

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Avaliação do potencial biotecnológico do isolado
Methylobacterium rhodesianum

Bruno Bachega

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves

Co-orientadora: Dra. Daiane Silva Bonaldi

Trabalho apresentado à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias
- UNESP, Câmpus de Jaboticabal,
para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal, SP

2º Semestre/2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso meu agradecimento aos meus pais, José Valter Bachega e Sirlei Aparecida da Silva Bachega, e à minha irmã Julia Bachega, por todo apoio inestimável que recebi ao longo da vida.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, por todos os ensinamentos, pelo tratamento humano, pelo incentivo, pela atenção sempre pronta que me ofereceu durante a realização deste trabalho e pela paciência.

À Dra. Daiane Silva Bonaldi e a todos os colegas de laboratório que compartilharam comigo experiência de trabalho, me ajudaram ativamente e contribuíram para a conclusão deste projeto.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas da FCAV dos quais tive o privilégio de ser aluno, seus ensinamentos e solidariedade várias vezes ultrapassaram suas obrigações profissionais, meu sincero obrigado.

À Pró-reitoria de Pesquisa (PROPe) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e ao edital do PIBIC 2019/2020, pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

B119a Bachega, Bruno

Avaliação do potencial biotecnológico do isolado *Methylobacterium rhodesianum* / Bruno Bachega. -- Jaboticabal, 2023

58 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lúcia Carareto Alves

Coorientadora: Daiane Silva Bonaldi

1. Biorremediação. 2. Exopolissacarídeos. 3. Polihidroxibutirato. 4. Celulose bacteriana. 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.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: BIOTECNOLOGIA AGROPECUÁRIA E AMBIENTAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Avaliação do potencial biotecnológico do isolado *Methylobacterium rhodesianum*

ACADÊMICO: Bruno Bachega

CURSO: Ciências Biológicas

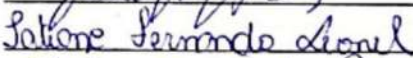
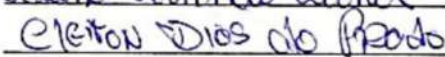
ORIENTADOR (ES): Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves
Dra. Daiane Silva Bonaldi

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)
Presidente	Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves
Membro	Dra. Tatiane Fernanda Leonel
Membro	Dr. Cleiton Dias do Prado

(Assinaturas)

Jaboticabal, 06 / 12 / 2023

Aprovado *ad referendum* do Conselho do Departamento em: 06 / 12 / 2023


Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta
Vice-Chefe no Exercício da Chefia

Sumário

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	7
1.1. GÊNERO <i>METHYLORUBRUM</i>	7
1.2. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	12
1.3. PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO .	13
1.4. BIORREMEDIAÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. ISOLADO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO E MEIOS UTILIZADOS.....	18
3.2. TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE CARBONO	20
3.3. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	20
3.4. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS .	21
3.5. CURVAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS	22
3.6. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	23
3.7. TESTE DE PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)	23
3.8. TESTE DE PRODUÇÃO DE PHB.....	24
3.9. TESTE DE PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA	24
3.10. TESTE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	25
3.11. TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO	26
3.13. TESTE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS.....	27
3.14. TESTE DE TOLERÂNCIA À SALINIDADE	27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. TESTE DE ASSIMILAÇÃO DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO ..	28
4.2. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	29
4.3. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS .	30
4.4. CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIO COM METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS.....	32
4.5. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS	34
4.6. PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BACTERIANOS - EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)36	
4.7. PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BACTERIANOS - PHB	38
4.8. PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BACTERIANOS - CELULOSE	40
4.9. TESTE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME	42
4.10. TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO	43
4.11. TESTE DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS	44
4.12. TESTE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS	45
4.13. TESTE DE TOLERÂNCIA À SALINIDADE	46
5. CONCLUSÃO.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
Material suplementar 1:.....	58

RESUMO

O gênero *Methylobacterium* compreende por bactérias metilotróficas facultativas que estabelecem diversas relações simbióticas com plantas e que apresentam características promissoras para aplicação biotecnológica. O uso potencial biotecnológico desses microrganismos é vasto, podendo atuar como promotores de crescimento de plantas e possivelmente fornecer outros benefícios. As bactérias metilotróficas demonstram resistência, tolerância, e capacidade de biodegradação e acumulação a diversos compostos tóxicos. Além disso, podem ser produtores de diversos biopolímeros de interesse industrial. Esses microrganismos são considerados soluções ecológicas de remoção de poluentes do meio ambiente, reduzindo a toxicidade de produtos nocivos, melhorando a produção da agrícola, e ainda a alternativa sustentável para a produção de compostos de interesse industrial das áreas médica, alimentícia e farmacêutica. Esse trabalho teve o objetivo avaliar o potencial biotecnológico do isolado *Methylobacterium rhodesianum*. Para isso foram realizados testes quanto sua condição de crescimento, capacidade de resistência a metais potencialmente tóxicos (MPT) e a antibióticos, produção de compostos de interesse industrial e a promoção do crescimento vegetal. Os resultados indicaram que o isolado possui a capacidade de produção de polihidroxibutirato (PHB, 19,2mg/100mL meio), exopolissacarídeos (EPS, 26mg/100mL meio) e celulose bacteriana (CB, 40,2mg/100mL meio), além de formar biofilme. O isolado de *M. rhodesianum* estudado demonstra alta resistência a diversos MPT, com concentração mínima inibitória acima de 100mmol dm⁻³ para cádmio, chumbo e zinco, e 490mmol dm⁻³ para níquel e é resistente aos antibióticos ampicilina, ácido nalidíxico e vancomicina. Por outro lado, o isolado apresenta baixa capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, mas produz sideróforos e compostos indólicos na presença de triptofano (28,23µg mL⁻¹). Esses resultados indicam que o isolado *M. rhodesianum* tem possíveis aplicações na produção de biomoléculas de interesse industrial como os polímeros bacterianos obtidos. Além disso, suas características de resistência a metais e produção de compostos relacionados ao crescimento vegetal sugerem sua habilidade para uso em fitorremediação de solos contaminados com metais.

Palavras chaves: Biorremediação; Exopolissacarídeos; Polihidroxibutirato, Celulose bacteriana

ABSTRACT

The genus *Methylobacterium* comprises facultative methylotrophic bacteria that establish several symbiotic relationships with plants and that present promising characteristics for biotechnological application. The potential biotechnological use of these microorganisms is vast, being able to act as plant growth promoters and possibly provide other benefits. Methylotrophic bacteria demonstrate resistance, tolerance, and capacity for biodegradation and accumulation to various toxic compounds. Furthermore, they can be producers of various biopolymers of industrial interest. These microorganisms are considered ecological solutions for removing pollutants from the environment, reducing the toxicity of harmful products, improving agricultural production, and also a sustainable alternative for the production of compounds of industrial interest in the medical, food and pharmaceutical areas. This work aimed to evaluate the biotechnological potential of the isolate *Methylobacterium rhodesianum*. To this end, tests were carried out regarding its growth condition, resistance capacity to potentially toxic metals and antibiotics, production of compounds of industrial interest and the promotion of plant growth. The results indicated that the isolate has the capacity to produce polyhydroxybutyrate (PHB, 19,2mg/100mL medium), exopolysaccharides (EPS, 26mg/100mL medium) and bacterial cellulose (BC, 40,2mg/100mL medium), in addition to forming biofilm. The isolate demonstrates high resistance to various toxic metals, with minimum inhibitory concentration above 100mmol dm⁻³ for cadmium, lead and zinc, and 490mmol dm⁻³ for nickel and is resistant to the antibiotics: ampicillin, nalidixic acid and vancomycin. By the other hand, the isolate has a low solubilization capacity for inorganic phosphate, but produces siderophores and indole compounds in the presence of tryptophan (28,23µg mL⁻¹). These results indicate that the *M. rhodesianum* isolate has possible applications in the production of biomolecules of industrial interest, such as the bacterial polymers obtained. Furthermore, its characteristics of resistance to metals and production of compounds related to plant growth suggest its ability for use in phytoremediation of soils contaminated with metals.

Key-words: Bioremediation; Exopolysaccharides; Polyhydroxybutyrate; Bacterial cellulose

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe grande discussão na sociedade e nos meios científico e político sobre os desafios ambientais que temos enfrentado na Terra, principalmente devido ao aumento da emissão de gases estufa e da temperatura média global do planeta, que promovem alterações climáticas. É sabido que nos últimos dois séculos a revolução industrial e os avanços tecnológicos levaram ao aumento da população mundial, devido a melhoria global na saúde e bem-estar das pessoas. A consequência disso é o aumento do consumo de recursos naturais como petróleo, gás natural, água, minerais, florestas e, também, da produção de resíduos sólidos, águas residuárias e emissões gasosas, resultantes de diferentes atividades antrópicas.

Os microrganismos podem exercer um papel importante na diminuição dos efeitos na natureza causados pela espécie humana, considerando que as bactérias e fungos exercem um papel importante na ciclagem de diversos elementos na terra. Por outro lado, os microrganismos apresentam a capacidade de produzir moléculas que podem ser usadas para a produção de diversos materiais, processos e produtos que poderiam diminuir a produção de resíduos sólidos ou outro tipo de interferência ambiental. Assim, estudos com microrganismos que possibilitem a produção de compostos biodegradáveis, ou processos sustentáveis ou remediação de ambientes impactados é de grande interesse na atualidade. Esse trabalho aborda um isolado bacteriano com potencialidade de contribuir ambientalmente em processos biotecnológicos.

1.1. GÊNERO *METHYLORUBRUM*

O gênero *Methylobacterium* foi proposto por Patt et al. (1976) com o propósito de incluir espécies de bactérias aeróbias metilotróficas facultativas, caráter trófico que as diferiam de todas as bactérias metilotróficas previamente identificadas. Essas bactérias podem caracteristicamente utilizar uma variedade de substratos orgânicos, como o metanol e outros compostos, contendo um átomo de carbono (Green; Ardley, 2018). Por outro lado, as vias metabólicas para oxidação de metanol e assimilação de C₁ são reprimidas durante o crescimento das bactérias em substratos orgânicos mais complexos (Patt et al., 1976). Os isolados do gênero

Methylobacterium foram descritos como bactérias gram-negativas, possuindo um único flagelo, com colônias redondas, convexas e pigmentação rosada, devido, em sua maioria, a compostos carotenoides produzidos. Convencionalmente, elas foram denominadas de *pink-pigmented facultative methylotrophic* (PPFM) (Green; Ardley, 2018).

Considerando diferenças nas sequências do gene 16S rRNA, análises de sequências de múltiplos locus, utilização de substratos de carbono, dados genômicos e fenotípicos para 52 espécies pertencentes ao gênero *Methylobacterium*, a validade de manter todas essas espécies em um único gênero foi questionada. Foi proposta, então, a criação de um novo gênero - *Methylobacterium*, no qual foram acomodadas 11 espécies (*Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium podarium*, *Methylobacterium populi*, *Methylobacterium pseudosasa*, *Methylobacterium rhodesianum*, *Methylobacterium rhodinum*, *Methylobacterium salsuginis*, *Methylobacterium suomiense*, *Methylobacterium thiocyanatum* e *Methylobacterium zatmanii*) antes pertencentes ao gênero *Methylobacterium* (Green; Ardley, 2018). As espécies sugeridas para serem reclassificadas também são PPFMs, e possuem muitas semelhanças com o gênero *Methylobacterium*. No entanto, além da diferença genômica, foram observadas características fenotípicas que diferenciam os dois gêneros. A maioria das espécies de *Methylobacterium* apresentaram a capacidade utilizar metilamina como fonte única de carbono e energia, o que raramente acontece no gênero *Methylobacterium* (Green; Ardley, 2018).

Os organismos classificados como *Methylobacterium* são versáteis e podem colonizar diferentes habitats, tanto terrestres quanto aquáticos, assim como a superfície das plantas, ou filosfera, onde aparecem em grande quantidade. (Omer et al., 2004; Knief et al., 2010; Yurimoto et al., 2021). Todas as espécies de *Methylobacterium* são gram-negativas, têm forma de bacilos, colônias de cor rosa ou avermelhada, não produzem esporos e são estritamente aeróbias. A caracterização geral de cada espécie em particular é baseada no compilado de Green e Ardley (2018).

Para a espécie *M. aminovorans* colônias rosa-claro são ocasionais, mas as sem pigmentação são raras. Não reduz nitrato. Tem melhor crescimento a 30 °C, entre pH 6.0 e 8.0, e não cresce na presença de 3% NaCl. Pode crescer utilizando: metanol, D-frutose, glicerol, etanol, monometilamina, dimetilamina, trimetilamina

(TMA), TMAH, formamida, N-metilformamida, DMF, ácido succínico, ácido L-asparático, ácido L-glutâmico e betaína. Essa espécie já foi utilizada com êxito na promoção de crescimento vegetal, sendo aplicada em sementes de amendoim (Mukiri et al., 2022), e como filtro biológico eficiente na remoção de trimetilamina (TMA), gás de forte odor liberado em alguns processos industriais e na decomposição de peixes (Aguirre et al., 2018).

Na espécie *M. podarium* as células são imóveis, sem capsula, não reduzem nitrato e apresentam melhor crescimento a 37 °C e pH 7,3. Essas bactérias podem crescer em: metilamina, dimetilamina, trimetilamina, metanol, metanotiol, dimetilsulfeto, dimetilsulfóxido, dimetilsulfona, formato, betaína, etanol, acetato, succinato, fumarato, tartarato, glutamato, glutamina, alanina, cisteína, lisina, arginina, aspartato, ribose, arabinose, glicose, frutose, sorbose, sacarose, maltose, trealose e extrato de levedura. Esta espécie secreta fitormônios e promoveu crescimento das raízes em *Arabidopsis thaliana* (Klikno; Kutschera, 2017).

A *M. pseudosasa* possui células imóveis, reduz nitrato e tem melhor crescimento a 28 °C e pH 6,8. Pode crescer utilizando: metanol, diclorometano, metilamina, L-arabinose, D-fucose, betaína, acetato e aspartato, e não cresce na presença de 2% NaCl.

M. rhodinum tem células móveis de único flagelo, ocasionalmente pleomórficas, crescem entre 15 °C e 37 °C e em pH inicial entre 5,0 e 9,0. Pode crescer utilizando: metanol, metilamina, betaína e citrato.

Na *M. salsuginis*, o pigmento rosado é insolúvel em água. O crescimento ótimo ocorre a 30 °C e pH 7,0. As fontes de carbono utilizadas por esta espécie incluem D-frutose, D-glicose, metanol, metilamina, etanol, formato, betaína e ágar nutriente. Não cresce com D-xilose, L-arabinose, sacarose, citrato, acetato ou formaldeído nem na presença de 1,5% NaCl. Também demonstrou considerável capacidade de promoção de crescimento de plantas (Pushpakanth et al., 2021).

M. suomiense tem células móveis com único flagelo polar, reduz nitrato, produz ácido indólico em meio com triptofano com nitrato como fonte de nitrogênio. O crescimento ótimo ocorre entre 25 °C a 30 °C, com pH entre 6,9 e 7,5. Pode crescer utilizando: metanol, metilamina, etanol, glicerol, D-glicose, D-frutose, galactose, acetato, succinato, malato, fumarato, piruvato, a-cetoglutarato, betaína, N,N-dimetilglicina e sarcosina. Não há crescimento em: L-arabinose, D-xilose, manose, lactose, maltose, trealose, rafinose, ramnose, ribose, sacarose, sorbose,

sorbitol, manitol, inositol, amido solúvel, tartarato, propionato, citrato, acetamida, formamida, dimetilformamida, serina, glicina, valina, arginina, aspartato, glutamato, betaína, mono e diclorometano, di e trimetilamina, CO₂+H₂ e metano. Não há crescimento na presença de de 3% NaCl. Possui propriedades promotoras de crescimento como AIA e citocininas e colonizou plantas de arroz e tomate em estudos (Joe et al., 2014).

M. thiocyanatum são bactérias imóveis, com crescimento ótimo ocorrendo entre 30 °C a 37 °C e pH 7,7. Cresce em: metanol, formaldeído, metanoato de metila, metilamina, betaína, glicose, frutose, arabinose (lento), succinato, fumarato, piruvato, acetato, glutamato, ágar nutriente e ágar Luria-Bertani. Não utiliza sacarose, citrato, metano, metanossulfonato, dimetilamina, trimetilamina ou dimetilsulfona, nem cresce como quimiolitotrófico com tiocianato, tiosulfato ou tetrionato como fontes de energia. Sua principal característica consiste em utilizar tiocianato como fonte de nitrogênio (Wood et al., 1998).

M. zatmanii são bactérias móveis por flagelo único, não reduzem nitrato, não produzem indol, têm pigmento insolúvel em água. Podem crescer utilizando: frutose, glicerol, malonato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato, lactato, malato; acetato, piruvato, etanol, propilenoglicol, metanol, metilamina, etilamina e formato como únicas fontes de carbono e energia. Não crescem em nenhum outro monossacarídeo além da frutose e não cresce em sebacato, aspartato, glutamato, citrato ou betaína. Produz AIA e promoveu crescimento em tomates quando aplicadas à folhagem (Pattnaik et al., 2017).

A *M. extorquens* é a espécie do gênero *Methylobacterium* mais estudada na literatura, e a qual se tem mais profundo conhecimento quanto suas características e aplicabilidade, por isso sugerida como espécie tipo do gênero por Green e Ardley (2018). Não reduz nitrato e pode utilizar como fonte de carbono: ácido succínico, etanol, ácido acético, betaína, metanol e metilamina como únicas fontes para energia e crescimento. Não utiliza: l-arabinose, d-xilose, d-glicose, d-manose, d-frutose, galactose, maltose, sacarose, lactose, trealose, d-sorbitol, d-manitol, inositol, amido solúvel, citrato ou metano. Esta espécie demonstrou grande potencial biotecnológico na produção de compostos de interesse, como polissacarídeos extracelulares, engenharia genética e promoção de crescimento de plantas (Ochsner et al., 2015; Subhaswaraj et al., 2017; Pattnaik et al., 2017; Lim et al., 2019).

A espécie *M. populi*, além de promover o crescimento de plantas, é caracterizada por ser a única espécie endofítica do gênero. Mostrou-se candidata para uso na biorremediação, tendo sido isolada de solos considerados altamente poluídos (Ventorino et al., 2014).

Estudos demonstraram que *M. extorquens*, assim como outras espécies de PPFMs, são capazes de sintetizar fitormônios ou seus precursores bioquímicos, sideróforos e solubilizar fosfato inorgânico, produzindo bioplásticos degradáveis bem como moderada e a alta tolerância à múltiplos metais potencialmente tóxicos (Abanda-Nkpwatt et al., 2006; Idris et al., 2006; Ventorino et al., 2014).

Apesar de baixa virulência no gênero, espécies como a *M. extorquens* já foram relatadas como patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos, relacionadas à equipamentos médicos contaminados em procedimentos invasivos, com algumas cepas desse gênero descritas como resistentes a uma série de antibióticos, como as cefalosporinas, ampicilina, penicilina, bacitracina, eritromicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, vancomicina, ácido nalidíxico, polimixina B e nitrofurantoína (Kovaleva et al., 2014; Green; Ardley, 2018).

A espécie *M. rhodesianum*, alvo da abordagem deste artigo, foi primeiramente descrita por Green et al. (1988), que caracterizou sua morfologia celular, da colônia e alguns de seus aspectos bioquímicos. Sabe-se então que ela tem células móveis de único flagelo, mas algumas cepas não se movem vigorosamente. A colônia é rosada, possivelmente devido a produção de compostos carotenoides. Cresce a 15°C e 30°C, mas não a 10°C, e a maioria das cepas também crescem a 37°C. Não necessita fatores de crescimento. Não degrada caseína, celulose, gelatina, lecitina e DNA. Produz urease; não produz: p-galactosidase, indol, sulfeto de hidrogênio, L-ornitina e L-1isina descarboxilases e L-arginina dihidrolase. Os testes de vermelho de metila e Voges-Proskauer são negativos. Algumas cepas reduzem nitrato para nitrito. É sensível aos antibióticos: canamicina, tetraciclinas, gentamicina, alhamicina T, estreptomicina e frameticina, mas resistente a: eritromicina, ácido nalidíxico, oleandomicina, espiramicina, polimixina B, sulfato de colistina, penicilina G e bacitracina. Pode utilizar como fonte única de carbono os seguintes compostos: frutose, glicerol, malonato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato, lactato, malato, acetato, piruvato, etanol, propilenoglicol, metanol, monometilamina, etilamina, formato e betaína. Não utiliza outros monossacarídeos além de frutose e não utiliza citrato, sebacato, tartarato ou trimetilamina.

Apesar das importantes propriedades observadas no gênero *Methylobacterium*, há poucas pesquisas na literatura sobre a espécie *M. rhodesianum* que avaliem a sua resistência aos metais potencialmente tóxicos e antibióticos, assim como a sua capacidade de induzir crescimento vegetal, sintetizar fitormônios ou produzir compostos de interesse industrial.

1.2. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Muitos estudos têm relacionado o aumento da qualidade e da produtividade de múltiplas espécies de plantas à ação de bactérias promotoras de crescimento. Essa relação é observada em situações tanto de estresse quanto normais, o que também pode ser promissor para redução do uso de agrotóxicos que podem ser nocivos ao meio ambiente (Syed; Tollamadugu, 2019).

De maneira geral, as bactérias promotoras de crescimento de plantas contribuem diretamente para o crescimento, seja auxiliando a absorção de recursos como nitrogênio, fósforo e minerais essenciais, ou produzindo hormônios vegetais reguladores do crescimento, ou indiretamente, mitigando efeitos deletérios causados por patógenos diversos, atuando como controle biológico, e biorremediando poluentes como metais pesados e pesticidas (Syed; Tollamadugu, 2019; Singh et al., 2020).

As PPFM são conhecidas por simbioticamente colonizarem diversas culturas vegetais, proporcionando resultados positivos na promoção de crescimento (Abd El-Gawad et al., 2015; Vijayanand et al., 2021). Certas espécies do gênero *Methylobacterium* são conhecidas por produzirem fitormônios essenciais ao crescimento de plantas, como giberelinas, ácido indol-3-acético (AIA), citocininas e vitamina B12 (Omer et al., 2004).

Em relação ao gênero *Methylobacterium*, colônias são comumente encontradas na filosfera, ou superfície das folhas, onde essas bactérias metilotróficas se beneficiam do metanol emitido pela planta como subproduto da degradação de pectina (Delmotte et al., 2009) obtendo assim vantagem na colonização em condições competitivas (Ochsner et al., 2015). A interação com as plantas foi amplamente descrita para a espécie *M. extorquens*, que dentre as propriedades relatadas, destaca-se a promoção de crescimento, germinação, estímulo da

resistência da planta contra patógenos, redução ao *stress* ambiental pela degradação de compostos tóxicos e imobilização metais potencialmente tóxicos (Abanda-Nkpwatt et al., 2006; Poorniammal et al., 2009; Dourado et al., 2015). Já foi reportado que a *M. extorquens* também produz sideróforos (agentes que solubilizam metais de compostos minerais e orgânicos tornando-os biodisponíveis) citocininas e AIA, tendo impactado positivamente plantas de tomate quando aplicada às folhas (Pattnaik et al., 2017), e baseado nas interações com plantas a espécie foi considerada como biofertilizante, bioestimulante e para biocontrole, pois também induzem a resistência sistêmica de plantas (Subhaswaraj et al., 2017).

No gênero *Methylobacterium*, espécies como a *M. populi* são capazes de solubilizar fosfato e potássio (Ventorino et al., 2014). Apesar da espécie *M. nodulans* formar nódulos em legumes, essa característica não foi constatada na *M. rhodesianum* (Sy et al., 2001). Sobre a *M. rhodesianum*, especificamente, não há na literatura maiores informações a respeito da sua relação com o estímulo do crescimento de plantas.

1.3. PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Bactérias, em geral, têm capacidade de produzir uma grande diversidade de polímeros que atendem várias funções biológicas, como armazenamento de energia, cápsulas e películas protetores e componentes da matriz de biofilme. Vários desses polímeros têm propriedades químicas e materiais convenientes para aplicações industriais e médicas e, portanto, muitos estão sendo produzidos comercialmente, fornecendo uma fonte valiosa de materiais renováveis e biodegradáveis (Rehm, 2010).

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres produzidos por bactérias como reserva de carbono e energia, dentre os quais o mais comum é o polihidroxibutirato (PHB). O PHB é um termoplástico biodegradável que apresenta propriedades físicas e químicas semelhantes ao plástico convencional, com potencial para diversas aplicações, como a fabricação de embalagens, canetas, compostos quirais para indústria farmacêutica. O PHB produzido por metilobactérias se mostrou eficiente como material de sutura, membranas que previnem a formação de tecido cicatrizado em cirurgias cardiovasculares, e como membranas e

nanofibras para cultivo de células do miocárdio (Kariduraganavar et al., 2014; Doronina et al., 2015).

Isolados da espécie *M. rhodesianum* destacaram-se na produção de polihidroxibutirato (PHB), a partir de diversas fontes de carbono e nitrogênio, por exemplo: glicerol, frutose, metanol e hidrolisados de caseína (Mothes, et al. 1998; Bormann; Roth, 1999). A capacidade do microrganismo em destaque, de reduzir compostos de carbono único permite que o metanol, por exemplo, sirva de matéria prima para produção do material plástico em maior escala (Breuer; Babel, 1999; Ochsner et al., 2015).

Algumas bactérias também produzem polímeros extracelulares, os exopolissacarídeos (EPS), que constituem parte significativa do biofilme microbiano, espécie de matriz polimérica que promove agregação das comunidades bacterianas, determinando suas propriedades físico-químicas e a funcionalidade deste para o microrganismo, como a aderência, adsorção de diferentes metais e compostos orgânicos ou inorgânicos pelo biofilme, comunicação intercelular e hidratação (More et al., 2014).

Como a composição do EPS varia para diferentes espécies microbianas, também variam suas possíveis aplicações. Apenas alguns materiais derivados do EPS bacteriano emergiram com aplicabilidade ou valor comercial significativos, como a goma xantana, um modificador reológico amplamente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia, e a celulose. Esta última também é passível de ser utilizada na indústria alimentícia como fibras não digeríveis e na indústria biomédica, como em implantes dentários, curativos e substitutos temporários da pele, levando à comercialização de produtos biomédicos na cicatrização de feridas, e diafragma de alto falantes (Freitas et al., 2011; Mohd Nadzir et al., 2021).

Dentro do gênero *Methylobacterium*, foi constatado a produção de EPS nas espécies *M. extorquens*, associado ao biofilme e sua capacidade de aderência a superfícies (Rosseto et al., 2011) e na *M. rhodesianum* (Breuer; Babel, 1999). Não há publicado na literatura estudos mais recentes sobre a produção de EPS na *M. rhodesianum* ou as características específicas e aplicações biotecnológicas desse EPS. Para outras espécies do gênero, com exceção de um experimento com um isolado de *M. Populi* que concluiu que este não produz EPS (Moturu et al., 2022), não há mais informações conclusivas na literatura científica quanto à produção de EPS.

A produção bacteriana de celulose e a formação de biofilme são processos biológicos que têm atraído atenção significativa tanto na pesquisa científica quanto para aplicações industriais (Serra; Hengge, 2019). A celulose, um polissacarídeo complexo, está principalmente associada às plantas, mas existem certas espécies bacterianas que possuem a notável capacidade de sintetizar celulose. Essas bactérias tornaram-se foco de numerosos estudos devido ao seu potencial em diversos campos, incluindo biotecnologia, ciência de materiais e medicina (Rajwade et al., 2015; Gorgieva; Trček, 2019).

Além da produção de celulose, essas bactérias são conhecidas pela formação de biofilme. Biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos que aderem a superfícies e são envoltos em uma matriz que a própria bactéria produz composta principalmente por EPS (López et al., 2010). Esta matriz oferece proteção e resiliência às bactérias residentes, tornando os biofilmes um componente crítico em numerosos contextos ecológicos, médicos e industriais (Dade-Robertson et al., 2017; Ünal et al., 2019; Gadkari et al., 2022).

No gênero *Methylobacterium*, a remoção de genes relacionados a síntese de celulose na espécie *M. extorquens* modificou consideravelmente o fenótipo de floculação das colônias, evidenciando a presença constituinte da celulose no biofilme (Delaney et al., 2013). Foi constatado que microrganismos do gênero *M. populi* produzem biofilme, o qual foi avaliado como tendo potencial para aplicações industriais, como para o tratamento de água e na produção de compostos químicos (Rosche et al., 2009; Thompson et al., 2020). É relevante salientar a ausência de informações na literatura científica referentes à produção de celulose e formação de biofilme no gênero *M. rhodesianum*.

1.4. BIORREMEDIAÇÃO

Biorremediação, refere-se a qualquer processo em que um sistema biológico é empregado para remover poluentes do ambiente, tendo ganhado destaque como um processo comparativamente econômico que pode se provar eficaz para combater os efeitos negativos da poluição, tornando solos menos contaminados, tratando água e filtrando o ar (Saeed et al., 2021).

Na biorremediação, populações microbianas que podem utilizar metais pesados ou outros poluentes como fonte de nutrição, ou degradar, erradicar, imobilizar ou desintoxicar essas substâncias, podem ser aplicadas *in situ* (no local poluído, sendo menos custoso) ou *ex situ* (sobre a contaminação retirada do seu local de origem). O uso de um determinado microrganismo para biorremediação depende de vários fatores, como sua adaptabilidade e características biológicas, o tipo e concentração do poluente, o custo da aplicação, etc (Verma; Kuila, 2019; Sharma, 2020). O interesse crescente em relação à biorremediação deve-se à procura por métodos sustentáveis para remediar a poluição, em vista do aumento de danos ambientais e na saúde humana causados pela grande produção de resíduos que a população humana é capaz de gerar.

Foi observado em várias espécies de metilobactérias a capacidade de degradar diversos compostos tóxicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e diclorometano, assim como o atributo de usarem diferentes compostos orgânicos poluentes como fonte única de carbono. Observou-se que tais organismos também promovem o crescimento de plantas, demonstrando, portanto, um potencial para uso em processos de biorremediação (Van Aken et al., 2004; Zhang et al., 2008; Muller et al., 2011; Lalevic et al., 2012; Ventrino et al., 2014).

Várias PPFM demonstraram tolerância a vários metais, como: níquel, zinco, chumbo, cobalto, cobre, cromo, prata e mercúrio (Koo; Cho, 2007; Ceylan; Uğur, 2012). A *M. extorquens* reduziu a toxicidade de mercúrio e cromo (De Marco et al., 2004), e no caso da *Methylobacterium oryzae*, melhorou o crescimento de plantas de tomate na presença de altas concentrações de níquel e cádmio (Tirry et al., 2018).

Existem diversos mecanismos pelos quais um microrganismo pode acumular e tolerar metais potencialmente tóxicos, o que, em conjunto com propriedades de promoção de crescimento vegetal, podem conferir aplicação para fitorremediação. Essa potencialidade foi observada em bactérias do gênero *Methylobacterium* (Dourado et al., 2012), assim como *M. extorquens*, isolado da endosfera de uma planta acumuladora de metais, o qual apresentou múltiplas características de resistência, aos metais: níquel, cádmio, cobre, zinco e cromo (Idris et al., 2006).

A produção de sideróforos, produzido, por exemplo, pela *M. extorquens*, reforça o potencial de biorremediação do microrganismo, pois além de funcionarem como agentes de solubilização de ferro, os sideróforos formam complexos estáveis com outros metais potencialmente tóxicos que podem ser nocivos ao meio ambiente,

como alumínio, cádmio, cobre, chumbo, zinco e gálio, reduzindo o estresse em plantas causado por níveis muito altos desses metais (Kiss, Farkas, 1998; Neubauer et al., 2000; Idris et al., 2004; Rajkumar et al., 2010; Pattnaik et al., 2017).

Sobre possíveis aplicações da *M. rhodesianum* para biorremediação, estudos demonstraram que esta espécie é capaz de degradar diclorometano (DCM), um composto químico altamente tóxico usado extensivamente pela indústria como solvente e que se tornou um dos mais difundidos poluentes devido a sua persistência na água e na atmosfera. O microrganismo utiliza o DCM como fonte de carbono e energia e, conseqüentemente, torna-o indisponível no meio ambiente (Liu et al., 2013; Chen et al., 2014).

Além do acúmulo de metais potencialmente tóxicos, a salinização constitui outra importante forma de degradação do solo, afetando tanto a qualidade quanto a quantidade de cultivos agrícolas e a biodiversidade em várias regiões do mundo. Considerando que microrganismos simbiotes são essenciais ao bom desenvolvimento de plantas, bactérias tolerantes ao estresse osmótico são candidatas importantes ao aprimoramento de colheitas afetadas pela salinização (Nobrega et al., 2004; Sharma et al., 2021).

Sabe-se que algum grau de tolerância a salinidade pode ser comumente encontrado em bactérias isoladas da rizosfera de leguminosas e solos salinos, e a esse respeito, das metilotróficas facultativas, a *M. oryzae* demonstrou tolerância a salinidade em conjunto com características promotoras de crescimento (Chanratana et al., 2017). Em relação à *M. rhodesianum*, a literatura científica carece de informações sobre características referentes a tolerância à salinidade.

2. OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho foram avaliar a potencialidade biotecnológica e de uso em biorremediação de um isolado *Methylobacterium rhodesianum*. Essas potencialidades serão avaliadas através do estudo da resistência do isolado a metais potencialmente tóxicos, da capacidade de produção de polímeros bacterianos de interesse industrial e de moléculas envolvidas na promoção do crescimento vegetal.

Portanto, os objetivos específicos propostos são:

1. Avaliação do uso de diferentes fontes de carbono e comportamento do desenvolvimento em meio de cultivo;
- 2 Avaliação *in vitro* da sensibilidade ou resistência do microrganismo a alguns metais potencialmente tóxicos;
3. Avaliação *in vitro* da sensibilidade ou resistência do microrganismo a diversas classes de antibióticos;
4. Produção de polihidroxibutirato (PHB);
5. Produção de exopolissacarídeos (EPS);
6. Produção de celulose bacteriana (CB);
7. Produção de sideróforos;
8. Produção de compostos indólicos;
9. Solubilização de fosfato inorgânico;
10. Avaliação *in vitro* da sensibilidade ou resistência do microrganismo a salinidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas- (LBMP), da UNESP de Jaboticabal, a qual dispunha de toda a infraestrutura necessária para seu desenvolvimento. As técnicas utilizadas neste trabalho não ofereceram risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

Os meios de cultura acrescidos de metais pesados estão sendo descartados em recipientes apropriados, rotulados devidamente com sua composição e posteriormente serão entregues à Comissão Local de Gestão e Descarte de Resíduos da Unesp/FCAV.

3.1. ISOLADO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO E MEIOS UTILIZADOS

O microrganismo utilizado neste trabalho é um isolado encontrado casualmente em meio de cultura sólido YMA modificado acrescido de cádmio, no dia 21/08/2018, destacado pela coloração vermelha intensa da colônia. O

microrganismo isolado foi identificado pelo sequenciamento do gene 16SrRNA. Através da comparação com os bancos de dados públicos BLASTn do National Center for Biotechnology Information, obteve-se que o isolado apresenta similaridade de 99,93% com a estirpe *Methylobacterium rhodesianum* DSM 5687.

Tabela 1: Composição e referência dos meios de cultivo e soluções usadas nesse trabalho.

Meio de cultivo / solução	Composição	Referência
YMA modificado	0,4 g extrato de levedura; 10 g manitol; 1 L água destilada, pH 6.8, suplementado com 3 mmol dm ⁻³ de Cádmio	Vincent, 1970 (modificado)
Meio NB frutose (NBF)	5 g frutose; 3 g extrato de levedura; 3 g peptona de soja, 1 L água destilada, pH 7,5.	Sigma Aldrich, St Louis (modificado)
Meio base (MB)	0,5 g K ₂ HPO ₄ ; 0,2 g MgSO ₄ ; 0,1 g NaCl; 0,5 g extrato de levedura, 1 L água destilada, pH 7.5	Sigma Aldrich, St Louis (modificado)
Meio frutose (MF)	0,5 g K ₂ HPO ₄ ; 0,2 g MgSO ₄ ; 0,1 g NaCl; 0,5 g extrato de levedura, 1,0 g peptona de soja, 5g frutose; 1L água destilada, pH 7.5	Sigma Aldrich, St Louis (modificado)
NBRIP	10g glicose; 5g Ca ₃ (PO ₄); 2, 5g MgCl ₂ .6H ₂ O; 0,25g MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,2g KCl; 0,1g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15g ágar, 1L água destilada	Nautiyal, 1999
Reagente de Bradford	1 L H ₂ O Milli-Q; 0,1 mL Comassie-blue G250; 0,50 mL etanol; 0,90 mL H ₃ PO ₄	Bradford, 1976
Hestrin–Schramm (HS)	2% glicose, 0.5% peptona, 0.5% extrato de levedura, 0.27% Na ₂ HPO ₄ e 1.15 g L ⁻¹ ácido cítrico, pH 5.5	Schramm, Hestrin; 1994
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ; 0,20 g KCl; 8,00 g NaCl, 1 L água destilada	Thorat e Suryanarayanan, 2019
Tris HCl	12,1 g Tris base, 1 L água destilada, pH 8.0, ajustado com HCl	Selander, 1986

Para o estoque da bactéria, cultivou-se em meio líquido NBF a 27°C, com agitação 150rpm, por um período de 3 dias. Após, uma alíquota de 800µL do cultivo

foi combinado com 200 μ do crioprotetor glicerol, e armazenado a -80°C. Uma cultura fresca do isolado foi mantida em placa de Petri com meio sólido NBF em B.O.D. a 27°C, sendo feito repique a cada 4 dias da cultura para meio novo.

Os meios de cultivo e soluções usadas nesse trabalho, assim como as referências de cada um, estão descritos na Tabela 1.

3.2. TESTE DE ASSIMILAÇÃO DE CARBONO

O isolado *M. rhodesianum* foi cultivado em diferentes fontes de carbono para determinação de qual dessas fontes é melhor assimilado por esta bactéria. O meio utilizado nesse teste foi o MB, cada amostra com 50mL acrescida de 0,25g da fonte de carbono a ser avaliada. As fontes de carbono testadas foram: D-Fructose, D-glicose, CMC, D-Trealose, Sacarose, D-Manose, D-Galactose, D-Lactose, D-Maltose, L-Arabinose, D-Xilose, D-Raminose e D-Manitol.

O pré-inóculo foi feito transferindo-se a massa bacteriana de uma placa de Petri com meio NBF, cultivada por 3 dias a 27°C, para um microtubo contendo 1,5mL de meio de cultivo MB (sem açúcar) de modo a obter-se uma solução bacteriana concentrada. Foi transferido 20 μ L desta solução bacteriana concentrada para os frascos com os meios de cultivo (50mL) com diferentes açúcares de modo a atingir a $DO_{545nm} = 0,150$. Após incubação a 30 °C, 150 rpm por 3 dias, os meios (50mL) foram centrifugados em tubos com tampa de 50 mL a 12.857xg, 21°C por 20 min. e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos bacterianos foram secos em estufa de ventilação forçada a 60 °C, por 3 dias, até o peso constante ser observado. A massa celular seca foi mensurada e comparada entre os tratamentos.

3.3. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

A curva de crescimento celular foi realizada utilizando o meio NBF. Diferente do MF, foram removidos os compostos NaCl, K₂HPO₄ e MgSO₄, pois estes reagentes liberam íons na solução que precipitam os metais, utilizados na curva de crescimento com metais e no teste de resistência, tornando-os indisponíveis no meio de cultura. Preparou-se um pré-inóculo cultivando o isolado em NBF sólido em placas de petri por três dias, e o conteúdo bacteriano foi transferido para um microtubo (2mL)

contendo 1,5mL de NBF líquido com o auxílio de um cabo de Kolle. A solução bacteriana resultante foi inoculada em frascos de 125mL contendo 40mL de meio NBF padronizando a absorbância em $DO_{545nm}=0,1$. Os frascos foram colocados em agitador orbital a 30°C, 150rpm e as amostras foram incubadas por 144 horas. A cada 24 horas coletou-se uma amostra (40mL) que foram então centrifugadas por 20 minutos, 8228xg, 21°C, em tubos com tampa (de capacidade 50mL) previamente pesados. Após a centrifugação o sobrenadante dos cultivos foi descartado e os tubos com a massa bacteriana foram colocados em estufa de secagem a 60°C por 5 dias. A taxa de crescimento celular foi calculada pela massa bacteriana obtida pela diferença de peso entre os tubos com tampa vazios e com biomassa seca, foi obtida em mg. A curva de crescimento foi feita em triplicata. Os resultados foram apresentados em gráfico, elaborado com as médias das triplicatas (massas bacterianas em mg) no intervalo de 144 horas (em intervalos de 24 horas).

3.4. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

Para determinações da concentração mínima inibitória (MIC) de cada um dos MPT, uma suspensão bacteriana foi inoculada em frascos contendo 30 mL de meio NBF acrescido com concentrações de 0,25 a 500 mmol dm⁻³ de cada metal potencialmente tóxico (Cr³⁺, Cr⁶⁺, Pb²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺).

Soluções estoque a 0,2 mol dm⁻³ dos metais potencialmente tóxicos: cobre (Cu²⁺), cromo trivalente (Cr³⁺), cromo hexavalente (Cr⁶⁺), níquel (Ni²⁺), cádmio (Cd²⁺), chumbo (Pb²⁺), zinco (Zn²⁺), ferro (Fe³⁺) e mercúrio (Hg²⁺) foram preparadas dissolvendo os respectivos sais metálicos: CuSO₄.5H₂O; CrCl₃.6H₂O; K₂Cr₂O₇; NiCl₂.6H₂O; CdCl₂.1/2H₂O; (CH₃COO)₂ Pb. 3H₂O; ZnSO₄.7H₂O; FeCl₃.6H₂O e HgCl₂ em água Milli-Q. As soluções foram esterilizadas por filtração (0,22 µm, Satorius Millipore) e armazenadas a 4°C.

Os frascos com os diferentes tratamentos foram incubados a 30 °C e 150 rpm por 24 horas. Após a incubação, 10µL de cada cultivo foi inoculada em placas de MF sólido sem a presença de metais. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias, e após esse período, examinadas a olho nu quanto ao crescimento ou ausência de colônia. A MIC para os íons metálicos foi definida como sendo a concentração mínima de metal que inibiu completamente o crescimento bacteriano (Singh et al., 2010).

3.5. CURVAS DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

Para a montagem das curvas de crescimento do isolado na presença de metais foram escolhidas concentrações de metais nas quais o isolado tem desenvolvimento comparável ao controle.

O isolado *M. rhodesianum* foi inoculado a uma $DO_{545nm}=0,4$ em meio NBF acrescido dos metais: Cu^{2+} ($2,5 \text{ mmol dm}^{-3}$), Cr^{3+} (mmol dm^{-3}), Ni^{2+} (2 mmol dm^{-3}), Cd^{2+} (2 mmol dm^{-3}), Zn^{2+} (10 mmol dm^{-3}) e Hg^{2+} ($0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$). As culturas (40mL) foram cultivadas a 30°C , 150rpm, por 7 dias. A cada 24 horas, um frasco de cada tratamento foi centrifugado a $12857 \times g$, 20 minutos, 21°C . Para a centrifugação foram usados tubos com tampa de 50mL previamente pesados. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo a massa bacteriana colocados para secar em estufa de ventilação forçada a 60°C por 3 dias. Os tubos com a biomassa celular seca foram pesados em balança analítica, subtraindo destes a massa dos respectivos tubos vazios para obtenção dos valores referentes à massa celular, com os quais foram montadas as curvas de crescimento.

As massas secas obtidas para a construção das curvas de crescimento, também foram usadas para a dosagem de proteínas. A dosagem de proteína foi feita pelo método colorimétrico de quantificação de proteínas com o reagente de Bradford, sendo a quantidade de proteínas indicativo proporcional da quantidade de células. As biomassas secas da curva de crescimento de cada metal e do controle foram ressuspendidas em 4mL de solução tampão Tris HCl ($12,1 \text{ g L}^{-1}$ Tris base, pH 8.0) e as células foram rompidas por ultrassom, 200W por 3 minutos. A solução resultante foi centrifugada, o sedimento celular foi descartado e o sobrenadante usado para a quantificação de proteínas solúveis com o reagente de Bradford, onde foi incubado por 5 minutos para resolução da reação colorimétrica. A reação foi feita com valores de até $200\mu\text{L}$ de amostra, completando-se os $200\mu\text{L}$ com H_2O Milli-Q, e $1800\mu\text{L}$ de reagente de Bradford, sempre totalizando 2mL. A forma marrom-avermelhada do corante converte-se em sua forma azulada quando este se liga às proteínas na solução, e não havendo proteínas, permanece na coloração original. O controle negativo continha apenas reagente de Bradford e H_2O milli-RO.

As colorações das soluções foram mensuradas em espectrofotômetro a uma absorbância de 595nm e os resultados obtidos foram comparados com uma reta

padrão realizada com quantidades conhecidas de soroalbumina bovina (BSA, 1:1) nas quantidades de 0 (branco); 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100µL; com H₂O milli-RO completando o volume total de 200µL e 1800µL de reagente de Bradford. Foram feitas retas padrão em triplicata nos mesmos dias dos experimentos com as amostras da curva de crescimento, para o controle e para os metais. A dosagem de proteínas do controle também foi feita em triplicata.

3.6. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

A resistência aos antibióticos foi avaliada usando a técnica de difusão de disco de Kirby - Bauer (Bauer et al., 1966), para isso, o isolado *M. rhodesianum* foi cultivado em meio NBF a 30 °C e agitação de 150 rpm, por 2 dias. Após o período de incubação, 40 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em meio NBF sólido por inundação, e espalhado na placa com auxílio de uma alça de drigalski. O teste foi realizado utilizando-se discos contendo 13 tipos de antibióticos. Os discos de antibióticos foram colocados assepticamente na região central da placa com a ajuda de uma pinça estéril. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias. Após este período, foi determinado o diâmetro dos halos de inibição e o isolado foi classificado como sensível ou resistente ao respectivo antibiótico.

Foram utilizados os antibióticos: ampicilina (10 mcg), amoxicilina (10 mcg), kanamicina (30 mcg), estreptomicina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), trimetropina (5 mcg), tetraciclina (30 mcg), ácido nalidíxico (30 mcg) cloranfenicol (30 mcg), polimixina B (300 UI), vancomicina (30 mcg), azitromicina (15 mcg) e rifampicina (5 mcg); o experimento foi feito em duplicata.

3.7. TESTE DE PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Para a avaliação da produção de EPS o isolado *M. rhodesianum* foi cultivado em MF sólido por 2 dias a 30 °C. Com um cabo de kolle, toda a cultura bacteriana da placa foi transferida para um microtubo contendo 1,5mL de meio MF. Desta solução bacteriana concentrada, 300µL foram transferidos para um frasco contendo 100mL de MF ou até atingir DO_{545nm}=0,4. A suspensão foi cultivada por 7 dias, a 30°C, 150rpm. Após o período de incubação, a suspensão bacteriana foi

centrifugada a 12857 x g, 4 °C por 50 minutos e foi separado o sobrenadante usado para a avaliação do EPS produzido. Etanol 96% gelado foi adicionado ao sobrenadante a uma taxa de 3:1 (v/v) para precipitar o EPS (Castellane et al., 2014). O precipitado foi separado com auxílio de uma haste de vidro e então lavado duas vezes com etanol 70%, seco em estufa de ventilação forçada a 60°C, por 72 horas e pesado em balança analítica. Experimento feito em triplicata.

3.8. TESTE DE PRODUÇÃO DE PHB

O isolado foi cultivado em MF sólido por 2 dias a 30 °C. Com um cabo de kolle, a cultura bacteriana foi transferida para um microtubo contendo 1,5 mL de meio MF. Desta solução bacteriana concentrada, 300µL foram transferidos para um frasco contendo 100mL de MF ou até atingir $DO_{545nm}=0,4$. A suspensão foi cultivada por 7 dias, a 30°C, 150rpm. O meio foi centrifugado a 12857xg por 20 minutos a 4°C e as células foram lavadas 2 vezes com água milli-RO. A biomassa bacteriana foi ressuspendida em 10mL de água milli-RO e as células bacterianas em suspensão foram rompidas por ultrassom em banho de gelo, com pulsos de 5 minutos a 200W, para liberação do conteúdo intracelular. A extração do PHB foi realizada pela adição de 10mL de $CHCl_3$ ao lisado celular. A suspensão foi homogeneizada em agitador orbital a 150 rpm, 30°C por um período de 90 minutos. O PHB foi então precipitado por centrifugação a 12857xg e 20°C por 30 minutos. As fases superiores obtidas foram descartadas e o precipitado foi colocado para secagem a temperatura ambiente (Penloglou et al., 2012).

3.9. TESTE DE PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

Para o teste de produção de celulose, foram avaliados três meios de cultura diferentes, sendo eles: NBF, HS e MF, e duas condições cultivo: com e sem agitação. O isolado *M. rhodesianum* foi inoculado em 100mL dos meios de cultura a uma densidade óptica $DO_{525nm}=0,4$ e as amostras separadas em cultivo estático e sob agitação. No cultivo estático as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 10 dias e sob agitação foram colocadas em agitador horizontal, a 150rpm e 30°C por 10 dias. O teste foi feito com triplicatas.

A coleta e purificação da celulose bacteriana separando-se a camada (membrana) de celulose produzida do meio de cultura com o auxílio de uma pinça e peneira fina, essa membrana foi então lavada em água destilada e depois incubada em 0.1mol dm^{-3} NaOH, a 80°C , por 2 horas para remover as células bacterianas ligadas à celulose. Na sequência a celulose foi lavada várias vezes em água deionizada para que atingisse pH neutro e finalmente seca em estufa de ventilação forçada a 60°C , por 12 horas e pesada (Costa et al., 2017).

3.10. TESTE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Stepanović et al. (2000). O isolado *M. rhodesianum* foi cultivado em meio NBF por 2 dias, e $200\mu\text{L}$ da suspensão bacteriana (em triplicata) em placas estéreis de poliestireno para microtitulação, com fundo chato e 96 poços. O controle negativo foi feito com o NBF estéril. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C . Após o período de incubação as soluções bacterianas nos poços foram removidas com o auxílio de um pipetador e os poços foram lavados 3 vezes com $250\mu\text{L}$ de NaCl 0,9% estéril. Nos poços foi então colocado $200\mu\text{L}$ de metanol absoluto P.A. (Synth), sendo as placas incubadas a temperatura ambiente por 15 min. para fixação do biofilme. O metanol foi removido e as placas foram deixadas para secar em temperatura ambiente. Depois das placas secas estas foram coradas pela adição de $200\mu\text{L}$ de solução cristal violeta 0,1% nos poços e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Passado o período de coloração, o corante foi removido e o excesso de corante aderido foi retirado com água corrente e as placas foram secas em temperatura ambiente. O controle negativo passou pelos mesmos processos com meio de cultura sem bactérias. A $\text{DO}_{570\text{nm}}$ de cada poço seco foi mensurada pelo leitor de microplacas. Assim o corante que se adere ao biofilme no fundo dos poços provoca uma leitura diferente do controle, caso o microrganismo produza biofilme.

O valor da densidade óptica para o isolado (DOi) foi obtido pela média dos poços da triplicata, sendo este valor comparado com a média da densidade óptica do controle negativo (DOc). Uma diferença na DOi de três vezes o desvio padrão, acima da média do controle negativo indica a produção de biofilme. Ainda por esses valores pode ser avaliada a aderência do microrganismo nos poços, relacionada ao biofilme, nas condições realizadas. O isolado foi classificado de acordo com a média

das densidades ópticas (DO_{570nm}) relacionada com os resultados obtidos para a DO_c . As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente se $DO_i \leq DO_c$; fracamente aderente (+) se $DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$; moderadamente aderente (++) se $2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$; ou fortemente aderente (+++) se $4 \times DO_c < DO_i$ (Stepanović et al., 2000).

3.11. TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO

Os ensaios para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foram realizados em triplicata utilizando-se o meio de cultura NBRIP sólido (Nautiyal, 1999) em placas de Petri.

O isolado *M. rhodesianum* foi cultivado em meio NBF por 48 horas a 30 °C, em agitador horizontal, a 150rpm. Da suspensão bacteriana foi retirada uma microgota (10µL) e inoculada no centro das placas com meio NBRIP. As placas foram incubadas por 10 dias a 28°C. Após o período de incubação foi medido o diâmetro do halo de solubilização dado pela área translúcida em volta das colônias de *M. rhodesianum* inoculada. A partir dessas medidas, o índice de solubilização (IS) foi calculado através da equação 1 e classificando a capacidade de solubilização de fosfato do isolado como baixa ($IS < 2$ mm), intermediária ($2 \leq IS < 4,0$ mm) e alta ($IS > 4$), segundo Berraquero et al. (1976).

Equação 1.

$$IS = A/B$$

A= diâmetro total (colônia + zona do halo); e B= diâmetro da colônia (Oves et al., 2017).

3.12. TESTE DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

O isolado *M. rhodesianum* foi cultivado em meio NBF sólido em placa de Petri por 2 dias e após esse período foi realizado um repique do isolado em placa de Petri contendo meio *Chrome-azurol Agar Assay* (CAS), de acordo com o método descrito por Schwyn and Neilands (1987) (Material suplementar 1). As placas com meio CAS foram incubadas em BOD por 3 dias a 28°C. Posteriormente, ao redor da colônia, foi

observada a presença de halos de cor laranja, que indicam a produção de sideróforos.

3.13. TESTE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS

A avaliação da produção de auxinas foi realizada em triplicata usando-se meio de cultivo suplementado com triptofano a partir de uma solução estoque de triptofano (10g L^{-1}), esterilizada por filtração. Como pré-inóculo, o isolado foi cultivado em meio MF sólido por 2 dias a 27°C em placas de Petri, e o conteúdo bacteriano das placas foi transferida para um microtubo com $1,5\text{mL}$ de meio MF. A partir desta solução bacteriana concentrada do isolado *M. rhodesianum*, $20\mu\text{L}$ foi inoculado em 20mL de meio de cultura MF sem e com 100 mg L^{-1} de triptofano, a uma densidade óptica de $\text{DO}_{545\text{nm}} = 0,4$ e as amostras foram incubadas por 3 dias a 30°C , em agitador horizontal, a 150rpm . Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 min. a 18928 g . Aliquotas de 1mL do sobrenadante foram retiradas e misturadas com 2mL de reagente de Salkowski (Sarwar; Kremer, 1995). As amostras foram incubadas por 30 min. no escuro para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativo da produção de auxinas. Em seguida a intensidade da cor foi determinada por espectrofotometria a 535nm (Asghar et al., 2002). A concentração de compostos indólicos produzida foi estimado usando uma curva padrão previamente obtida pela adição de quantidades conhecidas de auxina (Sigma), $\mu\text{g mL}^{-1}$: 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 125.

3.14. TESTE DE TOLERÂNCIA À SALINIDADE

O teste de tolerância à salinidade foi realizado segundo o método de Nóbrega et al. (2004), com modificações. O pré-inóculo do isolado *M. rhodesianum* foi incubado por 2 dias em meio NBF, a 30°C , em agitador horizontal, a 150rpm . Posteriormente, 2mL desta cultura foi centrifugada e as células ressuspensas em 2mL de solução tampão PBS, pH 7.4, estéril, para retirar vestígios do meio de cultivo. Em seguida, alíquotas de $10\mu\text{L}$ da suspensão de células em tampão foram inoculadas em placas de Petri com meio NBF sólido contendo diferentes concentrações de NaCl (g L^{-1}): 15; 30; 45; 60 e 75. O controle foi feito em uma placa

com meio NBF sólido sem acréscimo de NaCl. As culturas foram incubadas a 28 °C por 15 dias. Finalmente, a avaliação dos resultados foi realizada de acordo com o seguinte parâmetro: positivo (+) quando houve crescimento e negativo (-) quando não houve crescimento, em cada concentração testada, por aferição visual, em comparação com o controle. O experimento foi feito em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. TESTE DE ASSIMILAÇÃO DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO

A avaliação da capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono em meio de cultivo foi realizada com 13 diferentes tipos de açúcares entre mono, oligo e polissacarídeos, os resultados se encontram na Figura 1.

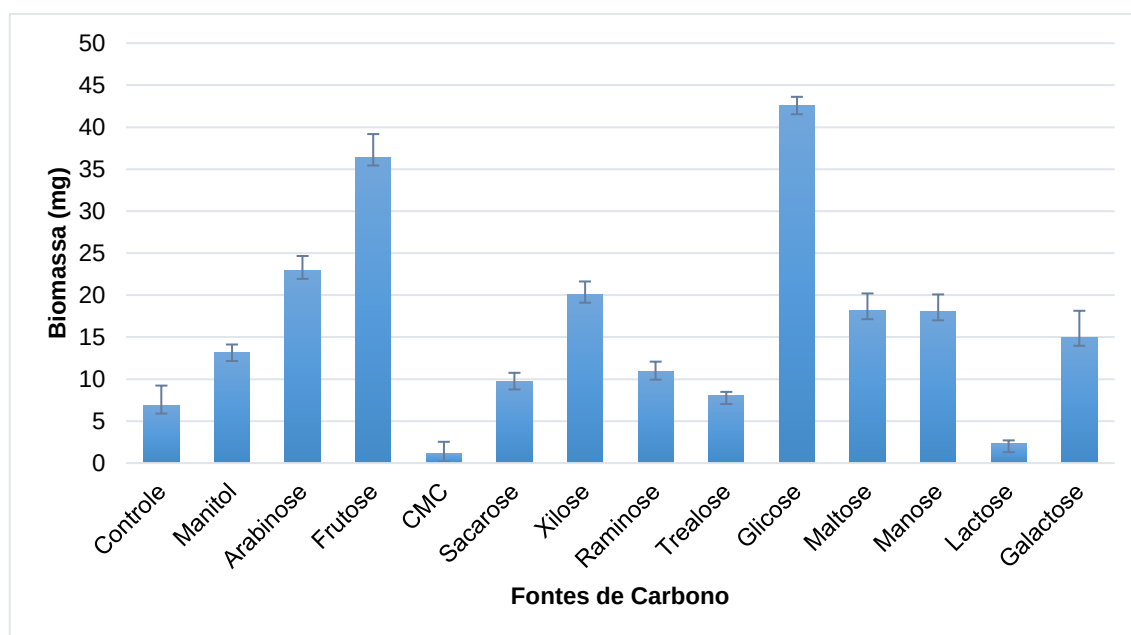


Figura 1. Médias do crescimento celular dado em mg de biomassa seca (eixo Y) obtida após 72 horas de cultivo em meio MB com diferentes fontes de carbono (eixo X), com desvio padrão representado no topo de cada barra.

As melhores fontes de carbono em que o isolado *M. rhodesianum* apresentou melhor crescimento foram a D-glicose, D-frutose, crescimento moderado foi observado para a L-Arabinose, D-Xilose, D-Maltose e D-Manose, nos outros

açúcares o desenvolvimento do isolado foi baixo, sendo a carboximetilcelulose (CMC) e a lactose os que promoveram menor crescimento bacteriano. Assim, a fonte de carbono escolhida para manutenção e demais ensaios com o isolado foi a D-frutose, indicado pela literatura como o açúcar preferível por este gênero (Green et al. 1988).

4.2. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento bacteriano foi avaliado por meio do cultivo em meio NBF e a quantificação foi feita através da pesagem da biomassa seca. Essa abordagem foi adotada devido a uma característica desse isolado, que em meio líquido forma aglomerados celulares que não se solubilizam no meio, dificultando a mensuração das amostras por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) ou mesmo por espectrofotometria.

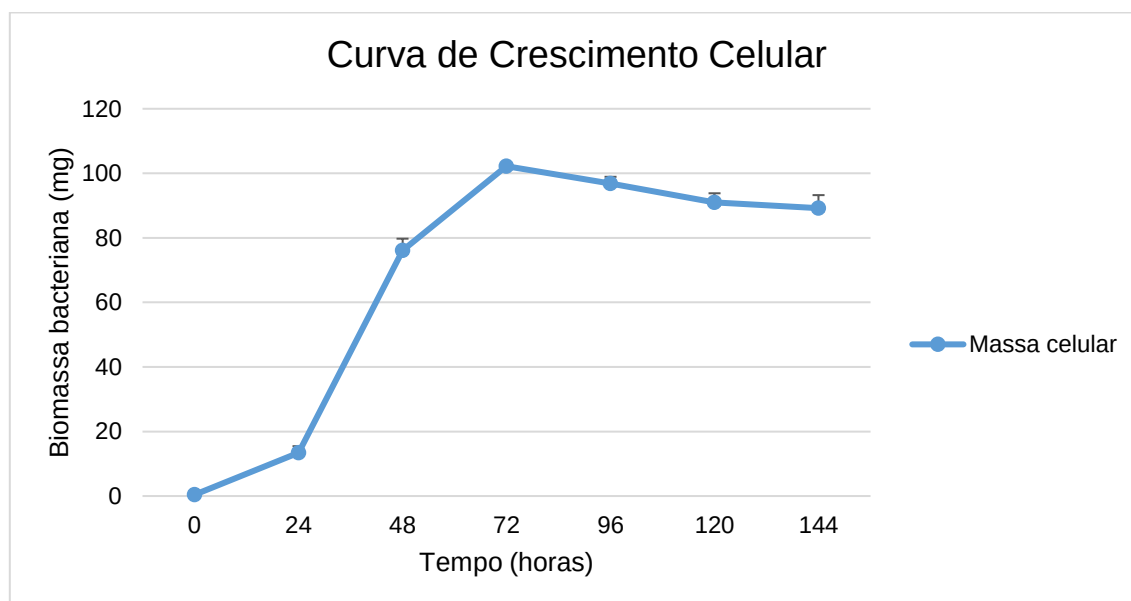


Figura 2. Curva de crescimento da *M. rhodesianum* em meio NBF, com frutose como fonte de carbono, durante 144 horas. Os valores correspondentes à massa celular são as médias das triplicatas, o desvio padrão está representado em cada ponto.

Tal característica também pode ser observada em linhagens da *M. extorquens* crescendo em meio líquido com succinato ou metilamina como substrato (Delaney et al. 2013). Para minimizar o ruído da leitura em espectrofotometria, os autores

modificaram o microrganismo removendo genes relacionados a síntese de celulose, produzindo as cepas modificadas CM2720 e CM2730.

Pela observação da curva de crescimento obtida (Figura 2), é possível afirmar que o isolado atinge a fase estacionária após 72 horas de cultivo em meio contendo frutose (NBF), permanecendo com células viáveis até o sexto dia de cultivo (tempo máximo estudado). Em um experimento para desenvolver métodos de cultura para maior rendimento bacteriano para *M. extorquens*, Delaney et al. (2013) demonstrou ser possível atingir a fase estacionária em cerca de 33 horas nas condições ideais de cultivo, utilizando succinato como fonte de carbono. No caso do isolado de *M. rhodesianum* em meio contendo frutose como fonte de carbono o tempo de crescimento maior foi observado, sendo que, a característica aglutinante permaneceu em todo o período de cultivo.

4.3. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

As concentrações mínimas inibitórias (MIC) estão descritas na Figura 3.

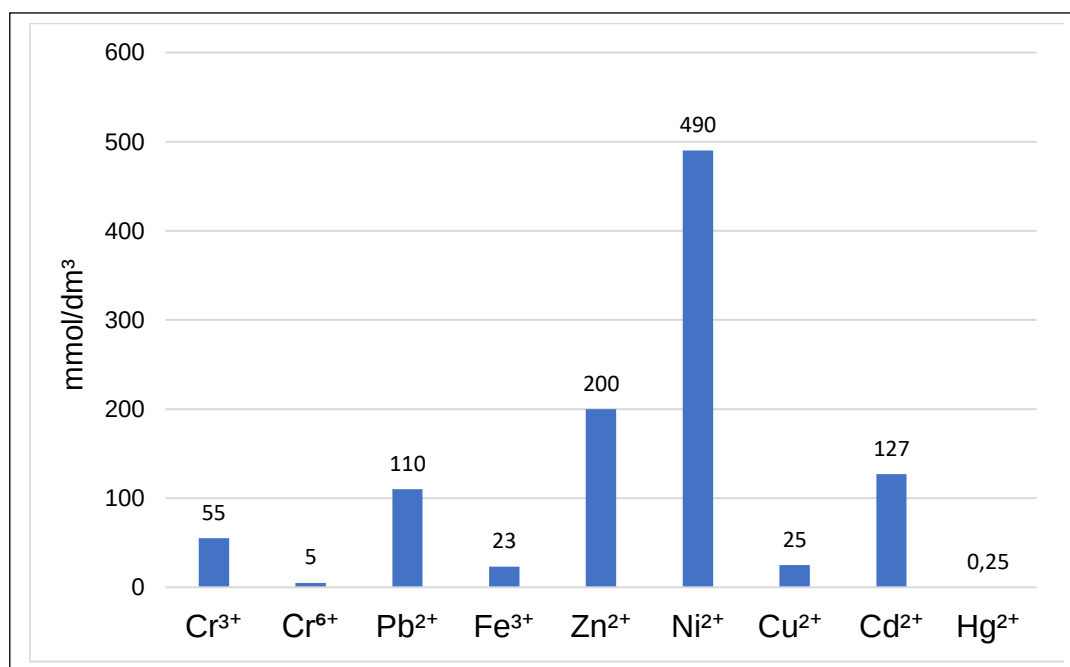


Figura 3. Concentrações mínimas inibitórias toleradas pelo isolado de *M. rhodesianum* em mmol dm⁻³ para cada metal potencialmente tóxico avaliado.

Considerando que a MIC para os íons metálicos é definida como sendo a concentração mínima de metal que inibe completamente o crescimento bacteriano, o isolado *M. rhodesianum* foi cultivado na presença de várias concentrações dos metais para se avaliar a resistência dele a tais elementos.

O isolado *M. rhodesianum* demonstrou alta tolerância (superior a 100mmol dm⁻³) a diversos metais potencialmente tóxicos, especialmente a chumbo, níquel, cádmio e zinco. Esse resultado reforça o potencial do microrganismo para biorremediação e fitorremediação. Outros estudos também indicaram para *M. extorquens* diferentes características de resistência ao: cádmio, cromo, cobre, zinco, e especialmente níquel, o que é semelhante aos resultados apresentados pela *M. rhodesianum* (Idris et al., 2006). Não há dados na literatura sobre a *M. rhodesianum* quanto a resistência de metais potencialmente tóxicos, sendo a *M. extorquens* a espécie próxima melhor estudada. Os isolados de *M. extorquens* que apresentaram as maiores resistências a metais no estudo de Idris et al. (2006) obtiveram os seguintes valores de MIC para os respectivos metais: 10mmol dm⁻³ para níquel, 2mmol dm⁻³ para zinco, 1mmol dm⁻³ para cromo, 1,5mmol dm⁻³ para cobalto e <1mmol dm⁻³ para cádmio, resultados inferiores aos apresentados pelo isolado *M. rhodesianum*.

Existem uma série de mecanismos de resistência descritos na literatura pelos quais uma bactéria pode evitar a toxicidade de metais potencialmente tóxicos. Algumas das estratégias adotadas incluem a bomba de efluxo, sequestro extracelular, bioissorção, precipitação, compartimentalização, bioacumulação intracelular e produção de agentes quelantes (Kushwaha, et al., 2018). Alguns mecanismos, como a bomba de efluxo, são ativos e significam gasto de energia pela célula, e não reduzem a biodisponibilidade dos metais no meio. De uma perspectiva visando a biorremediação, seriam mais interessantes os mecanismos que imobilizam os MPT como a bioacumulação e bioissorção, diminuindo sua biodisponibilidade no solo ou meio líquido (Kushwaha, et al., 2018).

Nesse sentido, é necessário ainda entender o mecanismo adaptativo pelo qual se deve essa resistência, se há armazenamento de grandes quantidades de metal pelas células ou se há um fluxo no qual expulsam os metais, bem como as vias metabólicas e os genes expressos nessas circunstâncias, delimitando o real potencial dessa espécie para biorremediação.

Dentro do gênero *Methylobacterium*, em uma linhagem da *M. extorquens* AM1 foram descritos uma alta tolerância ao cobre e a presença de um resistoma complexo de efluxo para esse metal, sendo que a maior MIC obtida para esse isolado foi de $1,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ de Cu^{2+} , semelhante a bactéria modelo multirresistente *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Dávalos; García-De Los Santos, 2023), valor inferior ao resultado da MIC do mesmo metal para o isolado *M. rhodesianum*, que foi de 25 mmol dm^{-3} (Figura 3).

4.4. CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIO COM METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

A avaliação do crescimento bacteriano do isolado *M. rhodesianum* foi realizada pelo cultivo dessa bactéria em meio NBF por 6 dias na presença ou não de metais em concentrações menores que o MIC anteriormente determinado. A medida do crescimento foi realizada através de medida da biomassa seca (Figura 4) e da dosagem de proteínas no resíduo bacteriano (Figura 5).

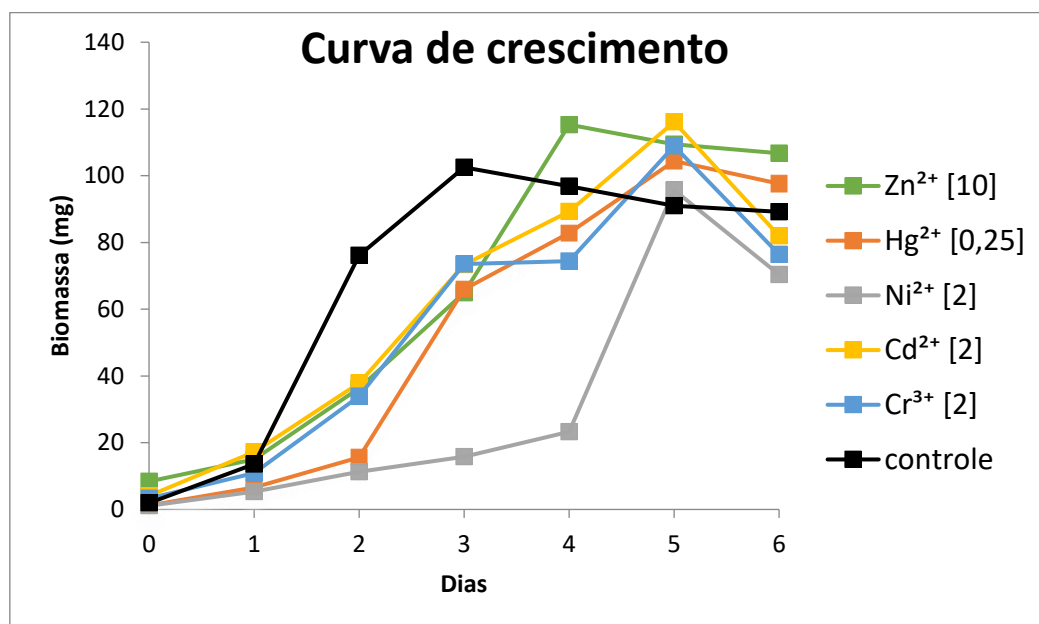


Figura 4. Crescimento do isolado *M. rhodesianum* nos diferentes metais potencialmente tóxicos, representado em biomassa (mg) durante 6 dias, em meio NBF. A concentração de cada metal está representada em mmol dm^{-3} em seguida da sigla correspondente.

O isolado *M. rhodesianum* apresentou biomassa semelhante ao controle na maioria dos metais testados. Entretanto esse crescimento que atinge a fase estacionária com 3 dias no meio controle, sem metal, passa a ser de 4 a 5 dias na presença dos mesmos (Figura 4).

As curvas de crescimento por dosagem de proteínas ilustradas na Figura 5 diferem em forma das curvas de crescimento elaboradas a partir da massa seca (Figura 4). O aparente crescimento da bactéria em alta concentração de zinco observado pela massa seca contrasta com o comportamento observado na dosagem de proteínas, onde o crescimento foi bem menor do que se podia esperar com os dados anteriores (Figura 4).

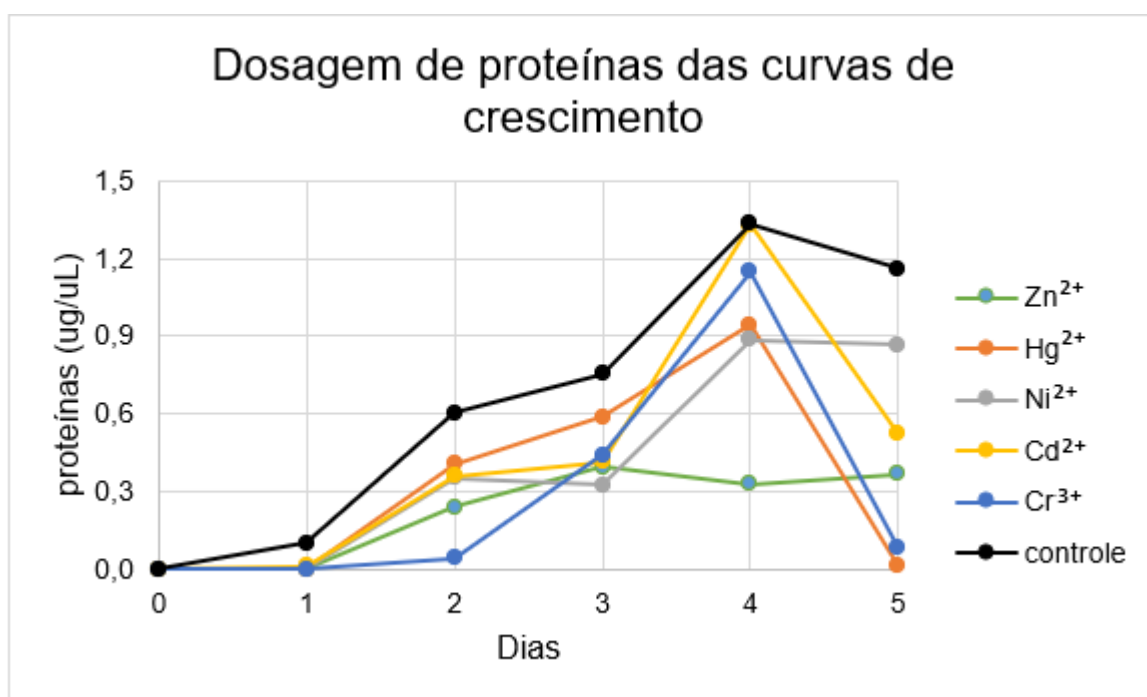


Figura 5. Dosagem de proteínas elaboradas a partir das massas secas obtidas das curvas de crescimento, incluindo a curva de crescimento controle de referência e as demais realizadas acrescidas dos metais potencialmente tóxicos listados na legenda, representada no eixo vertical em µg/µL, para 5 dias representados no eixo horizontal.

Outra diferença é o ponto de maior concentração celular, que neste experimento corresponde mais precisamente a células vivas e ficou definido para o quarto dia para a maioria das curvas de crescimento elaboradas com a dosagem de proteínas (Figura 5), enquanto no teste anterior o ápice da maioria das curvas se deu

no quinto dia. Ainda em relação ao gráfico anterior (Figura 4) nota-se maior semelhança geral das curvas, com destaque àquela com cádmio, que atingiu o mesmo ponto máximo que a curva controle.

A diferença geral observadas entre as medidas de massa seca e teor de proteínas deve-se ao fato de que a primeira pode resultar da presença de produtos secretados pelas bactérias, os quais auxiliam sua sobrevivência, não precisamente à quantidade de células vivas. Por outro lado, a dosagem de proteínas solúveis representaria melhor a quantidade do microrganismo no meio de cultivo. Diversos compostos podem ser produzidos por bactérias, principalmente quando elas estão em condições mais adversas, como é o caso da presença de MPT. Tais moléculas produzidas nesse caso se revestem de uma grande importância biotecnológica, pois diversas delas são produzidas pelas bactérias e apresentam potencialidade de uso, como os polímeros polihidroxibutirato, exopolissacarídeos e a celulose bacteriana. Da mesma forma alguns produtos secretados pelos microrganismos podem ser considerados ferramentas biotecnológicas importantes tanto na indústria como na agricultura (enzimas hidrolíticas, compostos indólicos, moléculas solubilizadoras de fosfato, sideróforos, dentre outras) (Blombach et al. 2022; Paravar et al., 2023; Teshima et al., 2023). Desta forma o isolado *M. rhodesianum* passou a ser estudado sob o aspecto de produtor de compostos bioativos importantes tecnologicamente.

4.5. TESTE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

O isolado *M. rhodesianum* demonstrou resistência a apenas três: ampicilina, ácido nalidíxico e vancomicina, dentre os 13 antibióticos avaliados (Tabela 2). A sensibilidade a polimixina B está em desacordo com a descrição de Green et al. (2018) que descreveu a espécie como resistente a uma significativa quantidade de antibióticos como o ácido nalidíxico, oleandomicina, eritromicina, espiramicina, polimixina B, sulfato de colistina, penicilina G e bacitracina, e sensível a: kanamicina, tetraciclina, gentamicina, alhamicina T, estreptomicina e frameticina. Entretanto o isolado *M. rhodesianum* estudado nesse trabalho, apesar de mostrar resistência a metais potencialmente tóxicos, é sensível à grande maioria dos antibióticos avaliados.

Características funcionais e estruturais envolvendo a resistência a antibióticos compartilham conteúdo em comum com aqueles da resistência aos

MPT, como é o caso da produção de biofilme. Uma implicação desse fato é que a exposição de bactérias patogênicas a metais tóxicos poluentes no meio ambiente pode induzi-las a desenvolver tolerância a antibióticos por mecanismos de co-seleção de genes (Baker-austin, 2006). Devido à co-seleção, bactérias se tornam resistentes a múltiplos antibióticos, metais e outras substâncias tóxicas, o que reforça a necessidade de controlar a contaminação de solos e ambientes aquáticos em todo o mundo (Imran et al., 2019).

Tabela 2. Diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano do isolado *M. rhodesianum* para os antibióticos.

Antibiótico	Halo de inibição (mm)	Classificação
Amoxicilina	1,8	Sensível
Ampicilina	0,0	Resistente
Tetraciclina	2,4	Sensível
Rifampicina	3,0	Sensível
Ácido nalidíxico	0,0	Resistente
Vancomicina	0,0	Resistente
Kanamicina	3,2	Sensível
Estreptomicina	2,1	Sensível
Gentamicina	1,9	Sensível
Cloranfenicol	2,0	Sensível
Polimixina B	1,2	Sensível
Azitromicina	3,4	Sensível
Trimetropina	2,2	Sensível

A co-seleção ocorre quando genes de resistência para ambos (antibióticos e metais) são localizados em conjunto na mesma célula (co-resistência), ou quando um único mecanismo de resistência (por exemplo uma bomba de efluxo) confere a resistência a ambos (resistência cruzada). No entanto, quais padrões e condições de exposição a metais ou antibióticos proporcionam essas condições prévias que

possibilitam a co-seleção ainda são pouco compreendidos (Pal et al., 2017; Bazzi et al., 2020).

Assim, para este isolado de *M. rhodesianum* dentro dos parâmetros testados o grau de resistência aos antibióticos não corresponde à alta tolerância encontrada para os metais potencialmente tóxicos. Isso deve-se ao fato de que, ainda que possam existir sobreposições, os mecanismos de resistência a antibióticos e a altas concentrações de MPT podem também se tratar de processos genéticos e celulares distintos, e existem lacunas em nosso entendimento do processo de co-seleção para resistências múltiplas (Pal et al., 2017; Bazzi et al., 2020).

A resistência a antibióticos surgiu como um sério problema de saúde global, acontecendo com cada vez mais frequência, que limita opções terapêuticas e resulta em casos em que infecções não podem ser tratadas. Existem vários meios pelos quais a resistência a antibióticos, como outros fatores de adaptação, pode se propagar entre populações de bactérias, como por transferência horizontal de genes e elementos genéticos móveis, o que também contribui para acelerar o aparecimento dessa característica entre esses organismos (Sultan et al., 2018).

4.6. PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BACTERIANOS - EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

A Figura 6 mostra a precipitação do EPS após adição do etanol 96% gelado no sobrenadante do cultivo.

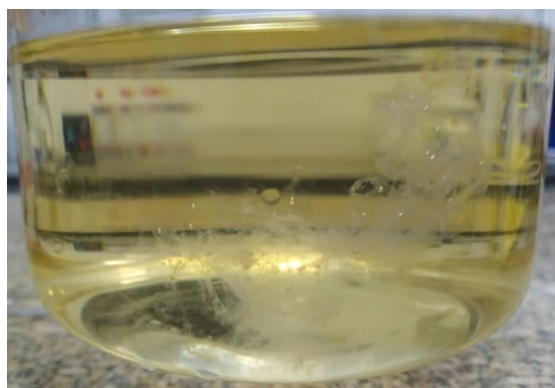


Figura 6. O EPS aparece quase imediatamente após a adição de etanol gelado. Pode ser visto na imagem como uma massa dentro do líquido.

O EPS depois de separado do sobrenadante e lavado em etanol 96% (Figura 7), foi seco em estufa de ventilação forçada até obter massa constante (Figura 8). O rendimento foi de 25,97mg ($\pm 3,01$) de EPS por 100mL de meio de cultura.

O EPS é composto, principalmente, por polissacarídeos, mas também inclui outras macromoléculas como proteínas, DNA e lipídeos. A importância biológica do EPS inclui seu papel como material constitucional da colônia bacteriana, podendo ficar aderido às superfícies celulares ou secretados no meio de cultura, sendo importante na formação do biofilme e suas propriedades e responsável pela aderência das bactérias (Donlan; Costerton, 2002). O EPS cria um microambiente favorável ao crescimento bacteriano, retendo água e facilitando o acesso a nutrientes essenciais pelas bactérias, assim favorecendo a sobrevivência destas em condições desafiadoras, como a desidratação ou escassez de nutrientes; protege contra radiação UV, substâncias tóxicas, e ainda atua como barreira física contra microrganismos predadores (Fulaz et al., 2019).



Figura 7. O EPS logo após ser separado da solução, ainda úmido.

Considerando a necessidade cada vez maior de se encontrar alternativas mais eficientes e ecológicas aos métodos convencionais de remoção de resíduos, os EPSs podem ser usados em processos biotecnológicos e auxiliar na biorremediação. Essa última aplicação se deve ao seu potencial em adsorver cátions metálicos ou ainda outras substâncias dissolvidas, a depender de sua composição, concentração e pH (Pal; Paul, 2008). Pesquisadores descobriram que a adição de EPS de cianobactérias às águas residuais remove metais pesados como cobre, cádmio e chumbo, absorvê-los por meio da biossorção (Mota et al., 2016).



Figura 8. EPS após a secagem em estufa de ventilação forçada a 60°C por 48h, ao final do processo.

Sabe-se que a produção de EPS também está associada à imobilização de MPT, essas moléculas podem, quando ligadas a parede celular de bactérias bioacumular íons metálicos externamente à célula, impedindo que fiquem solúveis no meio e/ou que atravessem as membranas celulares. Sendo assim a capacidade de produção de EPS pode se relacionar com a tolerância de bactérias aos MPT (Bhaskar; Bhosle, 2006; Guibaud et al., 2006).

No gênero *Methylobacterium*, foi constatado em uma cepa mutante da *M. rhodesianum* MB126 a produção de EPS em conjunto com PHB (Breuer; Babel, 1999), mas a literatura sobre a produção de EPS no gênero é escassa e a estrutura do EPS ainda não foi estudada, o que impede conjecturas mais precisas quanto as possíveis aplicabilidades desse material.

4.7. PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BACTERIANOS - PHB

A *M. rhodesianum* foi capaz de produzir 19,2 mg ($\pm 2,33$) de PHB em 100mL de meio de cultura. A literatura sugere que as bactérias produtoras de PHB aumentam a síntese desse polímero quando cultivadas com restrições de nutrientes, mas excesso de carbono. Tal comportamento pode ser considerado como uma adaptação a condições adversas, na qual o organismo armazena PHB como reserva

de energia se preparando para futuras condições mais adequadas (McAdam et al., 2020).

Além do carbono e algumas fontes químicas como fosfato, ferro, magnésio, oxigênio, outros parâmetros como pH e temperatura são fatores de controle para a produção de PHB (Bharti; Swetha, 2016). Ackermann et al. (1995) demonstrou para um isolado de *M. rhodesianum* sintetiza e acumula PHB de forma sincronizada e homogênea quando cultivado em metanol como fonte de carbono e em meio com limitação de nitrogênio, o que impede a síntese de proteínas. Posteriormente, Ackermann e Babel (1997) descobriram que, quando cultivada em frutose como fonte de carbono, a *M. rhodesianum* produz PHB em fase de crescimento exponencial, ou seja, sem a necessidade de fatores de limitação de crescimento, como a limitação de nutrientes. Atribuem que o efeito gargalo se dá no ciclo do ácido tricarboxílico, necessário na utilização de fontes de carbonos múltiplos como a frutose, mas não para a nutrição metilotrófica.

O PHB é produzido por muitas espécies bacterianas como forma de armazenar energia; suas propriedades como a biodegradabilidade, baixa toxicidade tanto para humanos quanto ao meio ambiente, e semelhanças físico-químicas com os termoplásticos derivados de petróleo despertam o interesse de cientistas para uma série de aplicações desse produto bacteriano. Uma possível aplicação que se destaca é a possibilidade de se substituir o plástico convencional, do qual nossa sociedade é muito dependente, e cujos efeitos ambientais são notoriamente negativos, com perspectivas promissoras na área biomédica, sendo utilizado PHB na engenharia de tecidos e confecção de itens cirúrgicos (Chen; Wu, 2005; Yeo et al., 2018).

Apesar das características desejáveis do PHB, seu uso em escala industrial enfrenta obstáculos. O alto custo de produção e suas propriedades físicas e mecânicas que necessitam melhoramentos para atingir a qualidade desejável são os principais fatores que limitam a competitividade com os plásticos convencionais (Yeo et al., 2018).

Espécies do gênero *Methylobacterium* foram mencionadas na literatura como excelentes modelos na produção de PHB, capazes de produzir em quantidade, substrato e tempo vantajosos, consequentemente melhorando a competitividade desse bioplástico no mercado (Cardoso et al. 2020). Em um estudo comparando a produção de PHB entre a *M. extorquens* e *M. rhodesianum*, em metanol como fonte

de carbono, a *M. extorquens* foi capaz de produzir 125 mg L⁻¹, enquanto a *M. rhodesianum* produziu 38 mg L⁻¹ no melhor resultado (Cardoso, 2017). Sabendo-se que PHB pode ser produzido a partir de fontes diversas, de baixo custo, orgânicas ou renováveis, pesquisas devem ser feitas em relação à otimização do processo de produção e quanto à viabilidade da produção em escala industrial. Nesse sentido o isolado que foi estudado nesse trabalho deve ser destacado pois pode apresentar a produção de quase 200mg.L⁻¹ de PHB. Novos meios de cultivo deverão ser avaliados juntamente com a produção dessa molécula e suas características para confirmação de sua potencialidade. A quantidade de biomassa, na qual pode haver quantidade significativa de PHB, gerada no cultivo com glicose (Figura 1) e na presença de níquel (Figura 4) sugere possíveis estratégias a serem testadas.

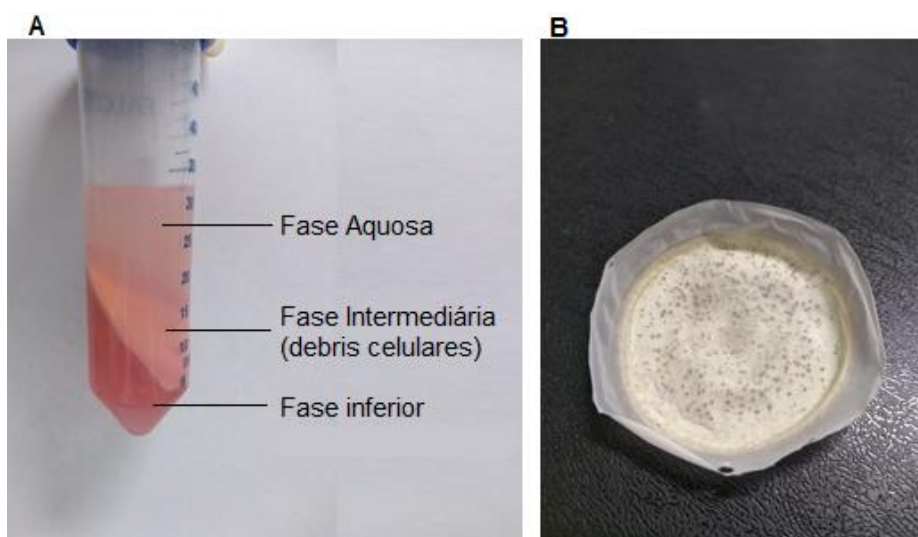


Figura 9: (A) Após a centrifugação: as fases aquosa e intermediária foram descartadas. A fase inferior composta por clorofórmio e PHB foi separada, e ao secar em recipiente aberto temos o PHB **(B)**.

4.8. PRODUÇÃO DE POLÍMEROS BACTERIANOS - CELULOSE

A floculação é uma característica observada no isolado *M. rhodesianum* em meio de cultivo líquido que impossibilita a leitura precisa em espectrofotometria. Em estudos com a *M. extorquens* foi observado que a remoção de genes ligados a síntese de celulose impediu com que a bactéria floculasse, o que permitiu melhores resultados na mensuração da densidade óptica e demonstra o papel da celulose na

formação de biofilme (Delaney et al.; 2013). Considerando essa característica do isolado foi feito o experimento de produção de celulose pelo isolado de *M. rhodesianum* nesse estudo.

Inicialmente também foram testados o meio Hestrin-Schramm (HS), tradicionalmente usado para a bactéria notória pela produção de celulose *Komagataei bacterxylinus* (Schramm, Hestrin; 1994), e o meio frutose (MF), utilizado no cultivo da *M. rhodesianum* em outros experimentos, mas ambos não produziram resultados satisfatórios; no primeiro o desenvolvimento da bactéria foi inexpressivo, e no último a quantidade de celulose obtida foi pouco significativa.

Entre as duas formas de análise, as amostras sob agitação não produziram celulose, e nada foi obtido ao escoar o meio por uma rede fina. No meio NBF sob cultivo estático foi constatado o surgimento de uma membrana que ocupou toda a superfície do meio de cultura. Após a purificação e pesagem foi obtido o valor de $402,33 \text{ mg L}^{-1} (\pm 8,94)$ de celulose.

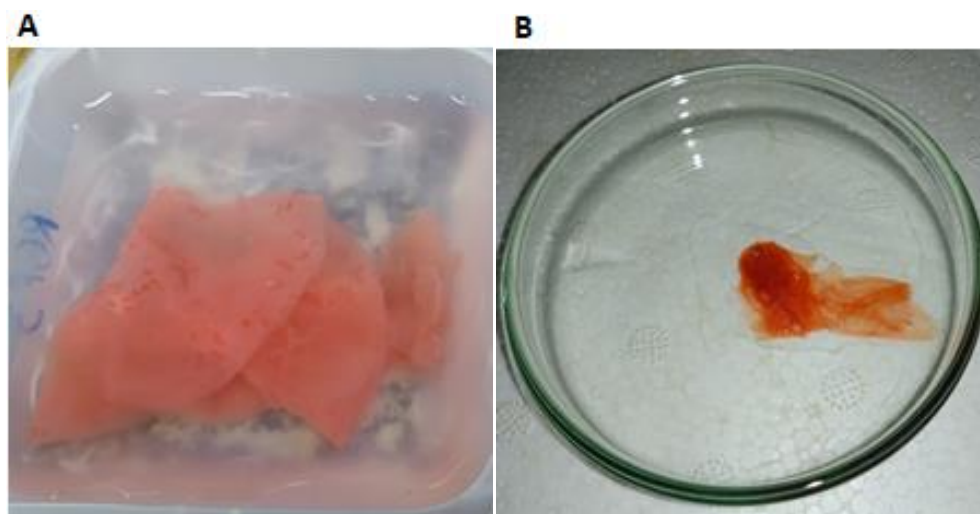


Figura 10. (A). Membrana de celulose produzida pelo isolado *M. rhodesianum* recém retirada do meio de cultivo NBF após 10 dias, em recipiente com H_2O . **(B)** Membrana após os processos de purificação e secagem.

A membrana que se formou na interface ar-líquido era fina e de cor alaranjada (que se manteve mesmo após a purificação) característico do isolado uma vez que este produz um pigmento avermelhado. A consistência da membrana formada permitiu com que fosse retirada cuidadosamente do frasco com uma pinça sem se romper.

Os melhores resultados obtidos com o meio NBF podem estar relacionados a grande quantidade de carbono do meio. Outros fatores que influenciam a produção de celulose bacteriana são a superfície de contato e a oxigenação do meio de cultura, as fontes de carbono utilizadas e o pH. Ademais, sabe-se que a produção de celulose sob cultivo estático atinge o limite quando a membrana cresce sob toda a superfície de contato do meio e inativa as bactérias devida à falta de oxigênio (Gorgieva, Trček; 2019).

O rendimento do isolado *M. rhodesianum* foi relativamente baixo se comparado com espécies modelos, como a *Gluconacetobacter xylinus*, que produz mais de 10 g L⁻¹ em condições otimizadas (Shoda; Sugano, 2005). Além dos diversos fatores mencionados que influenciam na síntese de celulose e possibilitam alternativas para melhorar o rendimento, o maior obstáculo ao uso em escala industrial da celulose bacteriana está no alto custo de produção. Por isso, apesar de tantas propriedades e possíveis aplicações, ainda se busca a redução do custo de produção, além da melhoria de suas propriedades físicas e biológicas, o que vem acontecendo e sugere um aumento na aplicação e conseqüentemente na demanda desse produto (Islam et al.; 2017).

4.9. TESTE DE PRODUÇÃO DE BIOFILME

Uma aferição visual do biofilme que sugeria a capacidade do isolado em produzir biofilme se deu pela aderência de células do isolado no frasco de frasco quando o microrganismo era cultivado em meio líquido sob agitação por mais de 2 dias (Figura 11). Por outro lado, a produção de biofilme ainda não foi descrita na literatura científica para isolados de *M. rhodesianum*, ou qualquer outra espécie do gênero *Methylobacterium*.

Segundo o critério de avaliação da produção de biofilme, proposto por Stepanović et al. (2000), é definida através da Doc (densidade óptica de corte) que deve ser três vezes acima do desvio padrão da DO média do controle negativo. Pelo ensaio em microplacas o controle negativo gerou uma DOc=0,302 ($\pm 0,027$), e os ensaios com o isolado *M. rhodesianum* produziu DOi=0,560 ($\pm 0,019$), desta forma pode-se constatar que o isolado produziu biofilme. Entretanto, os testes de produção de biofilme mostraram que, pelo critério de classificação quantitativa, utilizado no método descrito (Stepanović et al., 2000), o biofilme produzido pelo isolado é

considerado pouco aderente no meio de cultivo utilizado, pois a DOI é maior que a DOc, mas é menor que o dobro da DOc.



Figura 11. Biofilme produzido pelo isolado *M. rhodesianum* em meio NBF líquido pode ser observado aderido à vidraria, após 2 dias de cultivo sob agitação, à altura da interface ar-líquido.

4.10. TESTE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO

A associação de várias bactérias metilotróficas com plantas e a capacidade de solubilizar fosfato é uma característica comum dessa categoria, como nas espécies *Methylobacterium populi* e *M. extorquens* (Agafonova et al., 2013).

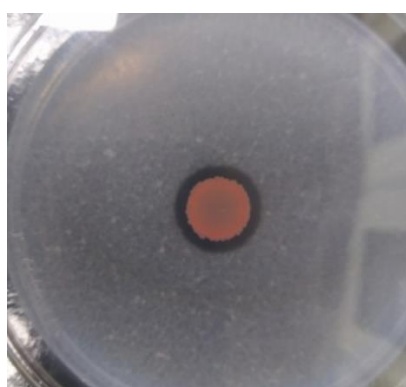


Figura 12. Placa com meio NBRIP após 15 dias de cultivo, no centro da placa é possível ver a colônia do isolado, ao redor do qual há formação do halo transparente, indicando que houve solubilização de fosfato.

O isolado *M. rhodesianum* estudado é capaz de solubilizar fosfato de cálcio, fato observado pela formação do halo de solubilização em volta da colônia (Figura 12).

Entretanto, o $IS = 1,43$ do teste mostra que o isolado apresenta baixa capacidade de solubilização. O IS é calculado usando-se o diâmetro da colônia (1,4 cm) e o diâmetro da colônia em conjunto com o halo de solubilização (2,0 cm) na fórmula descrita por Oves et al. (2017) descrita na metodologia. O IS pode classificar os isolados em: baixa ($IS < 2$ mm), intermediária ($2 \leq IS < 4,0$ mm) e alta ($IS > 4$) capacidade de solubilização de fosfato, segundo Berraquero et al. (1976).

4.11. TESTE DE PRODUÇÃO DE SIDERÓFOROS

O isolado foi capaz de produzir sideróforos, fato indicado pela presença do halo alaranjado após 3 dias de cultivo em meio CAS (Figura 13).



Figura 13. O halo alaranjado ao redor do isolado em meio CAS após 3 dias de cultivo a 28°C indica positivo para a produção de sideróforos.

A capacidade de produzir sideróforos em conjunto com a tolerância à metais potencialmente tóxicos apresentadas pelo isolado é uma combinação interessante a ser explorada para biorremediação. Bactérias que apresentam essas características são importantes para sobrevivência de plantas em solos contaminados, tornando o ferro biodisponível para as plantas, além de solubilizar outros metais, por exemplo: alumínio, cádmio, cobre, índio, gálio, chumbo e zinco, o que pode melhorar a eficiência da fitorremediação (Rajkumar et al., 2010).

Os sideróforos são compostos de interesse biotecnológico pois são solubilizadores de ferro eficientes e mais biodegradáveis que alternativas sintéticas, produzidos por organismos como plantas gramíneas e bactérias para tornar o ferro mais biodisponível, uma estratégia adaptativa para situações onde o ferro é escasso (Ghazy; El-Nahrawy 2021). Dado que a deficiência de ferro é um grave fator limitante no cultivo de plantações, e a síntese química de sideróforos é um processo complexo e de baixo rendimento, a produção biotecnológica por microrganismos se tornou uma alternativa atraente (Ferreira et al., 2019).

4.12. TESTE DE PRODUÇÃO DE COMPOSTOS INDÓLICOS

O isolado *M. rhodesianum* foi capaz de produzir 28,23 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de compostos indólicos na presença de 100 mg L^{-1} de triptofano. Outras PPFM também foram relatadas na literatura como capazes de produzirem compostos indólicos, sendo que a presença de triptofano no meio de cultivo pode aumentar sua produção em até 6 vezes (Ivanova et al., 2001; Omer et al., 2004). A espécie *M. mesophilicum* produziu 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na ausência de triptofano e até 14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com a presença de triptofano (Ivanova et al., 2001). Para 3 cepas de *Methylobacterium* spp. foram obtidos valores de 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 13,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no teste de produção de compostos indólicos na presença de triptofano (Omer et al., 2004) valor menor que o isolado *M. rhodesianum*. Um isolado de *M. extorquens* capaz de produzir 6,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na ausência de triptofano foi capaz de promover aumento no crescimento de raiz, caule e quantidade de folhas em plantas de tomate e por isso foi considerado conveniente para a agricultura sustentável (Subhaswaraj et al., 2017).

Os compostos indólicos são compostos orgânicos derivativos do indol, um composto aromático amplamente presente na natureza que são produzidos por diversas espécies de bactérias como comunicadores intracelulares, reguladores de várias atividades fisiológicas da célula (Lee; Lee, 2010). Um tipo de composto indólico são as auxinas, hormônios vegetais que são fundamentais no desenvolvimento das plantas, e de interesse biotecnológico voltado para a agricultura. A principal auxina é o ácido indolacético (AIA), sintetizado por algumas bactérias a partir do aminoácido triptofano (Emami et al., 2019).

A agricultura moderna depende fortemente do uso de produtos químicos, como fertilizantes, fungicidas e pesticidas para aumentar os rendimentos, porém, o uso de produtos químicos pode ter impactos negativos no meio ambiente. Esforços para reduzir o impacto da poluição ambiental em terras agrícolas incluem o uso de fertilizantes ecológicos, por exemplo, através do uso de microrganismos (Emami et al., 2019).

Considerando que as metilobactérias não são fitopatogênicas, a produção de compostos indólicos pelo isolado *M. rhodesianum* é uma característica que em conjunto com outras propriedades demonstradas pelo isolado pode ser utilizada tanto para agricultura quanto em processos de fitorremediação.

4.13. TESTE DE TOLERÂNCIA À SALINIDADE

O isolado *M. rhodesianum* não apresentou crescimento na presença das concentrações de NaCl testadas (é sensível nas concentrações de NaCl: 15, 30, 45, 60 e 75 g L⁻¹) em NBF. Não há referência na literatura a respeito da tolerância a salinidade para o gênero *Methylobacterium*.

A tolerância é influenciada por fatores como pH, temperatura, fontes de carbono e à presença de osmólitos que a bactéria acumula internamente para contrabalancear o estresse osmótico (Amoozegar et al., 2016), logo uma otimização do meio e condições de cultivo poderiam ser avaliadas na tentativa de obter um melhor desempenho do isolado neste teste.

5. CONCLUSÃO

Os atuais experimentos demonstraram a capacidade do isolado *M. rhodesianum* em tolerar altas concentrações de metais potencialmente tóxicos, especialmente chumbo, níquel, cádmio e zinco, bem como a resistência a poucos antibióticos (ampicilina, ácido nalidíxico e vancomicina) e sensibilidade à salinidade. O isolado tem capacidade de produzir PHB, EPS, biofilme e celulose bacteriana, polímeros de grande interesse biotecnológico. Também produz sideróforos e compostos indólicos na presença de triptofano, e apresenta pequena capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Desta forma pode ser concluído que o isolado em

estudo apresenta características que o tornam candidato a ser melhor estudado para sua aplicação biotecnológica em biorremediação e fitorremediação, e na produção de biopolímeros, principalmente se considerarmos o pequeno número de estudos com isolados dessa espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANDA-NKPWATT, D. et al. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 15, p. 4025-4032, 2006.

ABD EL-GAWAD, H. G. et al. Contribution of pink pigmented facultative methylotrophic bacteria in promoting antioxidant enzymes, growth and yield of snap bean. **synthesis**, v. 2, p. 4, 2015.

ACKERMANN, J.-U.; BABEL, W. Growth-associated synthesis of poly (hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 144-149, 1997.

ACKERMANN, J. et al. *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. **Journal of biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 9-20, 1995.

AGAFONOVA, N. V. et al. Phosphate-solubilizing activity of aerobic methylobacteria. **Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 864-867, 2013.

AGUIRRE, A. et al. Biofiltration of trimethylamine in biotrickling filter inoculated with *Aminobacter aminovorans*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 63-67, 2018.

AMOOZEGAR, M. A. et al. *Oceanobacillus halophilus* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1317-1322, 2016.

ASGHAR, H. et al. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 4, p. 231-237, 2002.

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

BAUER, A. W. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single diffusion method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAZZI, W. et al. Heavy metal toxicity in armed conflicts potentiates AMR in *A. baumannii* by selecting for antibiotic and heavy metal co-resistance mechanisms. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 68, 2020.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M^a; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BHASKAR, P. V.; BHOSLE, N. B. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. **Environment international**, v. 32, n. 2, p. 191-198, 2006.

BHARTI, S. N.; SWETHA, G. Need for bioplastics and role of biopolymer PHB: a short review. **J Pet Environ Biotechnol**, v. 7, n. 272, p. 2, 2016.

BLOMBACH, B. et al. Exploiting unconventional prokaryotic hosts for industrial biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 40, n. 4, p. 385-397, 2022.

BORMANN, E. J.; ROTH, M. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 12, p. 1059-1063, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BREUER, U.; BABEL, W. *Methylobacterium rhodesianum* produces poly-3-hydroxybutyrate and after mutagenesis in addition exopolysaccharides. **Acta biotechnologica**, v. 19, n. 1, p. 79-86, 1999.

CARDOSO, L. O. B. et al. Increased P3HB Accumulation Capacity of *Methylobacterium* sp. in Response to Discontinuous Methanol Addition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-15, 2020.

CARDOSO, L. O. B. **Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by methylotrophic bacteria**. 2017. Tese de Doutorado. MSc Thesis. São Paulo, Brazil: Polytechnic School, University of São Paulo.

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

CEYLAN, Ö.; UĞUR, A. Bio-monitoring of heavy metal resistance in *Pseudomonas* and *Pseudomonas* related genus. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, v. 6, n. 18, p. 233-242, 2012.

CHANRATANA, M. et al. Assessment of *Methylobacterium oryzae* CBMB20 aggregates for salt tolerance and plant growth promoting characteristics for bio-inoculant development. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017

CHEN, D. Z. et al. Effective utilization of dichloromethane by a newly isolated strain *Methylobacterium rhodesianum* H13. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 2, p. 1010-1019, 2014.

CHEN, G.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6565-6578, 2005.

COSTA, A. F. et al. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2027, 2017.

DADE-ROBERTSON, M. et al. Architects of nature: growing buildings with bacterial biofilms. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1157-1163, 2017.

DÁVALOS, A.; GARCÍA-DE LOS SANTOS, A. Five copper homeostasis gene clusters encode the Cu-efflux resistome of the highly copper-tolerant *Methylobacterium extorquens* AM1. **PeerJ**, v. 11, p. e14925, 2023.

DELANEY, N. F. et al. Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e62957, 2013.

DELMOTTE, N. et al. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 38, p. 16428-16433, 2009.

DE MARCO, P. et al. Novel pollutant-resistant methylotrophic bacteria for use in bioremediation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, n. 1, p. 75-80, 2004.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DORONINA, N. V. et al. Aerobic methylobacteria as promising objects of modern biotechnology. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 125-134, 2015.

DOURADO, M. N. et al. Analysis of 16S rRNA and *mxoF* genes revealing insights into *Methylobacterium* niche-specific plant association. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 142-148, 2012.

DOURADO, M. N. et al. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

EMAMI, S. et al. Assessment of the potential of indole-3-acetic acid producing bacteria to manage chemical fertilizers application. **International Journal of Environmental Research**, v. 13, p. 603-611, 2019.

EWING, Brent et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FERREIRA, C. M. et al. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 78, 2019.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388-398, 2011.

FULAZ, S. et al. Nanoparticle-biofilm interactions: the role of the EPS matrix. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 11, p. 915-926, 2019.

GADKARI, J.; BHATTACHARYA, S.; SHRIVASTAV, A. Importance and applications of biofilm in microbe-assisted bioremediation. In: **Development in Wastewater Treatment Research and Processes**. Elsevier, 2022. p. 153-173.

GHAZY, N.; EL-NAHRAWY, S. Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. **Archives of microbiology**, v. 203, p. 1195-1209, 2021.

GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, p. 1352, 2019.

GREEN, P. N.; ARDLEY, J. K. Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: A proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylobacterium* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 2727-2748, 2018.

GREEN, P. N.; BOUSFIELD, I. J.; HOOD, D. Three new *Methylobacterium* species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov., and *M. fujisawaense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 124-127, 1988.

GUIBAUD, G.; VAN HULLEBUSCH, E.; BORDAS, F. Lead and cadmium biosorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from activated sludges: pH-sorption edge tests and mathematical equilibrium modelling. **Chemosphere**, v. 64, n. 11, p. 1955-1962, 2006.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

IDRIS, R. et al. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2667-2677, 2004

IDRIS, R. et al. Characterization of Ni-tolerant methylobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp. nov. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 8, p. 634-644, 2006.

IMRAN, M.; DAS, K. R.; NAIK, M. M. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. **Chemosphere**, v. 215, p. 846-857, 2019.

ISLAM, M. U. et al. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 1166-1173, 2017.

IVANOVA, E. G.; DORONINA, N. V.; TROTSSENKO, Yu A. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. **Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 392-397, 2001.

JOE, M. M. et al. Development of alginate-based aggregate inoculants of *Methylobacterium* sp. and *Azospirillum brasilense* tested under in vitro conditions to promote plant growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 408-423, 2014.

KARIDURAGANAVAR, M. Y.; KITTUR, A. A.; KAMBLE, R. R. Polymer synthesis and processing. In: **Natural and synthetic biomedical polymers**. Elsevier, 2014. p. 1-31.

KISS, T.; FARKAS, E. Metal-binding ability of desferrioxamine B. **Journal of inclusion phenomena and molecular recognition in chemistry**, v. 32, n. 2, p. 385-403, 1998.

KLIKNO, J.; KUTSCHERA, U. Regulation of root development in *Arabidopsis thaliana* by phytohormone-secreting epiphytic methylobacteria. **Protoplasma**, v. 254, n. 5, p. 1867-1877, 2017.

KNIEF, C.; FRANCES, L.; VORHOLT, J. A. Competitiveness of diverse *Methylobacterium* strains in the phyllosphere of *Arabidopsis thaliana* and identification of representative models, including *M. extorquens* PA1. **Microbial ecology**, v. 60, n. 2, p. 440-452, 2010.

KOO, S.; CHO, K. Characterization of a heavy metal-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium, *Methylobacterium* sp. SY-NiR1. 2007.

KOVALEVA, J.; DEGENER, J. E.; VAN DER MEI, H. C. *Methylobacterium* and its role in health care-associated infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1317-1321, 2014.

KUSHWAHA, A. et al. A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 1035-1045, 2018.

LALEVIC, B. et al. Biodegradation of MTBE by bacteria isolated from oil hydrocarbons-contaminated environments. 2012.

LEE, J.; LEE, J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. **FEMS microbiology reviews**, v. 34, n. 4, p. 426-444, 2010.

LIM, C. K. et al. Designing and engineering *Methylorubrum extorquens* AM1 for itaconic acid production. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1027, 2019.

LIU, H. X. et al. Isolation and degradation characteristics of dichloromethane-degradation bacterial strain by *Methylobacterium rhodesianum* H13. **Huan jingkexue= Huanjingkexue**, v. 34, n. 9, p. 3613-3619, 2013.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 7, p. a000398, 2010.

MCADAM, B. et al. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. **Polymers**, v. 12, n. 12, p. 2908, 2020.

MOHD NADZIR, M. et al. Biomedical applications of bacterial exopolysaccharides: A review. **Polymers**, v. 13, n. 4, p. 530, 2021.

MORE, T. T. et al. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of environmental management**, v. 144, p. 1-25, 2014.

MOTA, R. et al. Released polysaccharides (RPS) from *Cyanothece* sp. CCY 0110 as biosorbent for heavy metals bioremediation: interactions between metals and RPS binding sites. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 7765-7775, 2016.

MOTHES, G.; ACKERMANN, J. U.; BABEL, W. Regulation of poly(β -hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum* MB 126 growing on methanol or fructose. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 4, p. 360-363, 1998.

MOTURU, U. al. Investigating the diversity of bacterial endophytes in maize and their plant growth-promoting attributes. **Folia Microbiologica**, v. 68, n. 3, p. 369-379, 2023.

MUKIRI, C. et al. Immobilization of beneficial microbe *Methylobacterium aminovorans* in electrospun nanofibre as potential seed coatings for improving germination and growth of groundnut *Arachis hypogaea*. **Plant Growth Regulation**, v. 97, n. 2, p. 419-427, 2022.

MULLER, E. E. et al. Functional genomics of dichloromethane utilization in *Methylobacterium extorquens* DM4. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 2518-2535, 2011.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

NEUBAUER, U. et al. Siderophores, NTA, and citrate: potential soil amendments to enhance heavy metal mobility in phytoremediation. **International journal of phytoremediation**, v. 2, n. 4, p. 353-368, 2000.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, p. 899-905, 2004.

OCHSNER, A. M. et al. *Methylobacterium extorquens*: methylotrophy and biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 517-534, 2015.

OMER, Z. S. et al. Indole-3-acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. **Plant Growth Regulation**, v. 43, n. 1, p. 93-96, 2004.

OMER, Z. S.; TOMBOLINI, R.; GERHARDSON, B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMs). **FEMS microbiology ecology**, v. 47, n. 3, p. 319-326, 2004.

PAL, A.; PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. **Indian journal of microbiology**, v. 48, n. 1, p. 49, 2008.

PAL, C. et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance. **Advances in microbial physiology**, v. 70, p. 261-313, 2017.

PARAVAR, A. et al. Microbial seed coating: an attractive tool for sustainable agriculture. **Biotechnology Reports**, p. e00781, 2023.

PATT, T. E.; COLE, G. C.; HANSON, R. S. *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 226-229, 1976.

PATTNAIK, S. et al. Indole acetic acid production and growth-promoting activity of *Methylobacterium extorquens* MP1 and *Methylobacterium zatmanii* MS4 in tomato. **International Journal of Vegetable Science**, v. 23, n. 4, p. 321-330, 2017.

PENLOGLOU, G.; CHATZIDOUKAS, C.; KIPARISSIDES, C. Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 329-337, 2012.

POORNIAMMAL, R. et al. In vitro biocontrol activity of *Methylobacterium extorquens* against fungal pathogens. **International Journal of Plant Protection**, v. 2, n. 1, p. 59-62, 2009.

PUSHPAKANTH, P. et al. Biotization of tissue culture banana plantlets with *Methylobacterium saluginis* to enhance the survival and growth under greenhouse and open environment condition. **Journal of Environmental Biology**, v. 42, n. 6, p. 1452-1460, 2021.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010.

RAJWADE, J. M. et al. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, p. 2491-2511, 2015.

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

ROSCHE, B. et al. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis?. **Trends in biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 636-643, 2009.

ROSSETTO, P. et al. Specific plant induced biofilm formation in *Methylobacterium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 878-883, 2011.

SAEED, Q. et al. Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: a comprehensive review of effects and mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10529, 2021.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 261-269, 1995.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 123-129, 1954.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47-56, 1987.

SELANDER, R. K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and environmental microbiology**, v. 51, n. 5, p. 873-884, 1986.

SERRA, D.; HENGGE, R. Cellulose in bacterial biofilms. **Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices**, p. 355-392, 2019.

SHARMA, A. et al. Isolation and characterization of salt-tolerant bacteria with plant growth-promoting activities from saline agricultural fields of Haryana, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2021.

SHARMA, I. Bioremediation techniques for polluted environment: concept, advantages, limitations, and prospects. In: **Trace Metals in the Environment-New Approaches and Recent Advances**. IntechOpen, 2020.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2005.

SINGH, D. et al. Plant growth-promoting bacteria and their role in environmental management. In: **Abatement of Environmental Pollutants**. Elsevier, 2020. p. 161-175.

SINGH, V. et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 2, p. 164, 2010.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SUBHASWARAJ, P. et al. Plant Growth Promoting Activity of Pink Pigmented Facultative Methyloph-*Methylobacterium extorquens* MM2 on *Lycopersicon esculentum* L. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 0-4, 2017.

SULTAN, I. et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2066, 2018.

SY, A. et al. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 214-220, 2001.

SYED, S.; TOLLAMADUGU, NVKV P. Role of plant growth-promoting microorganisms as a tool for environmental sustainability. In: **Recent developments in applied microbiology and biochemistry**. Academic Press, 2019. p. 209-222.

TESHIMA, M.; WILLERS, V. P.; SIEBER, V. Cell-free enzyme cascades—application and transition from development to industrial implementation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 79, p. 102868, 2023.

THOMPSON, A. F. et al. Characterizing species interactions that contribute to biofilm formation in a multispecies model of a potable water bacterial community. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 34, 2020.

THORAT, A. A.; SURYANARAYANAN, R. Characterization of phosphate buffered saline (PBS) in frozen state and after freeze-drying. **Pharmaceutical research**, v. 36, n. 7, p. 1-11, 2019.

TIRRY, N. et al. Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: prospects in phytoremediation. **Journal of genetic engineering and biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 613-619, 2018.

ÜNAL T. E. et al. Beneficial biofilm applications in food and agricultural industry. **Health and safety aspects of food processing technologies**, p. 445-469, 2019.

VAN AKEN, B.; YOON, J. M.; SCHNOOR, J. L. Biodegradation of nitro-substituted explosives 2, 4, 6-trinitrotoluene, hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine, and octahydro-1, 3, 5, 7-tetranitro-1, 3, 5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 1, p. 508-517, 2004.

VENTORINO, V. et al. *Methylobacterium populi* VP2: Plant growth-promoting bacterium isolated from a highly polluted environment for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

VERMA, S.; KUILA, A. Bioremediation of heavy metals by microbial process. **Environmental Technology & Innovation**, v. 14, p. 100369, 2019.

VIJAYANAND, N. et al. Potential of pink pigmented methylophilic bacteria on growth and physiology of cluster bean and soil microbial community. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, p. 102161, 2021.

VINCENT, J. M. et al. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria.**, 1970.

WEISBURG, William G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WOOD, A. P. et al. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. **Archives of Microbiology**, v. 169, n. 2, p. 148-158, 1998.

YEO, J. C. C. et al. Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p. 1092-1116, 2018.

YURIMOTO, H.; SHIRAISHI, K.; SAKAI, Y. Physiology of methylotrophs living in the phyllosphere. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 809, 2021.

ZHANG, L. L.; CHEN, J. M.; FANG, F. Biodegradation of methyl t-butyl ether by aerobic granules under a cosubstrate condition. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 3, p. 543-550, 2008.

MATERIAL SUPLEMENTAR 1:**Meio de cultura CAS para detectar a produção de sideróforos**

Para verificar se as bactérias tem a capacidade de produzir sideróforos, as mesmas são cultivadas em meio de cultura CAS. O protocolo para preparar o meio é detalhado abaixo:

Parte solida do meio

Para preparar 100mL do meio adiciona-se:
3.01g de tampão de Pipes dissolvidos em 60mL de água Mili Q, ajusta-se o pH para 6,8 e completa-se o volume até 80mL verificando-se o pH não alterou. Adiciona-se 1,5g de ágar bacteriológico ao final e, posteriormente, se esteriliza em autoclave.

Solução mãe do meio CAS

Esta solução é composta de três soluções:

I - Dissolver 60,5mg de cromoazuroIS (CAS) em 50mL de água Milli Q.

II - Preparar solução estoque de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 100mM. Adicionar 100 μl desse estoque para 9,9mL de HCl 10mM preparado a partir de HCl comercial a 37% ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM).

III - Dissolver 72,9 mg de HDTMA (hexadeciltrimetilamônio de brometo) em 40mL de água Milli Q.

Depois de preparadas as três soluções são misturadas da seguinte forma (1+2) + 3. É importante adicionar o HDTMA lentamente, pois, por se tratar de um detergente pode ocorrer à formação de espuma. Cobre-se o recipiente com papel alumínio para evitar a degradação do meio CAS e se esteriliza em autoclave conservando-o a 4°C posteriormente.