Metais Potencialmente Tóxicos

Apenas as agrobactérias e *Cohnella* sp. foram testados nesse experimento (isolado 9, 11, 12 e 13). Esses 4 isolados foram cultivados em meio contendo os íons metálicos Cr^{6+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} em diferentes concentrações. A Tabela 4 mostra a concentração máxima de MTP na qual os isolados 9, 11, 12 e 13 conseguiram desenvolver colônias viáveis e semelhantes ao tratamento controle.

MTP	Máxima concentração de MTP (mM)			
	Isolado 9	Isolado 11	Isolado 12	Isolado 13
Cr^{6+}	0,25	0,25	0,25	0,25
Cr^{3+}	5,00	2,00	2,00	5,00
Ni^{2+}	2,00	2,00	2,00	1,00
Cd^{2+}	7,00	3,00	3,00	3,00
Hg^{2+}	0,25	0,25	0,25	0,25
Pb^{2+}	5,00	5,00	5,00	5,00
Cu^{2+}	2,00	2,00	1,50	1,50

Zn ²⁺	10,00	7,00	7,00	7,00
------------------	-------	------	------	------

Tabela 4. Concentração máxima (mM) de cada MTP adicionados aos meios de cultivo nas quais os isolados 9, 11, 12 e 13 conseguiram se desenvolver.

A partir das análises feitas, é possível afirmar que o isolado 9 foi o destaque do experimento, uma vez que conseguiu desenvolver colônias nas concentrações mais altas de Cr³⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺ e Ni²⁺.

Apesar dos metais serem essenciais para o desenvolvimento das bactérias e funcionamento correto do seu metabolismo, quando estão presentes em concentrações elevadas podem afetar o crescimento celular e a síntese de ácidos nucléicos (Ogawa et al., 1989).

Nesse experimento as bactérias do gênero *Agrobacterium* sp. apresentam grande resistência a diversos metais potencialmente tóxicos. Rubio-Sanz et al. (2013) demonstrou que bactérias da espécie *Agrobacterium tumefaciens* possuem um sistema de genes chamado de dmeRF, no qual estão presentes clusters que atuam como mecanismo de tolerância aos íons Co²⁺ e Ni²⁺.

Fu et al. (2010) demonstrou que cepas da espécie *Agrobacterium tumefaciens* que possuíam genes de resistência ao cobre, puderam atuar de maneira indireta na biorremediação e na resistência aos metais potencialmente tóxicos. Através de um método de transformação por essa agrobactéria, a planta *Trichoderma reesei*, adquiriu os genes de resistência ao cobre, causando uma remoção de até 12 mg de Cu/ g de biomassa, o que equivale a até 92% de remoção desse metal.

Além desse estudo, outros também provaram a eficácia da transferência de plasmídeos de *Agrobacterium* sp. como forma de transferência de genes de resistência a metais potencialmente tóxico para outras plantas. Dessa forma atua de maneira indireta na biorremediação de solos, e na melhora no cultivo de plantas para a agronomia, que passam a suportar solos com estresses causados por MTP (Handel et al., 1997).

Uma possível explicação para a baixa resistência ao mercúrio pelos isolados avaliados nesse experimento, tem relação com a sua baixa exposição a ambientes contendo mercúrio. Bactérias resistentes a grandes concentrações de mercúrio,

tendem a desenvolver mecanismos de resistência mais eficientes, uma vez que essa resistência é diretamente proporcional ao nível de contaminação do ambiente (Dash e Das, 2012). O gene de resistência para o mercúrio contém o operon *merA*, *merB*, *merC*, *merD*, *merF*, *merP* e *merT*. Esse sistema pode atuar de diversas formas, como mecanismos de efluxo, conversão do mercúrio para formas menos tóxicas, captação de mercúrio do citoplasma e transporte de mercúrio (Sone et al., 2010)

A baixa resistência ao Cr^{6+} e maior ao Cr^{3+} pelos isolados do presente estudo se deve ao fato de essa ser uma forma extremamente tóxica do íon cromo, diferente do Cr^{3+} . Geralmente um mecanismo de resistência ao Cr^{6+} é justamente a conversão desse íon para sua forma menos tóxica o Cr^{3+} (Viti et al., 2014).

A maior resistência dos isolados ao íon zinco pode se explicada pela presença dos transportadores *ZnuA*, *ZnuB* e *ZnuC* responsáveis pelo transporte desse íon pela célula bacteriana, ou pela presença do gene transportador *zupT*. A presença desse mesmo gene pode explicar a alta resistência do isolado 9 de *Agrobacterium* ao cádmio (Suryawati, 2018; Ge e Ge, 2016).

Não foi encontrado nada na literatura sobre a resistência de *Cohnella* sp. a metais potencialmente tóxicos.

5. CONCLUSÕES

Os isolados 9 e 13 classificados como *Agrobacterium* sp. e *Cohnella* sp., respectivamente, apresentaram produção significativa de celulose bacteriana, demonstrando potencial para uso e produção desse polímero em diversas aplicações biotecnológicas.

Os mesmos isolados também, foram os maiores produtores de EPS, evidenciando seu potencial para produção em escala industrial e aplicações biotecnológicas.

Como foi verificado, as taxas de emulsificação foram bem elevadas para o óleo vegetal residual, sendo esse o grande destaque e diferencial desse estudo. Além disso, o EPS também apresentou elevado potencial emulsificador para a gasolina e para o hexano em concentrações acima de 1 mg/ml, provando a potencialidade de uso desse bioemulsificador para essas três substâncias no meio ambiente.

As propriedades emulsificantes dos EPSs desses isolados mostraram-se altamente recomendadas para a utilização na biorremediação, envolvendo degradação e emulsificação de hidrocarbonetos do petróleo, como a gasolina e o hexano, além de óleos vegetais residuais. Sua alta capacidade surfactante aliada à sua alta biodegradabilidade e ótima estabilidade de emulsões possibilita a redução dos impactos prejudiciais causados por essas substâncias no meio ambiente, por meio da ação de sua biodegradação e emulsificação.

A capacidade de resistência a metais potencialmente tóxicos demonstrada principalmente pelo isolado 9, classificado dentro do gênero *Agrobacterium* sp., frente a maioria dos íons metálicos testados, em concentrações de até 10mM/L, comprova seu potencial como possível agente de biorremediação em ambientes contaminados com MPT como por exemplo águas residuárias. Por outro lado, o isolado 13, apesar de ter resistência ligeiramente inferior ao isolado 9, é classificado como pertencente ao gênero *Cohnella*, o qual não foi descrito até o momento como possuidor de organismos que apresentem resistência a metais.

Estudos adicionais referentes à composição da celulose, suas características e aplicações biotecnológicas podem ser realizados em futuras investigações, a fim de complementar os dados obtidos neste trabalho e aumentar a produção do polímero. Do mesmo modo a produção e o uso tecnológico do EPS sintetizado pelos isolados em estudo, assim como sua aplicação em ensaios de biorremediação necessitam de estudos posteriores e mais específicos da área.

6. REFERÊNCIAS

Abena, M., Li, T., & Shah, MN. (2019). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation.. **Chemosphere**, 234, 864-874.

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabi, A. (2008) Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, 223, 143-151.

Akinbowale, O.L.; Peng, H.; Grant, P.; Barton, M.D. (2007) Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout

(*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 30, 177-182.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, 403-410.

Amruta, P. (2022a). Biosparging - In Situ Bioremediation Technique. PREPP. <https://prepp.in/news/e-492-biosparging-in-situ-bioremediation-technique-environmentnotes>

Amruta, P. (2022b). Bioventing - In Situ Bioremediation Technique - Environment Notes. PREPP. <https://prepp.in/news/e-492-bioventing-in-situ-bioremediation-techniqueenvironmentnotes#Concept>.

Amruta, P. (2022c). Ex Situ Bioremediation Techniques. PREPP. <https://prepp.in/news/e-492-ex-situ-bioremediation-techniques-environment-notes>

Andrade, J. A.; Augusto, F.; Jardim, I. C. S. F. (2010). Biorremediação de Solos contaminados por Petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, Marília, 35, 17-43.

Andreoli, C. V.; Von Sperling, M. Fernandes, F. (2001) Lodo de esgotos: tratamento e disposição final. DESA/UFMG. COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ, 484 p.

Andriani, D., Apriyana, A.Y., Karina, M. (2020) Optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review. . **Cellulose**, 27, 6747–6766.

Banat, I.M. et al. (2010). Production, applications and future potential of microbial biosurfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 87, 427–444.

Barros, C. A.; Lemos, J. L. S. (2006). Estudo da degradação de petróleo em solo areno-argiloso com bioaumento fúngico utilizando casca de coco como material estruturante. Monografia (Licenciatura em Química)- Graduação em Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Becarelli, S., Siracusa, G., Chicca, I., Bernabei, G., & Gregorio, S. (2021). Ascomycetes versus Spent Mushroom Substrate in Mycoremediation of Dredged Sediments Contaminated by Total Petroleum Hydrocarbons: The Involvement of the Bacterial Metabolism. **Water**, 13, 1– 19.

Berti, F.V., Rambo, C.R., Dias, P.F., Porto, L.M. (2013). Nanofiber density determines the behavior of endothelial cells in the hydrogel matrix. **Materials Science and Engineering: C**, 33, 4684–4691.

Boukhelata, N., Taguett, F. e Kaci, Y. (2019). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a Saharan bacterium *Paenibacillus tarimensis* REG 0201M. **Anal. Microbiol.**, 69, 93–106.

Bornhorst, J., Kipp, A.P., Haase, H., Meyer, S., Schwerdtle, T., (2018). The crux of inept biomarkers for risks and benefits of trace elements. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 104, 183–190.

Branco, R., Chung, A.P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P., Zhitkovich, A., (2008). The ChromateInducible chrBACF Operon from the Transposable Element TnOtChr Confers Resistance to Chromium(VI) and Superoxide. **Journal of Bacteriology**, 190, 6996–7003.

Bruins, M. R.; Kapil, S.; Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicology and environmental safety**, 45, 198-207.

Bravo, G.B.G. (2018). **Resistência aos metais cobre, chumbo, cromo e zinco em bactérias gram-positivas isoladas de ambiente aquático**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Londrina.

Bueno, S. M. (2008). **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. Tese (Doutorado Engenharia e Ciência de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto

Bueno, S. M.; Silva A. N.; Garcia-Cruz, C. H. (2010). Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. **Química Nova**, 33, 1572-1577.

Campanharo, J.C. (2006). **Produção e avaliação de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios**. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP.

Carvalho, W. et al., (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, 32, 2191-2195.

Castellane, T.C.L., Persona, M.R., Campanharo, J.C., Lemos, E.G.M. (2015). Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 74, 515–522.

Castellane, T. C. L. et al. (2017). Characterization of new exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, 96, 361–369.

Duarte et al., (2019). Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações (2019).In: Embrapa Agroindustrial Tropical-documento 186), 35. Fortaleza: EMBRAPA.

- Chao, Y.; Ishida, T.; Sugano, Y.; Shoda, M. (2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal loop airlift reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, 68, 345-352.
- Chen, X., Siu, K.C., Cheung, Y.C., Wu, J.Y. (2014). Structure and properties of a(1-3)- β -D-glucan from ultrasound-degraded dexopolysaccharides of a medicinal fungus. **Carbohydrate Polymers**, 106, 270–275.
- Cho EA, Lee JS, Lee KC, Jung HC, Pan JG, Pyun YR (2007) *Cohnella laeviribosi* sp. November, isolated from a volcanic lagoon. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57, 2902–2907
- Colla, L. M.; Rizzardi, J.; Pinto, M. H.; Reinehr, C. O.; Bertolin, T. E.; Costa, J. A. V. (2010). Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid state bioprocess. **Bioresource Technology**, 101, 8308-8314.
- Constância M. T. L, Sacco, L. P, Campanharo, J C., Castellane, T C. L., Souza, A. C. O., Weiss, B., Varani, A. M., Alves, L. M. C. (2020). Exploring the potential of two bacterial consortia to degrade cellulosic biomass for biotechnological applications. **Current Microbiology**, 77, 1-11.
- Cooper, D.G. & Goldenberg, B.G. (1987). Surface-active agents from two bacillus species. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, 53, 224-229.
- Costa, L.; Dellamatrice P. M.; Sousa M. V.; Silva, G. M. M. (2010). Biorremediação de uma área contaminada com o inseticida metamidofós por *Corynebacterium* sp. **Conexão Ciência e Tecnologia**, 4, 17-23.
- Cristaldi, A., Conti, G.O., Jho, E.H., Zuccarello, P., Grasso, A., Copat, C., Ferrante, M., (2017). Phytoremediation of contaminated soils by heavy metals and PAHs. A brief review. **Environmental Technology Innovation**, 8, 309–326.
- Cunha, M.A.A., Turmina, J.A., Ivanov, R.C., Barroso, R.R., Marques, P.T., Fonseca, E.A., Fortes, Z.B., Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M. (2012). Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)- β -D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 39, 1179–1188.
- Czaja, W., Romanovicz, D., Brown, R.M. (2004). Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, 11, 403–411.
- Dash, H.R. e Das, S. (2012). Mercury bioremediation and the importance of bacterial mer genes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 75, 207-213.
- Donini, I. A. N., Salvi, D.T.B., Fukumoto, F.K., Lustri, W. R., Barud, H.S., Marchetto, R., Messaddeq, Y., Ribeiro, S.J.L. (2010). Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, 35, 165 – 178.

Donot, F., Fontana, A., Baccou, A.J., Schorr-Galindo, S, (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrates Polymers**, 87, 951-962.

Dourado, F.; Leal, M.; Martins, D.; Fontao, A.; Rodrigues, AC.; Gama, M. (2016). Celluloses as Food Ingredients/Additives: Is There a Room for BNC. In: GAMA, M.; DOURADO, F.; BIELECKI, S. (Ed). *Bacterial Nanocellulose: from Biotechnology to Bio-Economy*. Cambridge: **Elsevier**, 142-151.

Elizalde-Díaz, J.P., Hernández-Lucas, I., Medina-Aparicio, L., Dávalos, A., Leija, A., AlvaradoAffantranger, X., García-García, J.D., Hernández, G., Garcia-de los Santos, A., (2019). *Rhizobium tropici* CIAT 899 copA gene plays a fundamental role in copper tolerance in both free life and symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **Microbiology**, 165, 651–661.

Esa, F., Tasirin, S.M., Rahman, N.A. (2014) Overview of bacterial cellulose production and application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 2, 113–119.

Ewing, B., Green, P. (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, 8, 186-1.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M., Green, P. (1998). Base calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, 8, 175-185.

Fashola, M., Ngole-Jeme, V., Babalola, O., (2016b). Heavy Metal Pollution from Gold Mines: Environmental Effects and Bacterial Strategies for Resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 13, 1047.

Fernandes, I. A. A. (2019). **Desenvolvimento de biofilme de celulose bacteriana enriquecido com compostos bioativos de origem vegetal e colágeno hidrolisado** - Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Ferreira, P.A.A., Bomfeti, C.A., Júnior, R.S., Soares, B.L., Soares, C.R.F.S., Moreira, F.M.S., (2012). Eficiência simbiótica de estirpes de *Cupriavidus necator* tolerantes a zinco, cádmio, cobre e chumbo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 47, 85-95.

Fontes, G. C.; Amaral, P. F. F.; Coelho, M. A. Z. (2008). Produção de Biossurfactantes por levedura. **Química Nova**, 31, 2091-2099.

Francisco, B. (2017). Impacto da dextrana sobre os indicadores industriais. <https://pt.linkedin.com/pulse/impacto-da-dextrana-sobre-os-indicadores-industriais-bruno-francisco>. Acessado em 18 de agosto de 2023.

Freitas, G.S. & Dathein, R. (2013). As energias renováveis no Brasil: uma avaliação acerca das implicações para o desenvolvimento socioeconômico e ambiental. **Nexos Econômicos**, 7, 71-94.

- Freitas, L. S., Mühlen, C. V., Bortoluzzi, J. H., Zini, C. A., Fortuny, M., Dariva, C., Coutinho, R. C. C., Santos, A. F., Caramão, E. B. (2009). Analysis of organic compounds of water-in-crude oil emulsions separated by microwave heating using comprehensive two-dimensional gas chromatography and time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography: A**, 1216, 2860-2865.
- Fu, D.; O'Neill, R. A. (1995). Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high - performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, 227, 377-384.
- Fu, K., Liu, L., Fan, L. *et al.* (2010). Copper accumulation in *Trichoderma reesei* transformants constructed with the modified *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation technique . **Biotechnology Letters**, 32, 1815–1820 (2010).
- Gadd, G. M. (2009). Heavy metal pollutants: environmental and biotechnological aspects. **Applied Microbiology**, 321 – 334.
- Gao, M., Li, J., Bao, Z. *et al.* (2019). A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism. **Nature Communications**, 10, 437.
- Garcia, M.R.D. (2019). **Hidrocarbonetos nos manguezais do complexo estuarino de Paranaguá** - Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná- Paraná.
- García-Fraile, P., Velázquez, E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rivas R. (2008). *Cohnella phaseoli sp. nov., isolated from root nodules of Phaseolus coccineus in Spain, and corrected the description of the genus Cohnella sp.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 58, 1855– 1859.
- Ge, S., Ge, S.C., (2016). Simultaneous Cr(VI) reduction and Zn(II) biosorption by *Stenotrophomonas sp.* and constitutive expression of related genes. **Biotechnology Letters**, 38, 877–884.
- Gharzouli R, Carpéné MA, Couderc F, Benguedouar A, Poinot V. (2013). Relevance of fucose-rich extracellular polysaccharides produced by rhizobium *sullae* strains nodulating *Hedysarum coronarium* L. legumes. **Applied Environmental Microbiology**, 79, 1764-76.
- Giaveno MA, Urbietta MS, Donati E. (2011). Mechanisms of bioleaching: basic understanding and possible industrial applications. In: Sobral LGS, Oliveira DM, Souza CEG. Biohydrometallurgical processes: a practical approach. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 27-38.
- Giner-Lamia, J., López-Maury, L., Florencio, F.J., (2015). CopM is a novel copper-binding protein involved in copper resistance in *Synechocystis sp.* PCC 6803. **Microbiology Open**, 4, 167–185.

Gkorezis, P., Daghighi, M., Franzetti, A., Hamme, J. D. van, Sillen, W., & Vangronsveld, J. (2016). The Interaction between Plants and Bacteria in the Remediation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. **Frontiers in Microbiology**, 1–16.

Gordon, D. (2003). Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed, In: A.D. Baxevanis, and D.B. Davison, D.B. (2004) (Eds) Current Protocols in Bioinformatics. New York, Chapter 11.

González, C.H. (2019). **Produção de exopolissacarídeos por rizóbios em meios de cultivo com produtos lácteos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande (UFRG)- Rio Grande do Sul.

Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L. *et al.* (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microbial Cell Factories**, 15, 203.

Granja-Travez, R.S., Bugg, T.D.H., 2018. Characterization of multicopper oxidase CopA from *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Involvement in bacterial lignin oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 660, 97–107.

Guerrero, E.B., Arneodo, J., Campanha, R.B., Oliveira, P. A., Labate, M.T.V., Cataldi, T.R., Campos, E., Cataldi, A., Labate, C.A., Rodrigues, C.M., Talia, P.(2015).) Prospection and evaluation of (Hemi) cellulolytic enzymes using untreated and pre-treated biomasses in two native Argentine termites. **Plos One**, 10.

IPEA. Economia circular: comunidade amazônica dá exemplo de sustentabilidade socioambiental, 2021. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br/cts/pt/central-de-conteudo/noticias/noticias/289-economia-circular-comunidade-amazonica-da-exemplo-de-sustentabilidade-socioambiental>> . Acesso em 25 de outubro de 2023.

Guo, Y., Rene, E. R., & Wang, J. (2020). Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons and influence of environmental factors during co-composting of sewage sludge and green forestry waste. **Bioresource Technology**, 297, 1224-1234.

Halttunen, T.; Salminen, S.; Tahvonen, R. (2007) Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 114, 30-35.

Handel, C.L.; Wagner, C.M.; Milach, S.C.H.; Federizzi, L.C. (1997). Transformação genética de cereais via *Agrobacterium tumefaciens*. **Ciência Rural**. Santa Maria, 27, 359-365.

Harding, N. E., Cleary, J. M., Ielpi, L. (1995). Genetics and Biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In Hui, Y. H. Khachatourians, G. G. (Eds) **Food biotechnology: microorganisms**, 495-514.

Hassen, A.; Saidi, N.; Cherif, M.; Boudabous, A. (1998). Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. **Bioresource Technology**, 65, 73-82.

Henne, Kristene, L., Nakatsu, C.H., Thompson, D.K., Konopka, A.E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes, **BMC Microbiology**, 9, 199.

Hestrin, S.; Schramm, M. (1954). Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochemistry Journal**, 58, 345-352

Herzberg, M., Bauer, L., Kirsten, A., Nies, D.H., (2016). Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. **Metallomics**, 8, 313–326.

Higashibara et al., (2016). Produção de exopolissacarídeos por *Agrobacterium*. **6° COSIMP- Cascável, Paraná, Brasil**. Universidad de Sevilla.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994) Bergey's manual of determinative bacteriology. In: Baltimore. Williams & Wilkinsed. 7 th edn., pp 288-292.

Huang, Y.; Zhu, C.; Yang, J.; Nie, Y.; Chen, C. & Sun, D. (2014). Recent Advances in Bacterial Cellulose. **Cellulose**, 1-30.

Inui-Kishi, R. N., Kihisi, T.L., Picchi, S. C., Barbosa, J. C., Lemos, M. T. O., Marcondes, J., Lemos, E. G. M. (2012). Phosphorus solubilizing and ia production activities in plant growth promoting rhizobacteria from brazilian soils under sugarcane cultivation. **ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences**, 7, 1446-1454.

Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew B.B, Beeregowda, K.N. (2014). Toxicity: mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, 7, 60–72.

Jang, S. Mo; Hart, P. (2015). Sol. Polarized frames on “climate change” and “global warming” across countries and states: evidence from twitter big data. **Global Environmental Change**, 32, 11-17.

Jindal, N., Khattar, J. S. & Singh, D. P. (2020). In: Springer (edn) Polysaccharides of Microbial Origin: Biomedical Applications, 1st edn. pp 1–14.
Jung, J. Y.; Park, J. K.; Chang, H. N. (2005). Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. **Enzyme Microbiology Technology**, 37, 347-354.

Kaci Y, Heyraud A, Barakat M, Heulin T. (2005). Isolation and identification of an EPS producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology** , 156, 522-31.

- Kalogerakis, N.; Psillakis, E.; Alvarez, P. (2005). Mill effluent treatment: Part I. Degradation of organic matter by chemical and biological processes: an overview. **Environment International**, 31, 95-289.
- Kämpfer P, Glaeser SP, Busse HJ (2017). *Cohnella lubricans* sp. nov., isolated from a coolant and lubricant solution. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 67, 466–471
- Kämpfer, P.; Rosselló-Mora, R.; Falsen, E., Busse, H.J.; Tindall, B.J. (2006). *Cohnella thermotolerans* gen. nov., sp. nov., and classification of “*Paenibacillus hongkongensis*” as *Cohnella hongkongensis* sp. Nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 56, 781-786.
- Kanissery, R. G.; Sims, G. K. (2011). Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. **Applied and Environmental Soil Science**, 10.
- Kaur, J., Mudgal, G., Chand, K. et al. (2022). A new exopolysaccharide-producing *Agrobacterium pusense* strain JAS1 isolated from snake plant improves plant growth and soil water retention. **Scientific Reports**, 12 , 213-230.
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E., Kamaraj, M., & Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. **Journal of Chemistry**, 2021, 2–13.
- Kerstens, K. & De Ley, J. Genus III (1984). *Agrobacterium* Conn 1942. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Ed.) **Bergey's manual of systemic bacteriology**, 5 th edn., 244-254.
- Khianggam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K.K., Lee, K.C., Lee, J. (2012). *Cohnella cellulolytica* sp. nov., isolated from buffalo feces. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, 62, 1921 – 1925
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., Marsch, S. (2001). Cellulose synthesized by bacteria - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, 26, 1561–1603.
- Koller, M. (2018). A Review on Established and Emerging Fermentation Schemes for Microbial Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters. **Fermentation**, 4,1-30.
- Kono, H. et al. (2017). NMR spectroscopic structural characterization of a water-soluble β -(1→3, 1→6) – glucan from *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, 174, 876–886.
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A. et al. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, 29, 189–195.

- Kumar, A.S.; Mody, K.; Jha, B. (2007). Review article: Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, 47, 103-107.
- Kurniawan, S.B.; Ahmad, A.; Said, N.S.M.; Imron, M.F.; Abdullah, S.R.S.; Othman, A.R.; Purwanti, I.F.; Hasan, H.A. (2021). Macrophytes as wastewater treatment agents: Nutrient uptake and potential of produced biomass utilization toward circular economy initiatives. **Science of The Total Environment**, 790, 148219.
- Lee, K. Y.; Buldum, G.; Mantalaris, A.; Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. **Macromolecular Bioscience**, 14, 10-32.
- Leite, P. B., Miranda, A. L., Souza, C. O., Machado, W. M., Moura, L. E., Druzian, J. I. (2015). Estudo prospectivo sobre métodos de conservação de bebidas alcoólicas e tecnologias correlatas sob o enfoque em documentos de patentes. **Cadernos de Prospecção**, 8, 74-84.
- Li, M. et al. (2021). A cost-effective production of bacterial exopolysaccharide emulsifier for oil pollution bioremediation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 159, 105-202.
- Lin, C., Cheruiyot, N. K., Bui, X.-T., & Ngo, H. H. (2022). Composting and its application in bioremediation of organic contaminants. **Bioengineered**, 13, 1073–1089.
- Lippincott, J.A., Lippincott, B.B. & Starr, M.P (1981). The genus *Agrobacterium* In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G. (Eds.) *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Berlin. **Springer-Verlag**, 842-855.
- Looijesteijn, J. P.; Trapet, L.; Vries, E.; Abee, T.; Hugenholtz, J. (2001). Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, 64, 71-80.
- Loran, M. A.; Horton, H. R.T.; Scrimgeour K. G.; Perry, M. D. (2013). *Bioquímica*, 5 ed. São Paulo: Pearson, pp 832.
- Lu, H., Jiang, X. (2014) Structure and properties of bacterial cellulose produced using a biobed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 172, 3844–3861.
- Lu, Y., Zheng, G., & Zhou, W. (2019). Biobleaching conditioning increased the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to promote their removal during co-composting of industrial and municipal sewage sludges. **Science of The Total Environment**, 665, 1073-1082.
- Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP (2009). Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. **Chemical Reviews**, 109, 4644–4681.

- Maciel, C. C. S.; Takaki, G. M. C.; Gusmão, N. B. (2010). Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. **Revista Eclesiástica Brasileira**, 3, 58-64.
- Mahapatra, S.; Banerjee, D. (2013). Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, 97, 627–634.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, 3, 208-218.
- Matthysse, A.G., White, S., Lightfoot, R. (1995). Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, 177, 1069–1075.
- Mayilraj S, Ruckmani A, Kaur C, Kaur I, Klenk HP (2011). *Cohnella ferri* sp. November. a new member of the genus *Cohnella* isolated from hematite ore. **Current Microbiology**, 62, 1704–1709
- Meneghine, A, K., Moretto, C., Castellane, T. C. L., Alves, L.M.C. (2017). Production, Characterization and Bioemulsifying Activity of an Exopolysaccharide Produced by *Sphingomonas* sp. Isolated from Freshwater. **Journal of Polymers and the Environment**, 25, 1080-1086.
- Miller, H. (2010). Bioestimulation as a form of bioremediation of soil pollutants. **Basic Biotechnology Journal**, 6, 7-12, 2010.
- Mnif, I., Ghribi, D. (2015). High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, 31, 691–706.
- Mockaitis, G. (2011). **Remoção de Cd²⁺ e Cu²⁺ de águas residuárias usando biorreator anaeróbico contínuo de leito fixo ordenado** - Tese (doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mohammadkazemi, F.; Azin, M.; Ashori, A. (2015). Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media. **Carbohydrate Polymers**, 117, 518-523.
- Mohan, S. v., Sirisha, K., Rao, N. C., Sarma, P. N., & Reddy, SJ. (2004). Degradation of soil contaminated with chlorpyrifos by bioslurry reactor operated in sequential batch mode: bioprocess monitoring. **Journal of Hazardous Materials**, 116, 39–48.
- Mohapatra, R.K. et al. (2019). Potential application of bacterial biofilm for bioremediation of toxic heavy metals and dye-contaminated environments. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms, **Elsevier**, 267-281.

Monteiro NK, Aranda-Selverio G, Exposti DTD, Silva M, Lemos EGM, Campanharo JC, Silveira JLMS. (2012). Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, 35, 705-8.

Moraes-Fernandes, M.I.B. (1897). Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 22, 881-896.

More, T. T.; Yadav, J. S. S.; Yan, S.; Tyagl, R. D.; Surampalli, R. Y. (2014). Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, 144, 1–25.

Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. (2006). Ed. da UFLA Microbiologia e bioquímica do solo, 2º edição, pp 744.

Moreira, M.R. (2009). **Natureza das interações celulose-água**- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), São Carlos.

Moschem, J.C., Gonçalves, P.R. (2020). Impact of Heavy Metals: An Analysis of Biochemical and Cellular Effects. **Health and Biosciences**, 1, 88-100.

MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 80, 599-602.

Nguyen, V. T., Flanagan, B., Mikkelsen, D., Ramirez, S., Rivas, L., Gidley, M. J., Dykes, G. A. (2010). Spontaneous mutation results in lower cellulose production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. **Carbohydrate Polymers**, 80, 337–343.

Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., Norf, H., & Kalogerakis, N. (2013). Enhanced ex situ bioremediation of crude oil-contaminated beach sand by nutrient and rhamnolipid supplementation. **Marine Pollution Bulletin**, 77, 37–44.

Nitsckhe, M.; Pastore, G. M. (2002). Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 25, 772-776.

Ogawa, T., Usui, M., Yatome, C. (1989). Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 43, 254-260.

Olyveira, L.M.; Costa, L.M.M.; Riccardi, C.S.; Santos, M.L.; Daltro, P.B.; Basmaji, P.; Daltro, G.C.; Guastaldi, A.C. (2016). Bacterial cellulose for advanced medical materials. In: GRUMEZESCU, A.M. (Ed). *Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials*. Cambridge: **Elsevier**, 57-82.

Orlandelli, R. C. et al. (2017). β -(1→3,1→6)-D-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative

activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, 94, 431–437.

Osman, G.E.H., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Shaaban, M.R., Samreen, S., Ahmad, I., (2019). Recent Progress in Metal-Microbe Interactions: Prospects in Bioremediation. **Journal of Pure and Applied Microbiology**. 13, 13–26.

Ozaki, N., Nakazato, A., & Nakashima, K. (2017). Loading and removal of PAHs, fragrance compounds, triclosan and toxicity by sewage sludge composting process. **Science of The Total Environment**, 605, 860–866.

Pace, G. W.; Righelato, R. C. (1980). Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, 15, 41-70.

Pathak, S.P.; Gopal, K. (2005). Occurrence of antibiotic and metal resistance in bacteria from organs of river fish. **Environmental Research**, 98, 100-103.

Penloglou, G., Chatzidoukas, C., Kiparissides, C. (2012) Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailored properties: An integrated modeling approach and experimental validation. **Biotechnology Advances**, 30, 329-337

Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P. (2009). Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and genes putatively involved in their biosynthesis and assembly. **FEMS Microbiology Reviews**, 33, 917-941.

Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzaneck, V., Hrubanova, K. (2020). Introducing the newly isolated bacterium *Aneurinibacillus* Sp. H1 as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers-1. Isolation and Characterization of the Bacterium. **Polymers**, 12, 1206-1235.

Philip, J. C., & Atlas, R. M. (2005). Bioremediation of contaminated soils and aquifers. **American Society of Microbiology (ASM)**, 139–236.

Pinto, M. H.; Martins, R. G.; Costa, J. A. V. (2009). Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, 32, 2104-2108.

Recouvreux, D.O.S., Rambo, C.R., Berti, F.V. et al. (2011). Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, 31, 151–157.

Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications, and applications. **Nature Reviews Microbiology**, 8, 578–592.

- Roca C, Alves VD, Freitas F and Reis MAM (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. **Frontiers in Microbiology**, 6, 288-295.
- Rubio-Sanz, L., Prieto, R.I., Imperial, J., Palacios, J.M., Brito, B., (2013). Functional and Expression Analysis of the Metal-Inducible dmeRF System from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. **Applied and Environmental Microbiology**, 79, 6414–6422.
- Sajna, K.V. et al., (2013). Studies on structural and physical characteristics of a new exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. **International Journal of Biological Macromolecules**, 59, 9-84.
- Samal, K.; Kar, S.; Trivedi, S. (2019). Ecological floating bed (EFB) for decontamination of polluted water bodies: Design, mechanism and performance. **Journal of Environmental Management**, 251, 109550.
- Sandhya, M. et al. (2022). Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. **Chemosphere**, 294, 133609.
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Chaiyaso, T., Leksawasdi, N. (2012). Optimization of Exopolysaccharide Overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid State Fermentation under High Salinity Stress. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 76, 912-917.
- Sarkar, J., Saha, A., Roy, A., Bose, H., Pal, S., Sar, P., & Kazy, S. K. (2020). Development of nitrate stimulated hydrocarbon degrading microbial consortia from refinery sludge as potent bioaugmenting agent for enhanced bioremediation of petroleum contaminated waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 36, 1–17.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Król J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. **Microbiol Cell Fact**, 5, 1-19
- Shan, N., Ul-Islama, M., Khattaka, W.A., Parka, J.K. (2013). Overview of Bacterial Cellulose Composites: A Multipurpose Advanced Material. **Carbohydrate Polymers**, 98, 1585– 1598.
- Sharma, B., Shukla, P., (2021a). A comparative analysis of heavy metal bioaccumulation and functional gene annotation towards multiple metal resistant potential by *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 and *Ochrobactrum ciceri* BPS-26. **Bioresource Technology**, 320, 124330.
- Sharma, B., Shukla, P., (2021b). A comparative analysis of heavy metal bioaccumulation and functional gene annotation towards multiple metal resistant

potential by *Ochrobactrum intermedium* BPS-20 and *Ochrobactrum ciceri* BPS-26. **Bioresource Technology**, 320, 124330.

Shiratori, H., Tagami, Y., Beppu, T., Ueda, K. (2010). *Cohnella fontinalis* sp. nov., uma bactéria xilanolítica isolada de água doce. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 60, 1344 – 1348.

Silva, A. P.; Argondizo, A.; Gubujin, J. C. (2021). Remoção de cobre de efluentes aquosos em eletrodo de leito fluidizado: avaliação de desempenho e otimização usando a Metodologia de Superfícies de Resposta e Análise de Cristas. **Revista DAE**. 69, 195-214.

Silva-Castro, G. A., Uad, I., Rodríguez-Calvo, A., González-López, J., & Calvo, C. (2015). Resposta da microbiota autóctone de solos poluídos por diesel a tratamentos agrícolas. **Pesquisa Ambiental**, 49–58.

Silva, T. R. S. (2012). **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para cultura de células e permeação de biomoléculas** - Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Silva, H.S., Chaves, J.S., Morais, R.K.S. (2019). Importância dos biossurfactantes no processo de biorremediação. In: I Mostra Científica de Práticas Pedagógicas do PIBID e Residência Pedagógica do IFRR/CAPEES. Roraima: IFRR.

Son, H. J.; Heo, M.S.; Kim, Y.G.; Lee, S.J. (2001). Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 33, 1-5.

Sone, Y. et al., (2010). Roles of merE and merT in the transport of inorganic and organic mercury compounds in Gram-negative bacteria. **Journal of Health Science**, 56, 123-127.

Souza, D. M.; Garcia-Cruz, C. H. (2004). Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 25, 331- 340.

Sperotto, G., Stasiak, L.G., Godoi, J.P.M.G. et al. (2021). A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined, and minimal media modulations. **Cellulose**, 28, 2649–2673.

Steinhagen, D.; Helmus, T.; Maurer, S.; Michael, R.D.; Leibold, W.; Scharsack, J.P.; Skouras, A.; Schuberth, H. (2004). Effect of hexavalent carcinogenic chromium on carp *Cyprinus carpio* immune cells. **Diseases of Aquatic Organisms**, 62, 155-161.

Stredansky et al. (1998) Succinoglycan production by *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 85, 398-403.

Suryawati, B., (2018). Zinc homeostasis mechanism and its role in bacterial virulence capacity. Presented at the **THE 8TH ANNUAL BASIC SCIENCE INTERNATIONAL**

CONFERENCE: Coverage of Basic Sciences toward the World's Sustainability Challenges, East Java, Indonesia, 070021.

Sutherland, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative (2001). **International Dairy Journal**, 11, 663-674, 2001.

Tate, R.L. (1995). Soil Microbiology. 3^o edição, New York, Wiley Blackweel, pp 592..

Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. (2012). Heavy Metal Toxicity and the Environment. In **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, Springer, 133–164

Treichel, H. (2004). **Estudo da otimização da produção de inulinase por Kluyveromyces marxianus NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. Tese (doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

Vidali, M.(2001) Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**, 73,1163-1172.

Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., Giovannetti, L., (2014). Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 38, 633–659.
Vu, B.; Chen, M.; Crawford, R. J.; Ivanova, E. O. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, 14, 2535–2554.

Wang, J.; Wang, W.; Xiong, J.; Li, L.; Zhao, B.; Sohail, I.; He, Z. (2021). A constructed wetland system with aquatic macrophytes for cleaning contaminated runoff/storm water from urban area in Florida. **Journal of Environmental Management**, 280, 111794.

Wang, J., Tavakoli, J., Tang, Y. (2019). Production, properties and applications of bacterial cellulose with different culture methods - a review. **Carbohydrate Polymers**, 219, 63–76.

Wang, Q. et al. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, 5261-5267.

Watling HR. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides: a review. **Hydrometallurgy**, 84, 81-108.

Wei, X. et al. (2011) Influence of extracellular polymeric substances (EPS) on Cd adsorption by bacteria. **Environmental Pollution**. 159, 1369–1374.

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, 173, 697–703.

Weiss, B., Souza, A. C. O., Constancio, M. T. L., Alvarenga, D. O., Pylro, V. S., Alves, L. M. C., Varani, A. M. (2021). Unraveling a lignocellulose-decomposing bacterial consortium from soil associated with dry sugarcane straw by genomic-centered metagenomics. **Microorganisms**, 9, 995.

Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal of Microbiology**, 34, 415-420.

Xia, X., Wu, S., Zhou, Z., Wang, G., (2021). Microbial Cd(II) and Cr(VI) resistance mechanisms and application in bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, 401, 123685.

Xu, L. et al. (2017). Identification of substituent groups and related genes involved in salean biosynthesis in *Agrobacterium* sp. ZX09. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101, 585–598.

Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A. & Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100, 1121–1135.

Zevenhuizen, L.P.T.M. (1997). Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polymers**, 33, 139-144.

Zhou, T.; Jiu, J.; Sugahara, T.; Nagao, S.; Sukanuma, K.; Wang, X.; Liu, X.; Chang, P.; Wang, T.; Xiong, D.; Chen, D.; Nge, T.T.; Koga, H.; Nogi, M. (2013). Electrically conductive bacterial cellulose composite membranes produced by the incorporation of graphite nanoplatelets in pristine bacterial cellulose membranes. **Express Polymer Letters**, 7, 756-766.

Zhu, H.; Jia, S.; Yang, H.; Jia, Y.; Yan, L.; Li, J. (2011). Preparation and application of bacterial cellulose sphere: A novel biomaterial. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, Sofia, 25, 2233-2236.