



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

JULIANI BARBOSA DE SOUSA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO SEMIÁRIDO: CARACTERÍSTICAS
ADAPTATIVAS E POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO**

FORTALEZA

2015

JULIANI BARBOSA DE SOUSA

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO SEMIÁRIDO: CARACTERÍSTICAS
ADAPTATIVAS E POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais. Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Claudia Miranda Martins

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suzana Claudia Silveira Martins

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697b Sousa, Juliani Barbosa de.

Bactérias diazotróficas do semiárido: características adaptativas e potencial para biodegradação / Juliani Barbosa de Sousa. – 2023.

34 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Claudia Miranda Martins.

Coorientação: Profa. Dra. Suzana Claudia Silveira Martins.

1. Rizóbio . 2. Fenol. 3. Biofilme. 4. Exopolissacarídeo. I. Título.

CDD 577

JULIANI BARBOSA DE SOUSA

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO SEMIÁRIDO: CARACTERÍSTICAS
ADAPTATIVAS E POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ecologia e
Recursos Naturais da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Ecologia e Recursos Naturais. Área de
concentração: Ecologia e Recursos
Naturais

Aprovada em: 18/09/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Claudia Miranda Martins (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr(a). Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr(a). Olmar Baller Weber
EMBRAPA Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À UFC e ao PPGERN, pela oportunidade.

Às professoras Oscarina, Cândida, Rosilene e Ana de Fátima, pelo auxílio *sine qua non*. Esse trabalho não aconteceria sem suas contribuições inestimáveis.

Às professoras orientadoras Claudia e Suzanna, pela orientação, paciência, auxílio, carinho, exemplo, conhecimento, intervenção e apoio. Muito Obrigada.

A minha família, não posso listar nomes para não esquecer de ninguém, pelo carinho, reuniões, brigas e por estarem ao meu lado.

Aos meus avós, que me criaram, me ajudaram, obrigada.

Aos meus pais, a quem eu devo tudo, incluindo minha vida.

Ao grupo LAMAB, em especial Fernando e Marcelo, os risos, as conversas, as dificuldades, os compartilhamentos. Fizemos um local mágico nos nosso 35 m².

Aos amigos, Alexia, Carla, Danilo, Fernando, Juliana, Kalyl, Larissa, Mailson, Winnie e outros que não estou mencionando. Por me manterem sã.

A todos que fizeram parte desse desafio.

RESUMO

Mecanismos adaptativos de sobrevivência de bactérias diazotróficas do semiárido são importantes para compreensão do processo de estruturação dessas populações e para seleção de estirpes para processos de biorremediação. Neste trabalho estirpes de rizóbios oriundas do solo rizosférico de leguminosas do semiárido foram avaliadas quanto à capacidade de degradação do fenol, formação de biofilme, hidrofobicidade e produção de exopolissacarídeos. As dez estirpes analisadas apresentaram correlação positiva entre a biomassa e o tempo de contato com 100 mg L⁻¹, de fenol. Dessas, três foram hidrofóbicas, sete produziram exopolissacarídeos e todas foram formadoras de biofilme. As estirpes LAMAB17 e LAMAB23 se destacaram na formação de biofilme e eficiência relativa na produção de exopolissacarídeos, respectivamente.

Palavras-chave: Rizóbio; fenol; biofilme; exopolissacarídeos.

ABSTRACT

Survival adaptive mechanisms of diazotrophic bacteria from semiarid are important for understanding the structuring process of these populations and for selection of strains for bioremediation processes. In this work rhizobium strains isolated from of rhizospheric leguminous soil of semiarid were evaluated as the phenol degradation capability, biofilm formation, hydrophobicity and production of exopolysaccharides. The ten strains analyzed were able to grow in minimal medium with 100 mg L⁻¹ of phenol. Between these strains three were hydrophobic, seven were able to produce exopolysaccharides and all were forming biofilms. The strains LAMAB 17 and LAMAB 23 were the most promising in relation to the evaluated parameters.

Keywords: Rhizobium; phenol; biofilm; exopolysaccharides.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
3	MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1	Origem dos isolados	14
3.2	Recuperação e confirmação da pureza das estirpes de rizóbios	14
3.3	Padronização do inóculo	15
3.4	Teste de utilização de fenol	15
3.4.1	Solução padrão de fenol	15
3.4.2	Capacidade de usar fenol como fonte de energia e carbono	15
3.5	Hidrofobicidade	15
3.5.1	Teste de adesão microbiana para o n-hexadecano	15
3.6	Produção de biomassa celular, exopolissacarídeos (EPS) e eficiência relativa na produção de EPS	16
3.7	Formação de biofilme	17
3.8	Análises estatísticas	17
4	RESULTADOS	19
4.1	Teste de utilização de fenol	19
4.2	Hidrofobicidade	20
4.3	Produção de biomassa celular, exopolissacarídeos (EPS) e eficiência relativa na produção de EPS	21
4.4	Formação de biofilme	21
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÕES	26
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	28

REFERÊNCIAS	29
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

As populações microbianas apresentam ampla diversidade e densidade na natureza. São encontradas em todos os ambientes, principalmente no solo, onde desempenham papel fundamental na estruturação de comunidades e nas relações entre diferentes populações, contribuindo para a estabilidade ecológica do ecossistema (Atlas; Bartha, 1997).

Entre as bactérias do solo se destaca o grupo denominado de rizóbios, que induzem a formação de nódulos nas raízes de plantas leguminosas, e convertem nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta (Vieira, 2007, Parmar; Dufresne, 2011, Shankar; Sunutha, 2013). Essas bactérias sofrem exposição natural ao exsudado de substâncias tóxicas, como fenóis, terpenos e alcaloides, liberadas pelas raízes das leguminosas, além de compostos aromáticos resultantes da degradação natural de lignina e ácidos húmicos, bem como de poluentes de origem antropogênica (Chen *et al.*, 1985, Rao *et al.*, 1994). No caso do semiárido, essas bactérias estão sujeitas as variações climáticas limitantes, decorrentes do clima quente e seco, predominante na região.

Sob condições ambientais hostis as bactérias desenvolvem mecanismos adaptativos para sua sobrevivência. Alterações enzimáticas, produção de exopolissacarídeos (EPS), hidrofobicidade e formação de biofilme são exemplos desses mecanismos de estabilidade e resistência as condições de estresse. A formação de biofilme consiste na adesão celular a superfícies bióticas ou abióticas por meio de uma matriz polimérica extracelular (Palmer *et al.*, 1997, Seneviratne; Jayasekara; De Silva, 2011). Portanto, a hidrofobicidade celular aliada à produção de exopolissacarídeos (EPS) também são características adaptativas de sobrevivência (Donlan, 2002, Fujishige *et al.*, 2008, Rinaudi *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2014).

Embora as bactérias diazotróficas sejam muito pesquisadas e exploradas para a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), nesse grupo bacteriano praticamente não é estudado mecanismos adaptativos de sobrevivência em solos do semiárido, bem como, para a seleção de estirpes com potencial aplicação em processos de biorremediação.

Diante do exposto, objetivou-se com esse trabalho que os mecanismos de adaptação de degradação do fenol, hidrofobicidade, produção de polissacarídeos e

formação de biofilme são características de estirpes de bactérias diazotróficas de solos do semiárido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O semiárido brasileiro é uma região com ampla variedade de ambientes, apresentando uma heterogeneidade na vegetação, clima e condições edáficas, amplitudes térmicas elevadas e solos com pouca umidade e oligotróficos (Bressiani *et al.*, 2015). Essas condições são impostas em especial, pelas variações pluviométricas baixas, geralmente abaixo de 800 mm anuais e concentradas em apenas um período do ano, associadas com uma forte intensidade luminosa recebida pela região. Essas condições são desfavoráveis para o crescimento microbiano do solo, a diversidade e atividade microbiana (Gorlach-Lira; Coutinho, 2007).

A microbiota do solo é constituída por: bactérias, actinobactérias, fungos, algas e protozoários (Siqueira *et al.*, 1994, Andreola; Fernandes, 2007). Entre as bactérias, se destacam as diazotróficas, que se apresentam na forma de bacilos, aeróbias, móveis, Gram-negativas e podem ser encontradas tanto na forma livre como associada com leguminosas (Elkan; Bunn, 1992, Moreira *et al.*, 2010). As bactérias noduladoras de leguminosas (nodulíferas) fixadoras de nitrogênio estão classificadas nas subclasses alfa e beta das Proteobacterias e contêm os gêneros *Agrobacterium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bosea*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Mezorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium* (Lindström; Aserse; Mousavi, 2015).

Segundo Rashid *et al.*, (2014), embora estirpes de rizóbios sejam encontradas em regiões semiáridas, a maior diversidade desses micro-organismos é registrada em regiões tropicais, sugerindo que as estirpes que habitam as regiões semiáridas possuem mecanismos de sobrevivência que possibilitam sua permanência em condições adversas. Essa constatação mostra a importância de estudos que permitam um melhor conhecimento sobre as espécies que habitam este tipo de ambiente. Rizóbios também são reconhecidos por sua capacidade em produzir diversas enzimas que permitem a utilização de diferentes substratos orgânicos, como por exemplo, os aromáticos (Oliveira *et al.*, 2006, Kumari; Ram; Mallaiiah, 2010).

O primeiro relato relativo à degradação de compostos aromáticos pelo grupo rizóbio foi de Hussien; Tewfik; Hamdi em 1974. Em seguida, Muthukumar;

Arunakumari; Mahadevan, 1982; reportaram a degradação de *p*-hidroxibenzoato, enquanto que Frassinetti *et al.* (1998), registraram o isolamento da bactéria *Sinorhizobium meliloti* Orange 1, considerada a primeira cepa formadora de nódulos em raízes capaz de degradar dibenzotiofeno. Quan *et al.* (2005), isolaram uma cepa de *Rhizobium daejeonense* sp. de um biorreator para o tratamento de cianeto. Damaj; Ahmad (1996), Ahmad; Mehmannaavaz; Damaj, (1997), Latha; Mahadevan (1997) descreveram o papel de rizóbios na degradação de substâncias aromáticas. Lorite *et al.* (1998), Vela; Hässblom; Youn, (2002), Chen *et al.* (2004), Wei *et al.* (2008), Yang *et al.* (2005), Yang; Lee (2008), Theng *et al.* (2011), Tu *et al.* (2011), González *et al.* (2013) foram responsáveis por estudos deste grupo bacteriano na degradação do fenol.

Fenóis são formados por um anel aromático que contém um ou mais grupos hidroxilas. São ácidos, bactericidas, com efeitos carcinogênicos e mutagênicos (Bolaños *et al.*, 2001). São compostos solúveis em água e solventes orgânicos, altamente móveis, podendo atingir com rapidez as fontes de água, causando problemas de toxicidade para espécies aquáticas, bem como sabor e odor desagradáveis em águas de abastecimento público, mesmo quando presentes em baixas concentrações (Jiang; Tay; Tay, 2002, Michałowicz; Duda, 2007).

Embora biodegradável tanto por via aeróbia como anaeróbia, o fenol é tóxico para a maioria dos micro-organismos, em concentração igual ou superior a 10 mg L⁻¹ (Passos *et al.*, 2009, Park; Brown; Han, 2012). Fenol e seus derivados podem surgir a partir de fontes naturais, como a transformação de lignina, secreção de algas e de processos de humificação de baixa concentração (Gökkaya *et al.*, 2015, Leelavathi; Prasad, 2015, Zhang; Yue; Ma, 2015). Também podem ser encontrados em concentrações elevadas, 107 mg L⁻¹, em despejos industriais (Zeng *et al.*, 2013).

De acordo com Prieto *et al.* (2002), estes compostos são extremamente tóxicos ao homem, tanto por ingestão como por inalação, ainda que em baixas concentrações (1 mg L⁻¹). No Brasil, o Ministério da Saúde determinou que o limite máximo de fenol, permitido em água destinada ao abastecimento público, é de 9 µg L⁻¹ (Brasil, 2011).

A formação de biofilme é uma resposta adaptativa dos micro-organismos a condições ambientais agressivas (Chen; Stewart, 1996, Stewart, 2002, Lambert *et al.*, 2014), que consiste na adesão celular a superfícies sólidas (bióticas ou

abióticas) interligadas em uma matriz polimérica extracelular (Caldwell, 1995, Costerton *et al.*, 1995). A hidrofobicidade celular e a produção de exopolissacarídeos (EPS) são características importantes para a adesão celular e interação com a superfície a ser colonizada, respectivamente (Davies *et al.*, 1998, O'Toole; Kolter, 1998, Toledo-Arana *et al.*, 2001, Vu *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2013, Tran, 2014). Células hidrofóbicas, em comparação com hidrofílicas, possuem maior capacidade de adesão (Ellepola; Samaranyake, 1998, Masuoka; Hazen, 2001).

Assim, micro-organismos com capacidade de biodegradação de compostos orgânicos, que também exibem capacidade para formar biofilmes desempenham relevante papel ecológico no ambiente em que vivem e podem ser selecionados para atuar em processos de biorremediação. É importante considerar que a patogenicidade microbiana é um fator limitante para a seleção de estirpes com potencial para biorremediação *in situ*. Embora a modificação genética seja uma alternativa disponível, pode provocar efeitos na conservação e na utilização da biodiversidade (Gaylarde; Bellinaso; Manfio, 2005). Como as bactérias diazotróficas nodulíferas, em sua maioria, não são patogênicas (Theng *et al.*, 2011, Tu *et al.*, 2011), podem representar um potencial ainda não explorado para degradação de substâncias aromáticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados

As 10 estirpes de rizóbios avaliadas neste estudo são originadas do solo rizosférico de plantas nativas dos municípios de Quixadá (4°58'S a 39°1'O) e Cascavel (4°7'S a 38°14'O), no Ceará e Jardim de Angicos (5°39'S a 35°58'O) no Rio Grande do Norte, ambas na zona climática do semiárido do Nordeste do Brasil. O isolamento, purificação, autenticação e caracterização fenotípica das estirpes foi realizado por Pinheiro *et al.* (2014) segundo metodologia descrita por Vincent (1970). A coleção resultante é constituída por 11 estirpes, codificadas como LAMAB 03, LAMAB 04, LAMAB 08, LAMAB 12, LAMAB 14, LAMAB 17, LAMAB 23, LAMAB 25, LAMAB 26 e LAMAB 29, mantidas em meio de cultura YMA (Ágar extrato de levedura manitol) coberto com glicerol a 28 °C, no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Estirpe	Origem	Lenta	Rápida
LAMAB 3	JARDIM DE ANGICOS	1	0
LAMAB 4	QUIXADÁ	1	0
LAMAB 8	CASCADEL	1	0
LAMAB 12	QUIXADÁ	1	0
LAMAB 14	QUIXADÁ	1	0
LAMAB 17	QUIXADÁ	1	0
LAMAB 23	QUIXADÁ	1	0
LAMAB 25	CASCADEL	1	0
LAMAB 26	CASCADEL	1	0
LAMAB 29	QUIXADÁ	1	0

3.2 Recuperação e confirmação da pureza das estirpes de rizóbios

As 10 estirpes de rizóbios foram inoculadas no meio YMA (Vincent, 1970) e incubadas a 28 ° C, até a visualização de colônias isoladas. A pureza foi avaliada pela observação das características fenotípicas das colônias, as quais foram transferidas para uma nova placa com YMA.

Após o período de incubação a 28 ° C por sete dias, as colônias de cada estirpe foram utilizadas para avaliação dos parâmetros: crescimento na presença de

fenol, hidrofobicidade, produção de exopolissacarídeos (EPS) e formação de biofilme.

3.3 Padronização do inóculo

A viscosidade característica dos rizóbios dificultou a homogeneização celular e o consequente estabelecimento de uma concentração celular semelhante para todas as estirpes. Assim, foi estipulado usar como inóculo padrão para os parâmetros avaliados a densidade óptica a 600 nm (A_{600}), correspondente a duas colônias para cada 100 mL do meio de cultura (Chen *et al.*, 2004).

3.4 Teste de utilização de fenol

3.4.1 Solução padrão de fenol

Uma solução estoque de fenol foi preparada por dissolução de 20 g de fenol (grau de pureza maior do que 99%, Sigma-Aldrich) em 1000 mL de água destilada. Esta solução foi esterilizada separadamente por filtração usando membranas 0,22 microns (Millipore, EUA).

3.4.2 Capacidade de usar fenol como fonte de energia e carbono

As 11 estirpes foram testadas quanto à capacidade de utilizar fenol como única fonte de carbono em meio mineral mínimo suplementado com fenol na concentração de 100 mg L⁻¹. O meio base foi composto por (g L⁻¹): Na₂HPO₄ (6,8), KH₂PO₄ (3,0), NaCl (0,5) e NH₄Cl (0,5). O pH foi ajustado para 6,8 ± 0,2. Uma colônia de cada estirpe procedente do cultivo em placas de YMA foi inoculada em 50 mL do meio base contendo 100 mg L⁻¹ de fenol com leitura da DO inicial, a 600 nm. As culturas foram incubadas a 28 °C com agitação orbital a 125 rpm durante sete dias. A biomassa foi monitorada diariamente medindo-se densidade óptica (DO) a 600 nm (ADO_{600}) (Chen *et al.*, 2004).

3.5 Hidrofobicidade

3.5.1 Teste de adesão microbiana para o n-hexadecano

Alíquotas de 4 mL das suspensões bacterianas em solução salina fosfatada tamponada, pH 7,2, foram misturadas com 400 µL de n-hexadecano e incubadas em banho-maria a 37 °C por 10 min. As suspensões foram agitadas e

deixadas em repouso por 15 a 20 min à temperatura ambiente. O percentual de partição na fase de hidrocarboneto foi calculado pela equação 1.

$$\% \text{ Part} = [\text{OD}_{640\text{nmS}} - \text{OD}_{640\text{nmA}}] / \text{OD}_{640\text{nmS}} \times 100$$

(1)

Onde:

% Part é o percentual de partição na fase de hidrocarboneto;

$\text{OD}_{640\text{nmS}}$ é a densidade óptica da suspensão bacteriana original;

$\text{OD}_{640\text{nmA}}$ é a densidade óptica da fase aquosa.

Valores de %Part > 50%, representam estirpes altamente hidrofóbicas; entre 20% e 50%, de hidrofobicidade moderada e valores < 20% estirpes hidrofílicas (Rosenberg; Doyle, 1990, Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999).

3.6 Produção de biomassa celular, exopolissacarídeos (EPS) e eficiência relativa na produção de EPS

As estirpes foram previamente cultivadas em placas de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970), por seis dias para as estirpes de crescimento lento e três dias para as de crescimento rápido. Em seguida, colônias isoladas foram transferidas para o caldo YM composto por (g L⁻¹): Manitol (10,0); K₂HPO₄ (0,5); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,1); extrato de levedura (0,4) e pH 6,8 que foi incubado sob agitação constante a 150 rpm em um agitador orbital por tempo específico para cada estirpe, a 28 °C. Após esse período cada cultura foi centrifugada a 3792,256 G, na centrífuga Marconi MA 1800, para separação das células bacterianas da solução contendo o EPS. O precipitado foi separado, seco em estufa a 70 °C e pesado, onde a medida de biomassa foi obtida através da diferença entre o peso dos microtubos seco e após a separação do precipitado. Três volumes de etanol 95 °GL, gelados foram adicionados ao sobrenadante que foi centrifugado novamente. Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e os EPS precipitados foram lavados três vezes com etanol gelado. Os EPS foram secos e pesados. A eficiência relativa na produção de EPS foi obtida através da relação entre o total de EPS e a biomassa celular (Fernandes Júnior *et al.*, 2010).

3.7 Formação de biofilme

As estirpes foram avaliadas quanto à formação de biofilme pelo procedimento do ensaio de microtitulação em placas, descrito por O'Toole *et al.* (1999) e modificado por Fujishige *et al.* (2006). As estirpes foram cultivadas em meio RDM (Rhizobia Defined Medium) (K_2HPO_4 , 0,23 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,10 g L⁻¹; glutamato de sódio, 1,10 g L⁻¹; $CaCl_2$, 5 mg L⁻¹; H_3BO_3 , 145 µg L⁻¹; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 125 µg L⁻¹; $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 70 µg L⁻¹; $CuSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 µg L⁻¹; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 4,3 µg L⁻¹; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 108 µg L⁻¹; Na_2MoO_4 , 125 µg L⁻¹; riboflavina, 20 µg L⁻¹; ácido P-aminobenzóico, 20 µg L⁻¹; ácido nicotínico, 20 µg L⁻¹; biotina, 20 µg L⁻¹; tiamina-HCl, 20 µg L⁻¹; piridoxina-HCl, µg L⁻¹; Pantotenato de Ca^{+2} , 20 µg L⁻¹) acrescido de 2% de sacarose, previamente esterilizada por filtração (Bishop *et al.*, 1976).

O volume de 100 µL de cada cepa e 100 µL do meio RDM (controle negativo) foram adicionados aos poços individuais de uma placa de 96 poços. As placas foram seladas com filme adesivo e incubadas a 28 °C. Após sete dias o meio de cultura foi removido e os biofilmes corados com cristal violeta 0,01% por 20 min. O excesso de corante foi removido por três lavagens com água estéril. O corante que permaneceu no biofilme foi estabilizado com álcool 95% e a quantidade de corante foi determinada por medida da DO a 570 nm. A densidade óptica (DO) da solução obtida foi medida utilizando um leitor de microplaca e a massa de biofilme foi registrada como DO_{570} e comparada com a densidade óptica do controle negativo (DO_c). As bactérias foram classificadas pelo esquema de Stepanovic *et al.* (2000) como:

Não produtoras de biofilme: $DO_c \geq DO$

Fracas produtoras biofilme: $DO_c \leq DO \leq 2DO_c$;

Moderadas produtoras de biofilme: $2DO_c \leq DO \leq 4DO_c$;

Fortes produtoras de biofilme: $4DO_c \leq DO$

3.8 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, as médias obtidas foram comparadas pelo teste t a 5% de probabilidade. Para garantir a

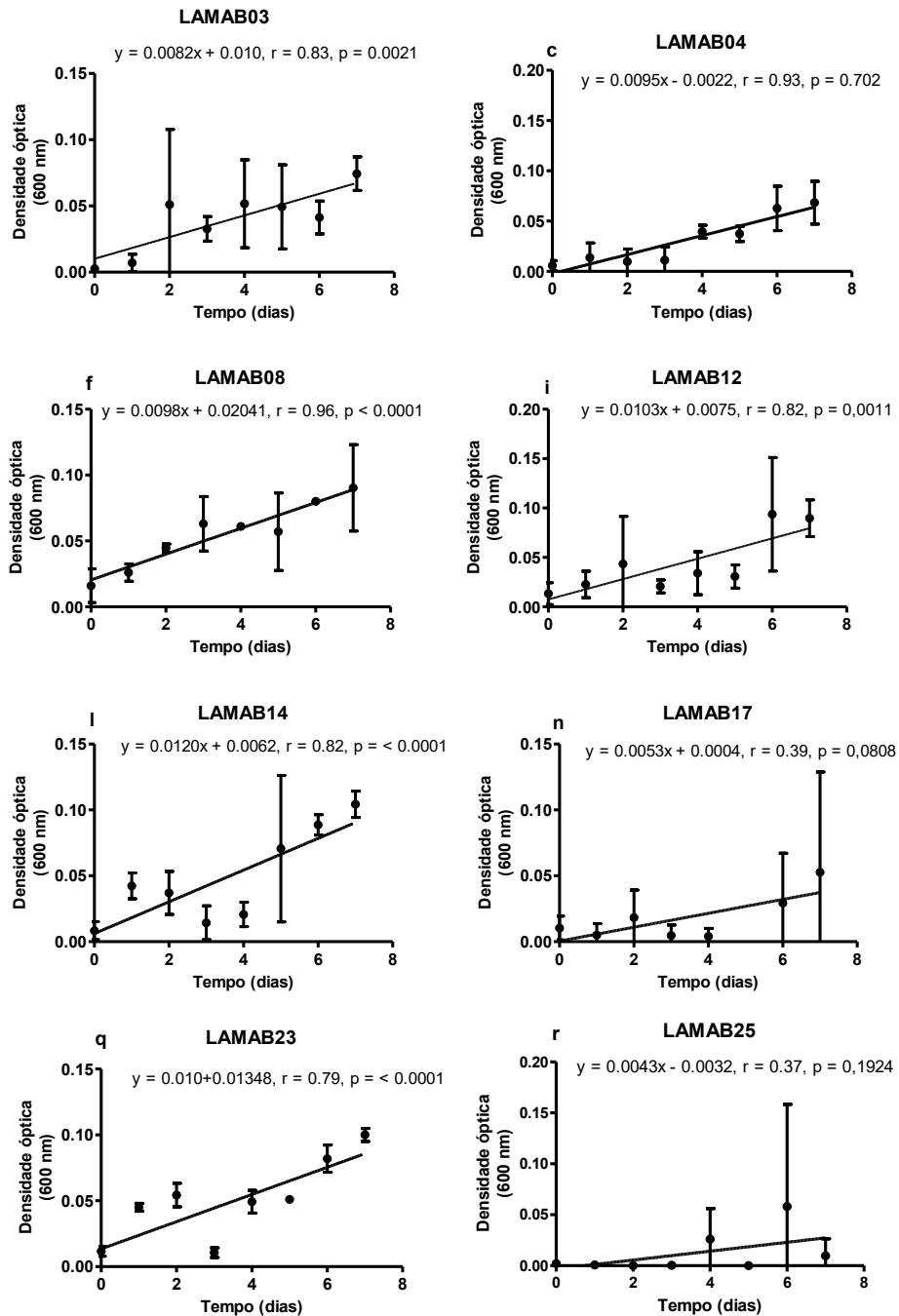
reprodutibilidade cada ensaio foi realizado em triplicatas e repetido pelo menos duas vezes.

Os resultados da análise da capacidade de utilizar o fenol como fonte de energia e carbono foram avaliados por análise de correlação (r) entre a DO e o tempo.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de utilização de fenol

As dez estirpes de bactérias diazotróficas exibiram correlação positiva ($0.3 \leq r \leq 1$) entre a biomassa e tempo de incubação na concentração de 100 mg L^{-1} (Figura 4.1), indicativo do uso do fenol como fonte de carbono.



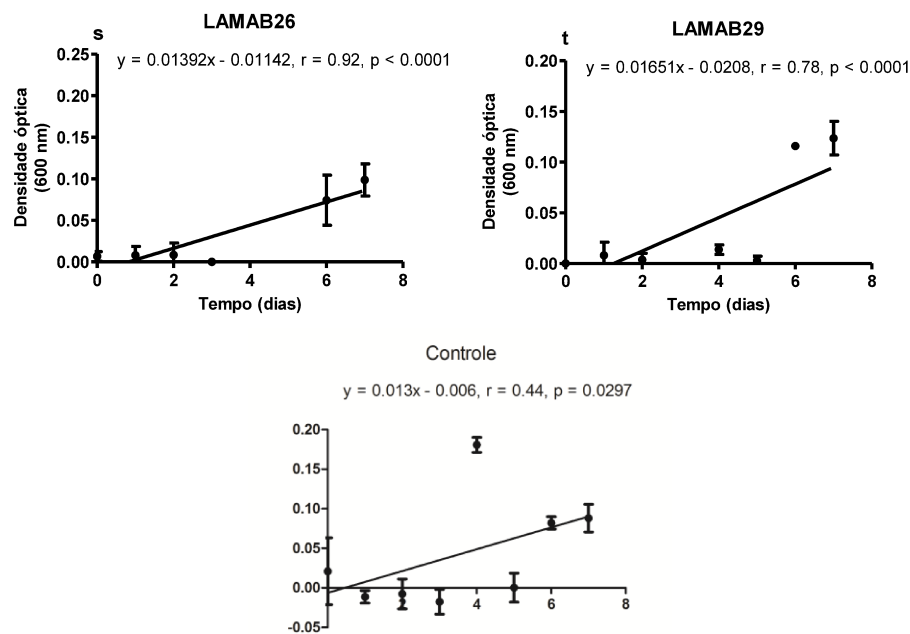


Figura 4.1: Relação entre a Densidade Óptica (DO) e o tempo de contato com fenol na concentração de 100 mg L^{-1} por sete dias das estirpes de rizóbios isoladas do semiárido.

4.2 Hidrofobicidade

As estirpes apresentaram diferentes percentuais de partição na fase de hidrocarboneto (entre -213 e 66), (Figura 4.3). Constata-se que somente as estirpes (LAMAB 08, LAMAB 17 e LAMAB 25) exibiram hidrofobicidade moderada (adesão entre 20% e 50%), nenhuma apresentou hidrofobicidade forte (adesão maior que 50%) e as demais estirpes LAMAB 03, LAMAB 04, LAMAB 12, LAMAB 14, LAMAB 23, LAMAB 26 e LAMAB 29 (63,6%) foram hidrofílicas (adesão menor que 20%).

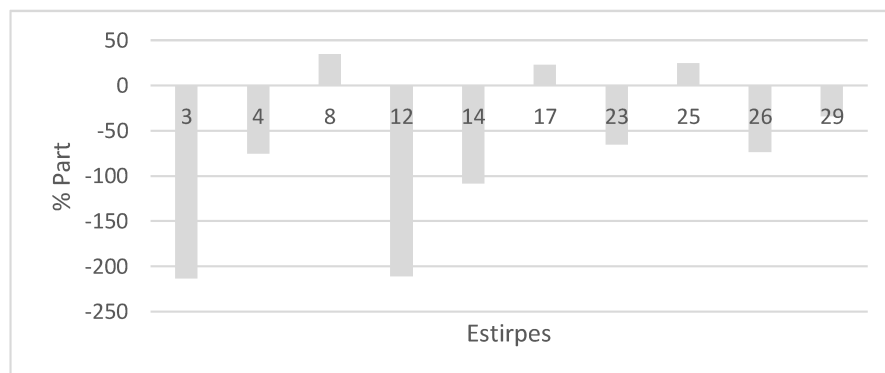


Figura 4.3: Percentual de partição (hidrofobicidade) na fase de hidrocarboneto das estirpes de rizóbios do semiárido.

4.3 Produção de biomassa celular, exopolissacarídeos (EPS) e eficiência relativa na produção de EPS

A produção de biomassa celular apresentou uma variação entre 0,97 g L⁻¹ e 24 g L⁻¹, a produção de EPS, que apresentou valores entre 0,8 e 15,1. As estirpes LAMAB 08, LAMAB23, LAMAB 26 e LAMAB 29, foram as maiores produtoras de EPS com valores de 15,10, 14, 83, 10,26 e 9,37 (Tabela 4.1). No entanto os maiores índices de Eficiência Relativa foram registrados para as estirpes LAMAB 23 com 15,3 e LAMAB 17 e LAMAB 29, com valores de 6,39 e 6,10, respectivamente. Estes resultados mostram a influência da biomassa para seleção de estirpes produtoras de EPS. As estirpes LAMAB 04 e LAMAB 25 exibiram eficiências superiores a 1,00 (1,40 e 2,10), enquanto as estirpes LAMAB 08 e LAMAB 26 mostraram índices de eficiência, menores que 1,00 (0,63 e 0,61).

Tabela 4.1: Produção biomassa celular, exopolissacarídeos (EPS) e eficiência relativa de produção de EPS das estirpes de rizóbios do semiárido

Estirpes	Produção (g L ⁻¹)		Eficiência relativa (EPS/Biomassa)
	Biomassa	EPS	
3	1	4,7667	-4,76666667
4	5,766667	8,0667	1,398843931
8	24,1	15,1000	0,626556017
12	2,833333	6,7333	2,376470588
14	3,733333	0,8667	0,232142857
17	1,466667	9,3667	6,386363636
23	0,966667	14,8333	15,34482759
25	3	6,3333	2,111111111
26	10,9	6,6333	0,608562691
29	1,7	10,2667	6,039215686

4.4 Formação de biofilme

As estirpes LAMAB 08 e LAMAB 25, foram classificadas como moderadas produtores de biofilme. Todas as outras estirpes foram fortes produtoras de biofilme (Figura 4.4).

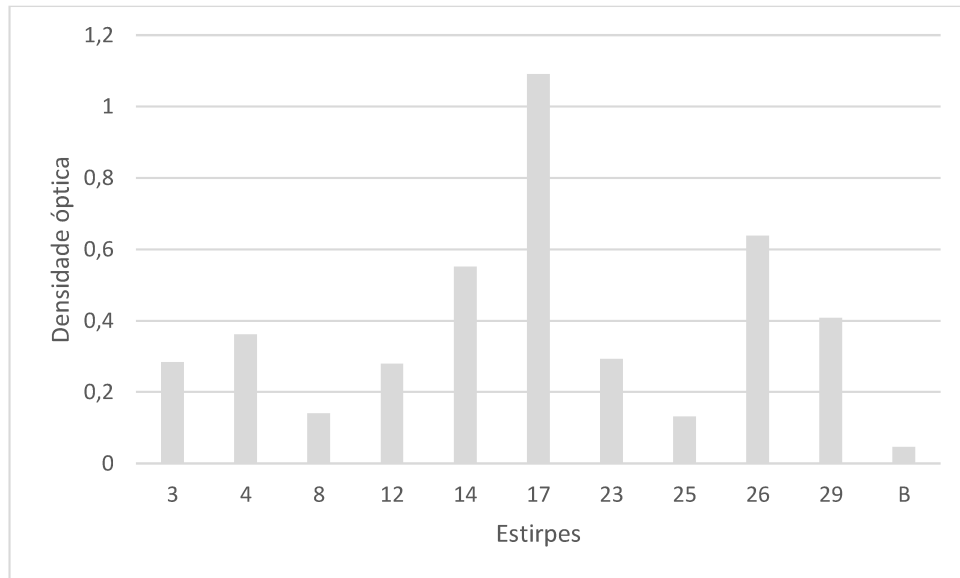


Figura 4.4: Produção de biofilme representada pelos valores de Densidade Óptica (DO) a 570 nm das estirpes de bactérias diazotróficas do semiárido

5 DISCUSSÃO

Os micro-organismos do solo participam dos ciclos geoquímicos e na degradação de substâncias químicas contribuindo para a disponibilização de nutrientes indispensáveis ao crescimento de outros organismos, como por exemplo, as plantas. Quando esses compostos químicos, de origem natural ou resultante de atividades antropogênicas, são de natureza tóxica e recalcitrantes são denominados poluentes, e seu acúmulo no ambiente altera o equilíbrio ecológico do ecossistema (Siqueira *et al.*, 1994).

As bactérias podem desempenhar importante papel na degradação de compostos fenólicos, destacando-se os gêneros como: *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Cupriavidus*, *Klebsiella*, *Bacillus* e *Rhodococcus* (Koutny; Ruzicka; Chlachula, 2003). Os gêneros de rizóbios capazes de degradar resíduos fenólicos descritos na literatura, são *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Hussien *et al.*, 1974, Wei *et al.*, 2008, Imran *et al.*, 2014), porém, na presente revisão de literatura, nenhum registro sobre degradação de fenol com bactérias diazotróficas nodulíferas oriundas do semiárido foi encontrado.

Neste trabalho, 10 estirpes de rizóbios foram capazes de utilizar fenol na concentração de 100 mg L⁻¹ como única fonte de carbono, em um meio sem elementos traços ou vitaminas. Esses resultados mostram a resistência dessas estirpes para sobrevivência em ambientes poluídos com referida substância. Chen *et al.* (2004), trabalhando com a espécie de rizóbio, *Cupriavidus taiwanensis*, constatou a degradação do fenol até a concentração de 900 mg L⁻¹, já Tabib *et al.* (2012) também trabalhando com o gênero *Cupriavidus*, relataram uma degradação de até 1100 mg L⁻¹. Como as estirpes do presente trabalho usaram fenol nas concentrações de 100 mg L⁻¹, são promissoras para processos de biorremediação de ambientes impactados, uma vez que a literatura registra a concentração máxima de fenol em áreas poluídas de 0,4 mg L⁻¹ (Groll *et al.*, 2015). Ressalte-se ainda que, mesmo em águas residuárias industriais, siderúrgicas e petroquímicas, onde o fenol é um dos principais poluentes químicos, as concentrações variam de 10 a 300 mg L⁻¹ (Marrot *et al.*, 2006, Bodalo *et al.*, 2008, Agarry *et al.*, 2008, Jayachandran; Kunhi, 2009). Essa constatação reforça a capacidade dessas estirpes para tratamento biológico de efluentes industriais antes do descarte no meio ambiente. Além do potencial para biorremediação *in situ* as estirpes de rizóbios caracterizadas no presente estudo, são muito importantes nas relações bióticas e abióticas que, em

síntese, mantém o ecossistema solo em equilíbrio, reforçando a importância de mais estudos sobre a ecologia dessa população microbiana no semiárido brasileiro.

Zinjarde *et al.* (2014) citam que micro-organismos constantemente expostos a poluentes aromáticos como o fenol e derivados, podem desenvolver enzimas capazes de degradá-los. Considerando que as estirpes de rizóbios do presente estudo foram coletadas de locais isentos de poluição antropogênica, é possível conjecturar que o uso de fenol nas concentrações avaliadas, seja uma característica intrínseca dessas estirpes.

A formação de exopolissacarídeos, em geral, está associada à hidrofobicidade, característica importante no processo de adesão celular (Grinnel; Fred, 1982) No entanto, pesquisas sobre essa relação entre estirpes de rizóbios não foram encontradas na literatura. Por isso, os valores desses parâmetros das estirpes avaliadas nesse trabalho foram comparados com o de outras espécies bacterianas. Assim, Joyanes *et al.* (2000) mostraram que não existia relação entre hidrofobicidade e formação de EPS para *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Por outro lado, Dertli; Mayer; Narbad (2015) observaram que a elevada produção de EPS por *Lactobacillus johnsonii* FI9785 reduziu a hidrofobicidade da estirpe, sugerindo uma relação inversa entre os dois parâmetros. No presente trabalho, com exceção da estirpe LAMAB 08 que apresentou uma relação diretamente proporcional entre hidrofobicidade e EPS, as demais exibiram uma relação inversa entre esses parâmetros, isto é, as estirpes menos hidrofóbicas, formaram maior quantidade de EPS. Esses resultados sugerem que não é possível estabelecer uma relação padrão entre hidrofobicidade e produção de EPS para as estirpes de rizóbios isoladas de uma região do semiárido avaliadas neste estudo.

Para Sayed *et al.* (2015), hidrofobicidade e produção de exopolissacarídeos são mecanismos microbianos de defesa relacionados ao grau de poluição ambiental Essa relação é confirmada nos resultados de Farrel; Quilty (2002) que observaram o aumento da hidrofobicidade em *Pseudomonas putida* quando se elevou a toxicidade do meio. Nessa perspectiva, o baixo índice de hidrofobicidade entre as estirpes avaliadas neste estudo, pode ser relacionada à reduzida poluição ambiental por atividades antropogênicas, na área de estudo. Para a produção de EPS, experimentos com *Enterobacter* confirmaram a relação entre esse composto e resistência a substâncias tóxicas (Sayed *et al.*, 2015).

Em média, os valores de EPS, produzidos por rizóbios, disponíveis na literatura foram de 7,08 g L⁻¹, 6,40 g L⁻¹, 5,52 g L⁻¹ e 4,8 g L⁻¹ (Staudt; Wolfe; Shorout, 2012, Castellane; Lemos; Lemos, 2014, Sun *et al.*, 2015). As estirpes do presente estudo produziram EPS entre 6,6 e 15,1 g L⁻¹, acima da média dos valores acima registrados, mas inferior 20 g L⁻¹ descrito por Moosavi-Navab *et al.* (2012) para *Agrobacterium radiobacter*. Essa variação pode ser devido a fatores como: como temperatura, pH e composição do meio de cultura (Zhou *et al.*, 2014).

Com exceção das estirpes LAMAB 08 e LAMAB 26, as demais apresentaram valores de eficiência relativa maiores que 1,0. Embora a estirpe LAMAB 08 tenha se destacado na produção de EPS, sua eficiência relativa, quantidade de EPS por biomassa, foi uma das mais baixas registradas. Esse resultado reflete a importância da biomassa para seleção de estirpes produtoras de EPS. A LAMAB 23 demonstrou a maior eficiência relativa máxima, 15,3. Fernandes Júnior *et al.* (2010), estudando rizóbios de nódulos de Gandu (*Cajanus cajan*), relataram uma eficiência relativa máxima de 3,15. Esse resultado reforça a importância da estirpe LAMAB 23 tanto em termos ecológicos como com relação ao potencial biorremediador.

Biofilmes se constituem uma forma de proteção da célula que permite uma maior chance de sobrevivência a situações de estresses (Knierim *et al.*, 2015), sendo a produção de EPS fundamental nesse processo (Zhang *et al.*, 2015). A LAMAB 17 destacou-se com a maior produtora de biofilme. Dessa forma, é provável que exista uma relação direta entre essas duas características. No entanto, assim como observado para a relação hidrofobicidade EPS, a relação entre EPS e biofilme também variou entre as estirpes avaliadas. A produção de biofilme por todas as estirpes testadas pode estar relacionada à simbiose entre bactéria diazotróficas e leguminosas onde a produção de biofilme é importante para a infecção da planta (Frederix *et al.*, 2015).

6 CONCLUSÕES

Estirpes de bactérias diazotróficas do semiárido foram capazes de usar fenol como fonte de carbono e energia, produzir exopolissacarídeos e formar biofilme. As estirpes LAMAB 17 e LAMAB 23 se destacaram na formação de biofilme e na produção de exopolissacarídeos, respectivamente. Essas estirpes apresentam potencial para aplicação em processos de biorremediação.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho o objetivo principal foi avaliar o potencial de estirpes de bactérias diazotróficas noduladoras de leguminosas do semiárido do Nordeste brasileiro para degradação de fenol, *in vitro*. Essa pesquisa foi importante para ampliar o conhecimento sobre bactérias do semiárido, já que nessa região são escassos estudos sobre o assunto.

Em relação as outras análises, foram mais difíceis devido a ajustes de metodologia necessários para se adaptarem as estirpes estudadas, porém também contribuíram para elucidar dúvidas sobre a coleção de bactérias nodulíferas estudadas, como seu potencial de produção de exopolissacarídeos, e permitiu gerar mais algumas perguntas.

A formação de biofilme foi a parte mais difícil desse trabalho, devido a complexidade do meio e a necessidade de adaptar o tempo de crescimento das bactérias. Algumas análises pensadas originalmente não puderam ser feitas, devido a infraestrutura, deixando algumas perguntas não respondidas.

Esse trabalho foi importante para aprimorar pesquisas com biorremediação utilizando bactérias tão importantes da agricultura e para iniciar estudos nessa área com bactérias do semiárido.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Após as pesquisas realizadas recomenda-se continuar com as avaliações para mostrar o potencial dessas bactérias. Aumentar as concentrações de fenol, verificar o resíduo dessa degradação, estudar a composição dos exopolissacarídeos e o tempo de produção, estudar uma relação entre hidrofobicidade, biofilme e exopolissacarídeos, testar a autoagregação são algumas das análises sugeridas.

REFERÊNCIAS

- AGARRY, S. E.; SOLOMON, B. O. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Environmental Science & Technology**, v. 5, p. 223-232, 2008.
- AHMAD, Darakhshan; MEHMANNAVAZ, Reza; DAMAJ, Mona. Isolation and characterization of symbiotic N₂-fixing *Rhizobium meliloti* from soils contaminated with aromatic and chloroaromatic hydrocarbons: PAHs and PCBs. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 39, n. 1, p. 33-43, 1997.
- ANDREOLA, Faustino; FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo das culturas. **Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônômico**, p. 21-37, 2007.
- ATLAS, Ronald M. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Pearson Education India, 1998.
- BISHOP, Paul E. et al. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant Physiology**, v. 57, n. 4, p. 542-546, 1976.
- BODALO, A. et al. Phenol removal from water by hybrid processes: study of the membrane process step. **Desalination**, v. 223, n. 1-3, p. 323-329, 2008.
- BOLAÑOS, R. M. L. et al. Phenol degradation in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor under mesophilic conditions. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 167-174, 2001.
- CALDWELL, Douglas E. **Cultivation and study of biofilm communities**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1995.
- CALLEGARI-JACQUES, Sidia M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Artmed Editora, 2009.
- CASTELLANE, Tereza Cristina Luque et al. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 74, p. 515-522, 2015.
- CASTELLANE, Tereza Cristina Luque; LEMOS, Manoel Victor Franco; DE MACEDO LEMOS, Eliana Gertrudes. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191-197, 2014.
- CHEN, Wen-Ming et al. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 8, p. 672-680, 2004.
- CHEN, Xiao; STEWART, Philip S. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction– diffusion interaction. **Environmental science & technology**, v. 30, n. 6, p. 2078-2083, 1996.
- CHEN, Y. P.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. Aromatic metabolism in *Rhizobium trifolii*-catechol 1, 2-dioxygenase. **Archives of microbiology**, v. 141, p. 225-228, 1985.

- COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms: Annual Reviews of Microbiology, v. 49. 1995..
- COSTERTON, J. William; STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. Peter. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- DA UNIÃO, Diário Oficial. Portaria N. 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. **Diário Oficial da União: Brasília, Brazil**, 2011.
- DAMAJ, Mona; AHMAD, Darakhshan. Biodegradation of polychlorinated biphenyls by rhizobia: a novel finding. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 218, n. 3, p. 908-915, 1996.
- DAVIES, David G. et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998.
- DE ALMEIDA BRESSIANI, Danielle et al. Review of soil and water assessment tool (SWAT) applications in Brazil: Challenges and prospects. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**, v. 8, n. 3, p. 9-35, 2015.
- DE SOUZA MOREIRA, Fatima Maria et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74-74, 2010.
- DERTLI, Enes; MAYER, Melinda J.; NARBAD, Arjan. Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in *Lactobacillus johnsonii* FI9785. **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.
- DONLAN, Rodney M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- ELKAN, G. H.; BUNN, C. R. The rhizobia. 2197–2213 In Balows A., Truper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.-H.(ed.) **The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd**, v. 3, 1992.
- ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **Archives of oral biology**, v. 43, n. 11, p. 879-887, 1998.
- FARRELL, A.; QUILTY, B. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 316-324, 2002.
- FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan et al. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p. 1465-1471, 2010.
- FRASSINETTI, Stefania et al. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. **Canadian journal of microbiology**, v. 44, n. 3, p. 289-297, 1998.
- FREDERIX, Marijke et al. Mutation of *praR* in *R. hizobium leguminosarum* enhances root biofilms, improving nodulation competitiveness by increased expression of attachment proteins. **Molecular microbiology**, v. 93, n. 3, p. 464-478, 2014.

FUJISHIGE, Nancy A. et al. Investigations of Rhizobium biofilm formation. **FEMS microbiology ecology**, v. 56, n. 2, p. 195-206, 2006.

FUJISHIGE, Nancy A. et al. Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. **Molecular microbiology**, v. 67, n. 3, p. 504-515, 2008.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; MANFIO, G. P. BIORREMEDIAÇÃO: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2005.

GÖKKAYA, Dilek Selvi et al. Supercritical water gasification of phenol as a model for plant biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 34, p. 11133-11139, 2015.

GONZÁLEZ, Paola S. et al. Brassica napus hairy roots and rhizobacteria for phenolic compounds removal. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 1310-1317, 2013.

GORLACH-LIRA, Krystyna; COUTINHO, Henrique DM. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 135-141, 2007.

GRINNELL, Frederick; FELD, Marian K. Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 9, p. 4888-4893, 1982.

GROLL, M. et al. Water quality, potential conflicts and solutions—an upstream–downstream analysis of the transnational Zarafshan River (Tajikistan, Uzbekistan). **Environmental Earth Sciences**, v. 73, p. 743-763, 2015.

HUSSIEN, Yosr A.; TEWFIK, M. S.; HAMDY, Y. A. Degradation of certain aromatic compounds by rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 6, n. 6, p. 377-381, 1974.

IMRAN, Asma et al. Ochrobactrum sp. Pv2Z2 exhibits multiple traits of plant growth promotion, biodegradation and N-acyl-homoserine-lactone quorum sensing. **Annals of microbiology**, v. 64, p. 1797-1806, 2014.

JAYACHANDRAN, V. P.; KUNHI, A. A. M. Degradation of 3-chlorobenzoate and phenol singly and in mixture by a mixed culture of two ortho-pathway-following Pseudomonas strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 219-227, 2009.

JIANG, H.-L.; TAY, J.-H.; TAY, ST-L. Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 439-445, 2002.

JOYANES, P. et al. In vitro adherence of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium to urinary catheters. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p. 124-127, 2000.

KNIERIM, Christian et al. Living composites of bacteria and polymers as biomimetic films for metal sequestration and bioremediation. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 8, p. 1052-1059, 2015.

- KOUTNY, Marek; RUZICKA, Jan; CHLACHULA, Jiri. Screening for phenol-degrading bacteria in the pristine soils of south Siberia. **Applied Soil Ecology**, v. 23, n. 1, p. 79-83, 2003.
- KUMARI, B. S.; RAM, M. R.; MALLAIAH, K. V. Studies on nodulation, biochemical analysis and protein profiles of Rhizobium isolated from Indigofera species. **Malay J Microbiol**, v. 6, p. 133-139, 2010.
- LAMBERT, Guillaume et al. Physics of biofilms: the initial stages of biofilm formation and dynamics. **New Journal of Physics**, v. 16, n. 4, p. 045005, 2014.
- LATHA, S.; MAHADEVAN, A. Role of rhizobia in the degradation of aromatic substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 601-607, 1997.
- LEELAVATHI, M. S. et al. Comparative analysis of phytochemical compounds of marine algae isolated from Gulf of Mannar. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (WJPPS)**, v. 4, n. 5, p. 640-654, 2015.
- LINDSTRÖM, Kristina; AMSALU ASERSE, Aregu; MOUSAVI, Seyed Abdollah. Evolution and taxonomy of nitrogen-fixing organisms with emphasis on rhizobia. **Biological nitrogen fixation**, p. 21-38, 2015.
- LORITE, María J. et al. Characterization of Bradyrhizobium japonicum pcaBDC genes involved in 4-hydroxybenzoate degradation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1397, n. 3, p. 257-261, 1998.
- MARROT, B. et al. Biodegradation of high phenol concentration by activated sludge in an immersed membrane bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. 174-183, 2006.
- MASUOKA, James; HAZEN, Kevin C. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in Candida albicans serotype A and B strains. **Infection and immunity**, v. 72, n. 11, p. 6230-6236, 2004.
- MATTOS-GUARALDI, Ana Luiza; FORMIGA, Luiz Carlos Duarte; ANDRADE, Arnaldo Feitosa Braga. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting Corynebacterium diphtheriae strains evaluated by different methods. **Current microbiology**, v. 38, p. 37-42, 1999.
- MEHMANNAVAZ, Reza; PRASHER, Shiv O.; AHMAD, Darakhshan. Cell surface properties of rhizobial strains isolated from soils contaminated with hydrocarbons: hydrophobicity and adhesion to sandy soil. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 683-688, 2001.
- MICHAŁOWICZ, J.; DUDA, W. Phenols--Sources and Toxicity. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 3, 2007.
- MOOSAVI-NASAB, Marzieh et al. Structural and rheological properties of succinoglycan biogums made from low-quality date syrup or sucrose using agrobacterium radiobacter inoculation. **Food and bioprocess technology**, v. 5, p. 638-647, 2012.
- MUTHUKUMAR, G.; ARUNAKUMARI, A.; MAHADEVAN, A. Degradation of aromatic compounds by Rhizobium spp. **Plant and Soil**, v. 69, p. 163-169, 1982.

OLIVEIRA, Arlem Nascimento de et al. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 204-210, 2006.

O'TOOLE, George A. et al. [6] Genetic approaches to study of biofilms. **Methods in enzymology**, v. 310, p. 91-109, 1999.

O'TOOLE, George A.; KOLTER, Roberto. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

PALMER, Robert J.; WHITE, David C. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. **Trends in microbiology**, v. 5, n. 11, p. 435-440, 1997.

PARK, Ji-Sook; BROWN, Murray T.; HAN, Taejun. Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata*. **Aquatic Toxicology**, v. 106, p. 182-188, 2012.

PARMAR, Nagina; DUFRESNE, Jaimie. Beneficial interactions of plant growth promoting rhizosphere microorganisms. **Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol**, p. 27-42, 2011.

PASSOS, Cátia Tavares dos et al. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 950-954, 2009.

PINHEIRO, Marcelo et al. Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.

PRIETO, M. et al. Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in an air-stirred reactor with clarifier. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 58, p. 853-860, 2002.

QUAN, Zhe-Xue et al. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 55, n. 6, p. 2543-2549, 2005.

RAO, K. R. et al. Antagonistic activities of actinobacteria from mangrove sediment. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci**, v. 4, n. 1, p. 364-367, 2012.

RASHID, M. Harun-or et al. *Rhizobium leguminosarum* is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 1, p. 64-77, 2014.

RINAUDI, Luciana V. et al. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS microbiology letters**, v. 302, n. 1, p. 15-21, 2010.

ROSENBERG, M.; DOYLE, R. J. Microbial cell surface hydrophobicity: history, measurement, and significance. 1990.

SAYYED, R. Z.; PATEL, P. R.; SHAIKH, S. S. Plant growth promotion and root colonization by EPS producing *Enterobacter* sp. RZS5 under heavy metal contaminated soil. 2015.

- SENEVIRATNE, Gamini et al. Developed microbial biofilms can restore deteriorated conventional agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 1059-1062, 2011.
- SHANKAR, V. S. S. et al. Analysis of soil fertilizing capabilities, growth and enzyme production statistics for symbiotic nitrogen fixing bacteria VIT SS5 screened from Palar region, Vellore. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, 2013.
- SIQUEIRA, José Oswaldo et al. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. 1994.
- STAUDT, Ann K.; WOLFE, Lawrence G.; SHROUT, Joshua D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of microbiology**, v. 194, p. 197-206, 2012.
- STEPANOVIĆ, Srdjan 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.
- STEWART, Philip S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. **International journal of medical microbiology**, v. 292, n. 2, p. 107-113, 2002.
- SUN, Baojiang et al. Optimization of cultural conditions for extracellular polymeric substances (eps) production by burkholderia using response surface methodology. In: **Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume II**. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 295-303.
- TABIB, A. et al. BIODEGRADATION OF PHENOL BY NEWLY ISOLATED PHENOL-DEGRADING BACTERIUM RALSTONIA SP. STRAIN PH-S1 (RESEARCH NOTE). 2012.
- TAVERNIER, Patricia et al. Exopolysaccharide and poly-(beta)-hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 21-26, 1997.
- TENG, Ying et al. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1271-1276, 2011.
- TOLEDO-ARANA, Alejandro et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, 2001.
- TRAN, Cindy S. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type III translocon is required for biofilm formation at the epithelial barrier. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 11, p. e1004479, 2014.
- TU, Chen et al. Potential for biodegradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1438-1444, 2011.
- VELA, Sonia; HÄGGBLÖM, Max M.; YOUNG, L. Y. Biodegradation of aromatic and aliphatic compounds by rhizobial species. **Soil science**, v. 167, n. 12, p. 802-810, 2002.

VIEIRA, R. F. Diversidade e taxonomia de rizóbio. 2007.

VINCENT, James Matthew 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.

VU, Barbara et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, 2009.

WEI, Gehong et al. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopterus* in mining tailing region. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 1, p. 111-117, 2008.

WU, Hsuan-Chen et al. Autonomous bacterial localization and gene expression based on nearby cell receptor density. **Molecular systems biology**, v. 9, n. 1, p. 636, 2013.

YANG, Chu-Fang; LEE, Chi-Mei. Enrichment, isolation, and characterization of 4-chlorophenol-degrading bacterium *Rhizobium* sp. 4-CP-20. **Biodegradation**, v. 19, p. 329-336, 2008.

YANG, Hung-Chi et al. Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 20, p. 6991-6997, 2005.

ZENG, Zequan et al. Degradation of phenol by ozone in the presence of Fenton reagent in a rotating packed bed. **Chemical Engineering Journal**, v. 229, p. 404-411, 2013.

ZHANG, R. Y. et al. Use of lectins to in situ visualize glycoconjugates of extracellular polymeric substances in acidophilic archaeal biofilms. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 448-461, 2015.

ZHANG, Yingchao; YUE, Dongbei; MA, Hong. Darkening mechanism and kinetics of humification process in catechol-Maillard system. **Chemosphere**, v. 130, p. 40-45, 2015.

ZHOU, Fangfang et al. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 362-368, 2014.

ZINJARDE, Smita et al. *Yarrowia lipolytica* and pollutants: interactions and applications. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 920-933, 2014.