



Revista Brasileira de Geografia Física

Homepage: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbge>



Potencial para Degradação do Fenol por Estirpes de *Bradyrhizobium* do Semiárido nas Formas Livre e Imobilizada

¹Juliani Barbosa de Sousa²; Claudia Miranda Martins³; Leonardo Lima Bandeira⁴; Fernando Gouveia Cavalcante⁵; Ariel de Figueiredo Nogueira Mesquita⁶; João Moreira de Matos Neto⁷; Suzana Claudia Silveira Martins⁸

¹O texto é parte da dissertação de mestrado do primeiro autor no âmbito do Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará.

²Doutora em Ecologia e Recursos Naturais, UFC. E-mail: julianibarbosadesousa@gmail.com

³Prof^a. Dr^a. Departamento de Biologia, UFC. E-mail: claudiamartins@ufc.br

⁴Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, UFC. E-mail: leonardolbandeira@gmail.com

⁵Doutor em Ecologia e Recursos Naturais, UFC. E-mail: fernandogouveia.c@gmail.com

⁶Mestrando do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, UFC. E-mail: arielmesquita26@alu.ufc.br

⁷Mestrando do Programa de Pós Graduação em Bioquímica, UFC. E-mail: neto.j2802@gmail.com

⁸Prof^a. Dr^a. Departamento de Biologia, UFC. E-mail: suzanac@ufc.br

Artigo recebido em 18/03/2023 e aceito em 24/01/2024

RESUMO

O descarte de águas residuárias é um grave problema de poluição ambiental, que tem refletido na busca por microrganismos que aliem a capacidade de biodegradação e ausência de patogenicidade. Por atender ambos os critérios, as bactérias simbióticas de leguminosas são agentes promissores. Essas bactérias também produzem exopolissacarídeos e biofilme, parâmetros determinantes para imobilização celular, estratégia para aumentar a eficiência na degradação de poluentes. A atualidade, importância do tema e o potencial biorremediador ainda inexplorado dessas bactérias oriundas do Semiárido Brasileiro são justificativas para o presente trabalho. Foram selecionadas sete estirpes de rizóbios do semiárido, previamente caracterizadas, autenticadas, identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA e mantidas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. Essas estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de crescer em meio com fenol nas concentrações de 100 e 500 mg.L⁻¹. Por apresentar melhor desempenho a estirpe L04 (*Bradyrhizobium elkanii*), foi testada quanto à hidrofobicidade, produção de exopolissacarídeos e de biofilme. A estirpe foi hidrofóbica, produziu exopolissacarídeos e biofilme, se confirmando adequada para a imobilização sobre a matriz agar-agar. Quando imobilizada, a estirpe foi 1,4 vezes mais eficiente na produção de biomassa do que na forma livre. Dessa forma, fica claro que rizobactérias do Semiárido apresentam potencial biorremediador, e que cabem mais estudos para se avaliar esse potencial *in situ* visando o desenvolvimento de um produto.

Palavras-chave: Biofilme; Biorremediação; Exopolissacarídeo; Imobilização Celular; Rizóbio.

Potential for Phenol Degradation by Strains of *Bradyrhizobium* from the Brazilian Semiarid in Free and Immobilized Forms

ABSTRACT

The incorrect disposal of wastewater is a serious environmental pollution problem. This can be reflected in the search for microorganisms that combine the ability to biodegrade these contaminants and are safe for use. Legume symbiotic bacteria are promising in this field since they are both efficient in breaking contaminants and are safe to handle. These bacteria also produce exopolysaccharides and biofilm, which are essential parameters for cell immobilization which in turn is a strategy to increase efficiency in the degradation of pollutants. The importance of the subject and the still unexplored bioremediation potential of these bacteria from the Brazilian Semiarid are the highlights of this study. Seven rhizobia strains from a Semiarid region were selected, characterized, authenticated and identified by sequencing the 16S rRNA gene and kept in the culture collection of the Laboratory of Environmental Microbiology of the Department of Biology of the Federal University of Ceará. These strains were evaluated for their ability to grow in medium with phenol at

concentrations of 100 and 500 mg. L⁻¹. Due to its better performance, the L04 strain (*Bradyrhizobium elkanii*) was tested for hydrophobicity, exopolysaccharide and biofilm production. This strain was hydrophobic, produced exopolysaccharides and biofilm, which confirms it is suitable for immobilization in the agar-agar matrix. When immobilized, the strain was 40% more efficient in producing biomass than in the free form. We conclude that rhizobacteria from the semiarid region have bioremediating potential, but more studies are needed to evaluate this potential *in situ*, aiming at the development of a product.

Keywords: Biofilm; Bioremediation; Cell Immobilization; Exopolysaccharides; Rhizobia.

Introdução

A poluição por águas residuárias é uma ameaça crescente para a conservação dos recursos naturais. A fim de solucionar esse problema, os tratamentos biológicos têm chamado cada vez mais atenção, com destaque para os tratamentos utilizando microrganismos. Esses organismos representam a mais antiga e numerosa forma de vida da terra e sua história genômica oferece indícios do processo evolutivo às mudanças no ambiente que ocorreram em centenas de milhões de anos (Merino *et al.*, 2019). Alterações enzimáticas, produção de substâncias polissacarídicas e formação de biofilmes são exemplos de mecanismos adaptativos que contribuem para a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis (Shi *et al.*, 2022).

Nesta perspectiva, os microrganismos são ferramentas inovadoras para o controle da poluição ambiental (Malla *et al.*, 2018), definida como qualquer alteração física, química ou biológica que modifica de forma deletéria o ciclo biológico normal e interfere na composição da fauna e da flora do meio (Naidu *et al.*, 2021). A poluição química, decorrente principalmente dos despejos industriais, é uma das que mais impactam o meio ambiente (Wang *et al.*, 2020).

Os resíduos orgânicos presentes na água residual da indústria química costumam ser tóxicos, mutagênicos, teratogênicos e/ou carcinogênicos, e são muito mais perigosos para os seres humanos e o meio ambiente do que os resíduos da indústria comum. Além disso, são muito resistentes à degradação, apresentando uma reduzida demanda bioquímica de oxigênio. O potencial deletério desses químicos já é bem conhecido e debatido, mas é necessário se conhecer seu potencial reuso como fontes de carbono e de bioenergia (Kong *et al.*, 2019).

As substâncias aromáticas estão entre os principais poluentes dos efluentes líquidos e são oriundas de atividades industriais, tais como química, têxtil, plástica, farmacêutica, metalúrgica, refinarias de óleo, petróleo, produção de pesticidas, papéis e explosivos. Por sua ação inibitória em concentrações relativamente baixas (100 mg.L⁻¹) (Mainali, 2020, Panigrahy *et al.*, 2022, El-Naggar *et al.*, 2022), o fenol é um modelo convencional e conveniente para estudar a cinética de degradação

de moléculas aromáticas (Pradeep *et al.*, 2015), motivo pelo qual foi selecionado como modelo neste estudo.

A poluição de efluentes industriais por fenol e seus derivados é um problema de saúde pública, além de seus danos causados aos lençóis freáticos e ao ecossistema como um todo devido a sua alta toxicidade e natureza recalcitrante (Hanafi and Sapawe, 2020). A ingestão e exposição a fenol pode resultar em queimaduras e destruição de tecidos, além de causar danos ao fígado, olhos e intestino. Em virtude disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) limitou a concentração de fenol em água potável a 1 mg.L⁻¹, enquanto a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US EPA) e o Meio Ambiente e Mudanças Climáticas do Canadá (ECCC) adicionaram esse composto aromático em sua lista de poluentes de prioridade (Liu *et al.*, 2020).

O tratamento de efluentes industriais geralmente é realizado por processos físico-químicos. No entanto, tais métodos podem elevar os custos, além da possível geração de subprodutos perigosos e de lodo (Said *et al.*, 2021). Assim, a aplicação de processos biológicos é uma alternativa promissora, sobretudo por apresentar custos de operação reduzidos e possibilidade da completa mineralização das substâncias poluentes, com baixa produção de lodo (Machineni, 2020).

A degradação de compostos fenólicos por microalgas como *Scenedesmus* e *Chlorella* já foi reportada. Em ambientes contendo fenóis “menos tóxicos” (como monoclórofenóis), a microalga verde *S. obliquus* opta por produzir biomassa. Contudo, quando exposta a fenóis altamente clorados (tri, tetra e pentaclórofenóis), a microalga passa a degradar essas moléculas ao invés de produzir biomassa (Panigrahy *et al.*, 2022). Além de microalgas, outros microrganismos como bactérias heterotróficas (Panigrahy *et al.*, 2020, Barik *et al.*, 2021), fungos filamentosos (Mtibaa *et al.*, 2020) e leveduras (Filipowicz *et al.*, 2017) com potencial para degradar fenol já foram isolados de ambientes poluídos. A degradação microbiana tem como vantagens alta taxa de remoção dos xenobióticos, baixo custo e a completa mineralização de poluentes sem que haja a formação de subprodutos de caráter prejudicial à biota local (Li *et al.* 2020). No entanto, há de se

considerar que o caráter patogênico de algumas linhagens limita sua aplicação *in situ* (Rucká *et al.*, 2017).

Como alternativa a esses microrganismos, surgem as bactérias diazotróficas nodulíferas, denominadas coletivamente de rizóbio, que participam da fixação de nitrogênio e por sua exposição natural a substâncias aromáticas presentes no solo liberadas pelas raízes das plantas (Liu *et al.*, 2022, Weissengruber *et al.*, 2018) apresentam um potencial praticamente inexplorado para degradação desses poluentes orgânicos. Além disso, produzem exopolissacarídeos (EPS) e biofilmes, características importantes para imobilização celular natural que aumenta a eficiência nos processos de biorremediação (Olenska *et al.*, 2021).

A capacidade de biodegradação apresentada por esse grupo bacteriano foi registrada por Frassinetti *et al.* (1998), que isolaram a bactéria *Sinorhizobium meliloti* Orange 1 de um tanque de drenagem de uma refinaria de óleo. Esta foi considerada a primeira estirpe formadora de nódulos em raízes capaz de degradar dibenzotiofeno. Mais recentemente, Chen *et al.* (2023) biodegradaram fomesafen com a cepa *Sinorhizobium* sp. W16, que apresentou um potencial de biodegradação ainda maior quando em simbiose nas raízes de soja. No entanto, registros com o gênero *Bradyrhizobium* se limitam praticamente à espécie *B. japonicum*, nos estudos de Vaileva *et al.* (2020) e Vasileva *et al.* (2021).

Plantas da família *Fabaceae* (leguminosas) apresentam morfologias muito diversas, indo desde plantas herbáceas a espécies arbóreas. Apesar disso, estirpes de *Bradyrhizobium* têm sido encontradas em nódulos de todas essas variedades de leguminosas (Menna *et al.*, 2009). Esse gênero nodula leguminosas tropicais e representa a maior parte dos simbioses de leguminosas brasileiras (Moreira *et al.*, 1993). Em geral, *Bradyrhizobium* não oferecem risco para o meio ambiente nem para a saúde humana (Schmidt *et al.*, 2019).

A imobilização microbiana aumenta a concentração celular por redução do espaço físico empregado, protege os microrganismos de fatores abióticos adversos, proporcionando maior estabilidade e controle, o que acarreta numa maior aplicabilidade dos microrganismos imobilizados (MI) em processos biotecnológicos, permitindo o reaproveitamento do material biológico (Partovinia, A.; Rasekh, B, 2019).

A imobilização microbiana natural por formação de biofilme e de EPS em diferentes matrizes é uma estratégia para aumentar a eficiência da biodegradação. A adesão da bactéria

à superfície do suporte é o primeiro passo para a formação de biofilme, e propriedades físico-químicas da interface bacteriana, como hidrofobicidade, influenciam o processo. A importância desses agregados está latente no tratamento de efluentes (Castellane *et al.*, 2015, Basaka *et al.*, 2019). Por naturalmente produzirem biofilme e EPS, as bactérias do grupo rizóbio também são promissoras para imobilização celular (Ghost and Maiti, 2016; Olenska *et al.*, 2021).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivos: Avaliar a capacidade de estirpes de diferentes espécies de *Bradyrhizobium* do Semiárido do Nordeste Brasileiro de utilizar fenol como única fonte de carbono e energia; estudar o potencial dessas estirpes para formação de biofilme e produção de EPS; e investigar o efeito da imobilização celular na eficiência da utilização do fenol. Foram estabelecidas as seguintes hipóteses: Estirpes de *Bradyrhizobium* do Semiárido Brasileiro são capazes de crescer utilizando fenol como fonte única de carbono e energia; Estirpes de *Bradyrhizobium* do Semiárido Brasileiro são produtoras naturais de biofilme e EPS; Células imobilizadas de *Bradyrhizobium* do Semiárido Brasileiro são mais eficientes na degradação do fenol em comparação com as células livres. Os resultados obtidos e apresentados adiante evidenciam o potencial desse grupo microbiano na biorremediação de ambientes contaminados, com destaque para seu local de origem. Apesar de estar na percepção popular como um ambiente “pobre” e “sem vida”, o Semiárido, em especial seu microbioma, possui um grande potencial para resolução dos problemas causados e enfrentados pela humanidade, como a poluição.

Material e métodos

Os rizóbios utilizados neste trabalho foram obtidos da coleção de culturas de bactérias diazotróficas do semiárido do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Essas estirpes foram isoladas por Pinheiro *et al.* (2014) a partir de amostras de solo rizosférico de plantas nativas coletadas de forma aleatória, na profundidade de de 0-20 cm, no município de Quixadá (4°58'S a 39°1'O) no Ceará (CE), em Santana do Mato (RN) (5°57'S a 36°39'O) e em Jardim de Angicos (5°39'S a 35°58'O), também no Rio Grande do Norte (RN), todos na zona climática do Semiárido do Nordeste do Brasil, com vegetação típica da Caatinga (IBGE, 2022) (Figura 1). As estirpes foram identificadas geneticamente por sequenciamento do gene 16s rRNA por Silva (2020). Para este trabalho foram selecionados um

total de sete estirpes de *Bradyrhizobium* L29 (Tabela 1).
codificadas como L01, L04, L06, L11, L14, L23 e

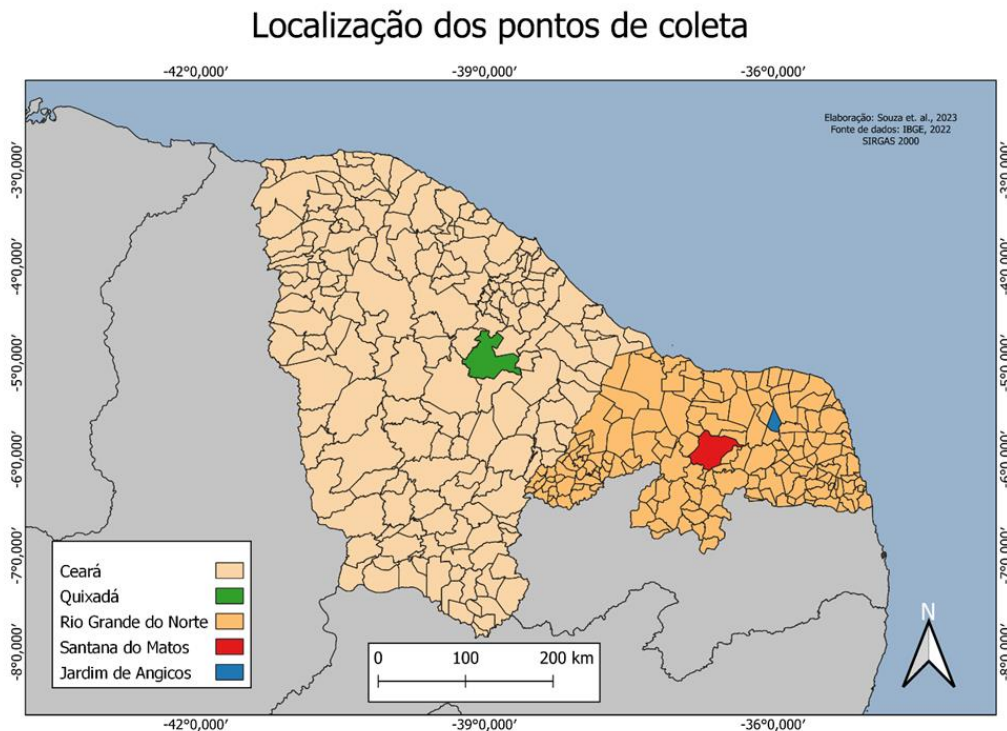


Figura 1 – Localização dos pontos de coleta de solo rizosférico do Semiárido do Nordeste Brasileiro
Fonte: elaborado pelos autores; IBGE (2022).

Tabela 1 Estirpes de rizóbios isoladas do solo rizosférico do Semiárido do Nordeste brasileiro

Estirpes	Gênero/Espécie	Tamanho do fragmento (bp)	Similaridade (%)	Acesso	Origem	Autores que descreveram a espécie pela 1ª vez
L01	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1083	99,91	NR_112927.1	Santana do Mato (RN)	Kuykendall et al. 1993
L04	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	1083	99,82	NR_112927.2	Quixadá (CE)	Kuykendall et al. 1993
L06	<i>Bradyrhizobium vignae</i>	1000	96,74	NR_147716.1	Quixadá (CE)	Grönemeyer et al., 2016
L11	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	1105	99,09	MF593081.1	Jardim dos Angicos (RN)	-
L14	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	989	96,83	KX527919.1	Quixadá (CE)	-
L23	<i>Bradyrhizobium yuanmingense</i>	1059	98,96	NR_112928.1	Quixadá (CE)	Yao et al. 2002
L29	<i>Bradyrhizobium kavangense</i>	1094	99,35	NR_145925.1	Quixadá (CE)	Gronemeyer et al. 2015

Fonte: Silva (2020).

Para recuperação, as estirpes de rizóbios foram inoculadas no meio *Yeast Mannitol Agar* (YMA) e incubadas a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, até a visualização de colônias isoladas (Vincent, 1970). A pureza foi

avaliada pela observação das características fenotípicas das colônias, as quais foram transferidas para uma nova placa com YMA e novamente incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias. As colônias de cada estirpe foram utilizadas para padronização do inóculo.

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

Para testar a utilização do fenol, foi preparada uma solução estoque por dissolução de 20 g de fenol (grau de pureza >99%, Sigma-Aldrich) em 1000 mL de água destilada. Esta solução foi esterilizada por filtração em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, EUA). As estirpes foram individualmente inoculadas em meio mineral mínimo suplementado com fenol na concentração de 100 mg L^{-1} . O meio base foi composto por (g. L^{-1}): Na_2HPO_4 (6,8), KH_2PO_4 (3,0), NaCl (0,5) e NH_4Cl (0,5) e o pH ajustado para $6,8 \pm 0,2$. 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 absorbância a 600 nm. As culturas foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ com agitação orbital a 125 rpm durante sete dias. O crescimento da biomassa microbiana foi monitorado medindo-se diariamente a DO_{600} (Hasan and Jabeen, 2015).

Para verificar a normalidade da distribuição dos dados da concentração celular em relação ao tempo de contato com o fenol foi inicialmente aplicado o teste de D'Agostino-Pearson. Para as amostras com distribuição normal a correlação entre a biomassa e o tempo em dias de cada estirpe em contato com 100 mg L^{-1} foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson (r) utilizando o programa GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software *, San Diego, CA). As estirpes em que o coeficiente de correlação (r) entre a absorbância e o tempo de exposição ao fenol indicou uma relação linear positiva ($0,5 \leq r \leq 1$) e significativa ($p < 0,05$) foram selecionadas para o teste posterior na concentração de 500 mg L^{-1} de fenol, segundo metodologia descrita anteriormente para 100 mg L^{-1} e mesma análise estatística.

A cepa que apresentou melhor resultado na concentração de 500 mg L^{-1} de fenol foi submetida ao teste de hidrofobicidade celular pelo teste de adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH), que avalia a adesão microbiana em n-hexadecano. Aliquotas de 4 mL das suspensões bacterianas em

solução salina fosfatada tamponada em 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 a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. O percentual de partição na fase de hidrocarbonetos foi calculado pela equação descrita abaixo.

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

Onde: %Part é o percentual de partição na fase de hidrocarbonetos; $\text{DO}_{640\text{nmS}}$ é a densidade óptica a 640nm da suspensão bacteriana original; $\text{DO}_{640\text{nmA}}$ é a densidade óptica a 640nm da fase aquosa. (Miljkovic *et al.*, 2018). Estirpes com % Part $\geq 70\%$, $50\% \leq \text{Part} < 70\%$ e %Part $< 50\%$ foram classificadas como de hidrofobicidade elevada, moderada e baixa, respectivamente (Rammo, 2020).

Para calcular a eficiência relativa na produção de exopolissacarídeos (EPS), as estirpes foram previamente cultivadas em placas de Petri contendo meio YMA por seis dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Vincent, 1970). Em seguida, colônias isoladas foram transferidas para o caldo YM composto por (g. L^{-1}): Manitol (10,0); K_2HPO_4 (0,5); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); NaCl (0,1); extrato de levedura (0,4) e pH 6,8, onde foram incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ sob agitação constante a 150 rpm em um agitador orbital por tempo específico para cada estirpe. Após esse período cada cultura foi centrifugada a $3800 \times G$, em centrífuga Marconi MA 1800, para separação das células bacterianas da solução contendo o EPS. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os EPS precipitados foram lavados três vezes com etanol gelado, secos em estufa a 70°C e pesados em balança analítica MARTE AY220. A eficiência relativa na produção de EPS foi obtida através da relação entre o total de EPS e a biomassa celular (Silva *et al.*, 2019).

As estirpes selecionadas foram avaliadas quanto à formação de biofilme pelo procedimento do ensaio de microtitulação em placas (Stepanovic *et al.*, 2007). As estirpes foram cultivadas em meio RDM (Rhizobia Defined Medium) (K_2HPO_4 , $0,23 \text{ g L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,10 \text{ g L}^{-1}$; glutamato de sódio, $1,10 \text{ g L}^{-1}$; CaCl_2 , 5 mg L^{-1} ; H_3BO_3 , $145 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $125 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $70 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $5 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $4,3 \mu\text{g L}^{-1}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $108 \mu\text{g L}^{-1}$; Na_2MoO_4 , $125 \mu\text{g L}^{-1}$; riboflavina, $20 \mu\text{g L}^{-1}$; ácido P-aminobenzoico, $20 \mu\text{g L}^{-1}$; ácido nicotínico, $20 \mu\text{g L}^{-1}$; biotina, $20 \mu\text{g L}^{-1}$; tiamina-HCl, $20 \mu\text{g L}^{-1}$; piridoxina-HCl, $\mu\text{g L}^{-1}$; Pantotenato de Ca^{+2} , $20 \mu\text{g L}^{-1}$) acrescido de 2% de sacarose, previamente esterilizada por filtração (Bishop *et al.*, 1976).

O volume de 100 µL de cada estirpe e 100 µL do meio RDM (controle negativo) foi adicionado aos poços individuais de uma placa de 96 poços. As placas foram seladas com filme adesivo e incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 densidade óptica a 570 nm (DO_{570}) utilizando-se um leitor de microplaca (Stepanovic *et al.*, 2007).

A formação de biofilme foi calculada de acordo com a DO_{570} das células aderidas coradas com cristal violeta em comparação com a densidade óptica do controle negativo (DO_c) e categorizada de acordo com Samadi *et al.* (2018), Onde $\text{DO}_{570} > 4 \cdot \text{DO}_c$ – Forte; $2 \cdot \text{DO}_c \leq \text{DO}_{570} \leq 4 \cdot \text{DO}_c$ – Moderado; $\text{DO}_c \leq \text{DO}_{570} \leq 2 \cdot \text{DO}_c$ – Fraco; $\text{DO}_{570} \leq \text{DO}_c$ - Negativo

Para avaliar o efeito da imobilização sobre a biomassa na presença de fenol, as estirpes de

rizóbios com melhores resultados quanto à produção de EPS, biofilme e hidrofobicidade foram imobilizadas em matrizes de ágar-ágar (Bhusare *et al.*, 2020) e expostas à concentração de 500 mg.L⁻¹ de fenol, com monitoramento da DO após 5-7 dias. Esses valores foram comparados com as leituras de DO das células livres sob as mesmas condições.

Para garantir a reprodutibilidade, todos os ensaios foram realizados em triplicatas com três repetições.

Resultados e discussão

As estirpes L04, L06, L11, L14 e L29 apresentaram uma correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre a biomassa e o tempo de contato com 100 mg. L⁻¹ de fenol, (Tabela 2), indicando a degradação do fenol. O coeficiente de correlação dessas estirpes foi $r > 0,70$ com destaque para a estirpe L04. Embora as estirpes L01 e L23 tenham apresentado um coeficiente de correlação de Pearson positivo ($r > 0,5$) essa correlação não foi significativa ($p > 0,05$).

Tabela 2 Coeficiente de correlação de Pearson (r) e p-valor das estirpes de rizóbios do semiárido do nordeste brasileiro em contato com 100 mg L⁻¹ de fenol por um período de sete dias

Estirpes	r	p-valor
L01	0,37	0,358
L04	0,91	0,020
L06	0,82	0,013
L11	0,78	0,022
L14	0,84	0,008
L23	0,62	0,100
L29	0,71	0,048

Na literatura, um único estudo aponta para degradação de fenol mediado por células livres de *Bradyrhizobium japonicum* 273, porém em concentrações mais baixas que as posteriormente avaliadas nesse estudo (20 a 80 mg. L⁻¹) (Vasileva *et al.* 2020). Há também estudos envolvendo a utilização de células imobilizadas (Parvanova-Mancheva *et al.*, 2020) e em ambas as formas (Vasileva *et al.*, 2021). Tais fatos reforçam o diferencial e a importância das estirpes de *Bradyrhizobium* do presente estudo como potenciais degradadoras de fenol. Assim, as estirpes L04, L06, L11, L14 e L29 foram selecionadas para teste na concentração de 500 mg.L⁻¹ de fenol por apresentarem coeficientes de correlação positiva superior a 0,50 e significativa, indicando crescimento celular.

Na concentração de 500 mg.L⁻¹, somente os dados das estirpes L04 e L11 apresentaram distribuição normal, e, por isso, os resultados dessas estirpes foram submetidos ao teste de correlação entre a biomassa (DO_{600}) e o tempo de exposição ao fenol (500 mg.L⁻¹) por sete dias. A estirpe L11 (*Bradyrhizobium* sp.) teve seu crescimento inibido, enquanto a estirpe L04 (*Bradyrhizobium elkanii*) apresentou um coeficiente de correlação 0,74 com $p < 0,05$, confirmando o melhor desempenho reportado na concentração de 100 mg.L⁻¹. Por não se ter conhecimento de prévia contaminação antropogênica por fenol do ambiente do qual essa estirpe foi isolada, é possível conjecturar que seja uma característica intrínseca da mesma e não um processo adaptativo, como ocorre na maioria das

cepas microbianas isoladas de ambientes reconhecidamente poluídos. De fato, pesquisas com *Bradyrhizobium japonicum* indicaram que essa espécie possui múltiplas cópias de genes para degradação de compostos aromáticos no genoma e é capaz de usar baixas concentrações de vanilato, um monômero de lignina metoxilada, como fonte de energia (Sudtachat *et al.*, 2009).

A pressão evolutiva favorece a proliferação de bactérias com capacidade de degradar agentes fenólicos e aromáticos no interior das raízes de plantas. As bactérias diazotróficas, ou fixadoras de nitrogênio, estão expostas a substâncias tóxicas que ocorrem naturalmente no solo, incluindo fenóis, terpenos, alcalóides e produtos de origem antropogênica (Saeed *et al.*, 2021). Além disso, compostos aromáticos simples e complexos são liberados naturalmente no solo pela degradação de lignina e de ácidos húmicos por bactérias edáficas enquanto uma gama de compostos orgânicos de natureza fenólica e fitoalexinas são secretadas por plantas (Misra *et al.*, 2023).

O crescimento da estirpe L04 na presença do fenol indica a capacidade bioquímica e ecológica dessa estirpe para degradar poluentes orgânicos, tornando-a promissora para a reabilitação de solos contaminados.

Alguns microrganismos rizosféricos capazes de remover poluentes não podem sobreviver e alcançar a biorremediação no ambiente do solo porque não podem competir com organismos indígenas (Wang *et al.*, 2015). Nesse sentido, a estirpe L04 pode representar uma biotecnologia de baixo insumo, sem necessidade de repetidas inoculações de agentes microbianos. Outra vantagem é que sua capacidade de fixação de nitrogênio elimina a deficiência desse elemento, uma vez que, a deposição de hidrocarbonetos aumenta significativamente o acúmulo de carbono orgânico no solo e gera um desequilíbrio da razão C/N durante a biorremediação (Dashti *et al.*, 2010). Finalmente, sua ação biorremediadora também pode impactar as comunidades microbianas degradadoras do solo, facilitando a restauração de forma abrangente (Li *et al.*, 2013). Os mecanismos envolvidos neste processo restaurador incluem: melhoria das condições ambientais (pH e disponibilidade de nutrientes ou seja, nitrogênio) e mudanças nas quantidades e constituintes de exsudatos radiculares devido ao aumento das atividades metabólicas da planta após a inoculação com a estirpe selecionada (Terrence *et al.*, 2011).

Visando avaliar o potencial de imobilização da estirpe L04, a mesma foi testada quanto à produção de exopolissacarídeos (EPS),

biofilme e hidrofobicidade, parâmetros que influenciam a imobilização celular, estratégia para aumentar a eficiência de processos de biorremediação (Mahto *et al.*, 2022).

Os microrganismos desenvolveram estratégias para sobreviver às condições ambientais hostis, especialmente nos solos. A produção de EPS é importante para fornecer um ambiente úmido, aprisionar nutrientes, facilitar reações químicas e proteger as células contra condições ambientais, antibióticos e ataques de predadores. Polímeros extracelulares microbianos são compostos altamente diversos com múltiplas funções que dependem de sua composição e estrutura (Costa *et al.*, 2018).

Em geral, os EPS conferem proteção a ambientes estressantes. Sayed *et al.* (2015) confirmaram a relação entre esses compostos e a resistência a substâncias tóxicas em experimentos com *Enterobacter*. Neste estudo, a eficiência relativa da estirpe L04 na produção de EPS, calculada pela relação entre EPS e biomassa foi 1,4, sendo a produção de biomassa de 5,77 g. L⁻¹ e a de EPS de 8,07 g. L⁻¹. Castellane *et al.* (2014) reportaram valores de de 2,21 a 7,08 para as estirpes de rizóbios SEMIA4080 (selvagem), MUTZC3 e MUTPA7 (mutantes) de *Rhizobium tropici*, e para os isolados JAB1 e JAB6, portanto superiores ao da L04. Já Fernandes Júnior *et al.* (2010), em trabalho com rizóbios isolados de nódulos de Guandu (*Cajanus cajan*), registraram uma eficiência relativa máxima de 3,15, também superior à estirpe L04.

É provável que estirpes de rizóbios que produzem maiores quantidades de EPS sejam mais tolerantes a condições de estresse. De fato, Barberi *al.* (2004) em estudo com as estirpes BR 29 e SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii*, recomendadas como inoculante de soja, reportaram que a produção de EPS foi maior em condições ácidas que em pH neutro, ideal ao crescimento da leguminosa.

Outra característica que facilita a adesão celular, fundamental para o sucesso da imobilização, é a hidrofobicidade. Propriedades da superfície bacteriana desempenham um papel essencial na interação com superfícies bióticas e abióticas. As propriedades físico-químicas da superfície das células bacterianas são influenciadas, entre outros fatores, pela composição química da parede celular (Cieśla *et al.*, 2016). Assim, os lipopolissacarídeos (LPS) de membrana externa das bactérias Gram-negativas tornam a superfície celular desse grupo mais hidrofílica em relação às Gram-positivas (Krasowska and Sigler, 2014).

Para a estirpe L04 a DO_{640} inicial foi 0.250 ± 0.090 e DO_{640} na fase aquosa $0,438 \pm 0.268$, portanto, o percentual de partição na fase de hidrocarboneto foi -75,2. De acordo com a hidrofobicidade invertida, em uma escala de percentual de partição na fase de hidrocarbonetos, as superfícies mais hidrofóbicas apresentam os valores mais positivos enquanto as hidrofílicas possuem os valores mais negativos (Qiao *et al.*, 2012) o que indica uma forte tendência à hidrofília da estirpe L04.

Como os rizóbios são bactérias Gram - negativas, a hidrofília da estirpe L04 (*Bradyrhizobium elkanii*), corrobora com Krasowska and Sigler (2014), quanto a composição da parede celular desse grupo favorecer o caráter hidrofílico.

Células com maior grau de hidrofobicidade aderem mais fortemente a superfícies hidrofóbicas, enquanto as células hidrofílicas aderem a superfícies hidrofílicas (Giaouris *et al.*, 2009). Nessa perspectiva, matrizes hidrofílicas são mais adequadas para imobilização celular da estirpe L04.

Assim como a produção de EPS, a hidrofobicidade também é um mecanismo microbiano de defesa relacionado ao grau de poluição ambiental (Sayed *et al.*, 2015). Mudanças nas condições ambientais forçam modificações adaptativas no microrganismo que aumentam sua capacidade de sobreviver. O caráter hidrofílico da estirpe L04 é sugestivo da ausência ou reduzido nível de atividade antropogênica na área de origem da estirpe.

A hidrofobicidade, em geral, apresenta uma associação direta com a formação de exopolissacarídeos (Ayhan *et al.*, 2019). Essa relação foi confirmada por Cieśla *et al.* (2016), em estudo com a estirpe nativa 24.2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* quando a produção de EPS resultou em aumento da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana. No presente estudo, a eficiência relativa na produção de EPS foi 1,4 e a estirpe L04 foi hidrofílica, o que corrobora com a relação dieta entre as duas variáveis.

A formação de biofilmes em superfícies bióticas ou abióticas é causada por células microbianas de uma ou de várias espécies. Assim como o EPS, o biofilme também protege os microrganismos de condições ambientais estressantes, ação tóxica de produtos químicos e substâncias antimicrobianas (Chattopadhyay *et al.*, 2022). O papel da formação de biofilme na simbiose foi investigado em detalhes para *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum* (Perez-Montano, 2018).

Nos testes de produção de biofilme, a estirpe L04 registrou uma DO_{570} de $0,3620 \pm 0,2647$, quatro vezes maior que a do controle ($0,0470 \pm 0,0058$), sendo classificada de acordo com Samadi *et al.* (2018) como fortemente produtora de biofilme. Esse resultado confirma que os rizóbios são produtores naturais de biofilme, uma vez que na nodulação das raízes é comum a formação dessa estrutura (Dixit *et al.*, 2017). Essa característica intrínseca pode ser ampliada por mecanismos adaptativos que contribuem para a sobrevivência em ambientes hostis, como é o caso do semiárido.

Em relação aos parâmetros analisados (EPS, hidrofobicidade e biofilme), a estirpe L04 apresentou-se como potencial candidata ao processo de imobilização celular em superfícies hidrofílicas e foi imobilizada em matrizes de agar-agar. A produção da biomassa para as células imobilizadas submetidas a concentração de 500 mg.L^{-1} de fenol após 5-7 dias, foi monitorada pela DO_{600} e expressa pelo coeficiente de imobilização, descrito como a relação entre a DO das células imobilizadas e das células livres. A DO_{600} para as células livres após seis dias de contato com o fenol foi $0,045 \pm 0,025$ e para as células imobilizadas $0,068 \pm 0,022$, resultando em um coeficiente de imobilização de 1,4.

Portanto, a imobilização da estirpe L04 apresentou uma eficiência 40% maior em relação à quantidade de células livres. Em experimento com células livres e imobilizadas de *Bradyrhizobium japonicum*, Vasileva *et al.* (2021) encontraram que a quantidade de fenol degradado foi maior nas células imobilizadas. Popova-Krumova *et al.* (2022), trabalhando com células de *Bradyrhizobium japonicum* livres e imobilizadas por 240 horas, constataram um aumento de 10 vezes na degradação do fenol nas células imobilizadas. No presente estudo, a taxa de degradação do fenol entre células livres e imobilizadas não foi avaliada diretamente, mas o aumento da biomassa onde a única fonte de carbono e energia disponível era o fenol reflete a degradação desse substrato.

É importante destacar que embora não tenham crescido na concentração de fenol de 500 mg.L^{-1} , as estirpes L06 (*Bradyrhizobium vignae* NR_147716.1), L11 (*Bradyrhizobium* sp. MF593081.1), L14 (*Bradyrhizobium* sp. KX527919.1) e L29 (*Bradyrhizobium kavangense* NR_145925.1) foram eficientes em 100 mg.L^{-1} , demonstrando o potencial dessas estirpes para degradar fenol. A bactéria *Bradyrhizobium kavangense* foi reportada por Gronemeyer *et al.* (2015) como uma nova espécie isolada em

Kavango na Namíbia. O mesmo autor descreveu *Bradyrhizobium vignae* como uma nova espécie em 2016. A espécie *B. kavangense* foi registrada pela primeira vez no Brasil por Santos *et al.* (2017) em região semiárida do Nordeste brasileiro (Barbalha – CE - Brasil e Juazeiro do Norte – BA – Brasil). Esses relatos reforçam a importância do presente estudo, que é o primeiro relato do potencial biorremediador da estirpe *Bradyrhizobium elkanii*.

Conclusões

Neste estudo, cinco estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do semiárido brasileiro foram selecionadas com base em seu potencial para degradar o fenol. A partir desses ensaios, foi possível concluir que:

1. As cepas identificadas como *Bradyrhizobium elkanii* NR_112927.2, *Bradyrhizobium vignae* NR_147716.1, *Bradyrhizobium* sp. MF593081.1, *Bradyrhizobium* sp. KX527919.1 e *Bradyrhizobium kavangense* NR_145925.1 apresentaram diferentes respostas quando cultivadas em diferentes concentrações de fenol.
2. *Bradyrhizobium elkanii* NR_112927.2 mostrou uma habilidade particular para crescer na forma livre e imobilizada na presença de 500 mg.L⁻¹ de fenol por 7 dias, possivelmente facilitado pela produção de EPS e biofilme.
3. A estirpe *Bradyrhizobium elkanii* NR_112927.2 pode ser considerada eficaz como uma degradadora de fenol e produtora de EPS e pode ser útil em bioatividades de remediação principalmente na forma imobilizada

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido ao longo da realização desta pesquisa.

Referências

Ayhan, D. K., Temiz, A., Sana, F. A., & Gümüşderelioğlu, M. 2019. Surface properties and exopolysaccharide production of surface-associated microorganisms isolated from a dairy plant. *Annals of Microbiology*, 69(9), 895–907. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01482-7>

Barberi, A., De Souza Moreira, F. M., Florentino, L. A., & Rodrigues, M. a. M. 2004. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. *Ciencia E Agrotecnologia*, 28(2), 397–405. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542004000200021>

Barik, M. R., Das, C. P., Verma, A. K., Sahoo, S., & Sahoo, N. K. 2021. Metabolic profiling of phenol biodegradation by an indigenous *Rhodococcus pyridinivorans* strain PDB9T N-1 isolated from paper pulp wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 158, 105168. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105168>

Basak, B., Jeon, B., Saratale, G. D., Bhunia, B., Chatterjee, P. K., & Dey, A. 2019. Biodegradation of high concentration phenol using sugarcane bagasse immobilized *Candida tropicalis* PHB5 in a packed-bed column reactor. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.020>

Bishop, P. N., Guevara, J. C., Engelke, J. A., & Evans, H. J. 1976. Relation between Glutamine Synthetase and Nitrogenase Activities in the Symbiotic Association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. *Plant Physiology*, 57(4), 542–546. <https://doi.org/10.1104/pp.57.4.542>

Bromfield, E. S. P., Barran, L. R., & Wheatcroft, R. A. 1995. Relative genetic structure of a population of *Rhizobium meliloti* isolated directly from soil and from nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) and sweet clover (*Melilotus alba*). *Molecular Ecology*, 4(2), 183–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00207.x>

Castellane, T. C. L., Lemos, M., & De Macedo Lemos, E. G. 2014. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. *Carbohydrate Polymers*, 111, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.066>

Castellane, T. C. L., Persona, M. R., Campanharo, J. C., & De Macedo Lemos, E. G. 2015. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 515–522. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.007>

Chen, W., Chang, J. S., Wu, C., & Chang, S. 2004b. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in Microbiology*, 155(8), 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.05.004>

Chen, W., Gao, Y., Shi, G., Li, J., Fan, G., Yang, C., Wang, B., Tong, F., & Li, Y. 2023. Enhanced degradation of fomesafen by a rhizobial strain *Sinorhizobium* sp. W16 in symbiotic association with soybean. *Applied*

- Soil Ecology*, 187, 104847. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2023.104847>
- Chlebek, D., & Hupert-Kocurek, K. 2019. Endophytic Bacteria In The Phytodegradation Of Persistent Organic Pollutants. *Postepy Mikrobiologii*, 58(1), 70–79. <https://doi.org/10.21307/pm-2019.58.1.070>
- Cieřla, J., Kopycińska, M., Łukowska, M., Bieganski, A., & Janczarek, M. 2016. Surface Properties of Wild-Type *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Strain 24.2 and Its Derivatives with Different Extracellular Polysaccharide Content. *PLOS ONE*, 11(10), e0165080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165080>
- Costa, O. Y. A., Raaijmakers, J. M., Kuramae, E. E. 2018. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, Volume 9 | Article 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Das, K., Prasanna, R., & Saxena, A. K. 2017. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia Microbiologica*, 62(5), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0513-z>
- Dashti, N., Khanafer, M., El-Nemr, I., Sorkhoh, N., Ali, N., Radwan, S. 2010. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere* 74, 1354–1359. <https://doi.org/10.1016/j.Chemosphere.2008.11.028>
- De Souza Moreira, F. M., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K., & Franco, A. A. 1993. Characterization of Rhizobia Isolated from Different Divergence Groups of Tropical Leguminosae by Comparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis of their Total Proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(1), 135–146. [https://doi.org/10.1016/s0723-2020\(11\)80258-4](https://doi.org/10.1016/s0723-2020(11)80258-4)
- Dixit, S., Dubey, R. C., Maheshwari, D. K., Seth, P. K., & Bajpai, V. K. 2017. Roles of quorum sensing molecules from *Rhizobium etli* RT1 in bacterial motility and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 815–821. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.005>
- El-Naggar, N. A., Moawad, M. N., & Ahmed, E. M. 2022. Toxic phenolic compounds in the Egyptian coastal waters of Alexandria: spatial distribution, source, identification, and ecological risk assessment. *Water Science*, 36(1), 32–40. <https://doi.org/10.1080/23570008.2022.2031724>
- Filipowicz, N., Momotko, M., Boczkaj, G., Pawlikowski, T., Wanarska, M., & Cieřliński, H. 2017. Isolation and Characterization of Phenol-Degrading Psychrotolerant Yeasts. *Water Air and Soil Pollution*, 228(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3391-8>
- Frassinetti, S., Setti, L., Corti, A., Farrinelli, P., Montevecchi, P., & Vallini, G. 1998. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(3), 289–297. <https://doi.org/10.1139/w97-155>
- Ghosh, P., & Maiti, T. K. 2016. Structure of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Rhizobia and their Functions in Legume–Bacteria Symbiosis: — A Review. *Achievements in the Life Sciences*, 10(2), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.003>
- Hanafi, M., & Sapawe, N. 2020. A review on the water problem associate with organic pollutants derived from phenol, methyl orange, and remazol brilliant blue dyes. *Materials Today: Proceedings*, 31, A141–A150. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.01.258>
- Hasan, S. S., & Jabeen, S. 2015. Degradation kinetics and pathway of phenol by *Pseudomonas* and *Bacillus* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(1), 45–53. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.991638>
- Huang, X., Shi, J., Cui, C., Yin, H., Zhang, R., Ma, X., & Zhang, X. 2016. Biodegradation of phenanthrene by *Rhizobium petrolearium* SL-1. *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1616–1626. <https://doi.org/10.1111/jam.13292>
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/mapas-regionais/15974-semiarido-brasileiro>. Acesso em 27 de janeiro de 2022
- Jach, M. E., Sajnaga, E., & Ziaja, M. 2022. Utilization of Legume-Nodule Bacterial Symbiosis in Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Soils. *Biology*, 11(5), 676. <https://doi.org/10.3390/biology11050676>
- Júnior, P. C. S., Da Silva Almeida, J. A., Passos, S. R., De Oliveira, P. T., Rumjanek, N. G., & Xavier, G. R. 2010. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(12), 1465–1471. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2010001200018>
- Kong, Z., Li, L., Xue, Y., Yang, M., & Li, Y. Y. 2019. Challenges and prospects for the anaerobic treatment of chemical-industrial

- organic wastewater: A review. *Journal of Cleaner Production*, 231, 913–927. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.233>
- Krasowska, A., & Sigler, K. 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>
- Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E., & Udell, S. E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp.nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 501–505. <https://doi.org/10.1139/m92-082>
- Leite, J., Passos, S. R., Simões-Araújo, J. L., Rumjanek, N. G., Xavier, G. R., & Zilli, J. É. 2018a. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.007>
- Leite, J., Passos, S. R., Simões-Araújo, J. L., Rumjanek, N. G., Xavier, G. R., & Zilli, J. É. 2018b. Genomic identification and characterization of the elite strains *Bradyrhizobium yuanmingense* BR 3267 and *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 recommended for cowpea inoculation in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 703–713. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.007>
- Li, Y., Liang, F., Zhu, Y. F., Wang, F. P. 2013. Phytoremediation of a PCB- contaminated soil by alfalfa and tall fescue single and mixed plants cultivation. *Journal of Soils and Sediments* 13, 925–931. <https://doi.org/10.1007/s11368-012-0618-6>
- Li, C.-M., Wu, H.-Z., Wang, Y.-X., Zhu, S. & Wei, C.-H. 2020. Enhancement of phenol biodegradation: metabolic division of labor in co-culture of *Stenotrophomonas* sp. N5 and *Advenella* sp. B9. *Journal of Hazardous Materials* 400, 12214–12223. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123214>
- Liu, H., Cui, Y., Zhou, J., Penttinen, P., Liu, J., Zeng, L., Chen, Q., Gu, Y., Zou, L., Zhao, K., Xiang, Q., & Yu, X. 2022. Nickel mine soil is a potential source for soybean plant growth promoting and heavy metal tolerant rhizobia. *PeerJ*, 10, e13215. <https://doi.org/10.7717/peerj.13215>
- Liu, Y., Wang, W., Shah, S. a. A., Zhanaroli, G., Xu, P., & Tang, H. 2020. Phenol biodegradation by *Acinetobacter radioresistens* APH1 and its application in soil bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(1), 427–437. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10271-w>
- Machado, I., Chapot-Chartier, M., & Briandet, R. 2009. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.006>
- Malla, M. A., Dubey, A., Yadav, S., Kumar, A., & Kumar, A. 2018. Understanding and Designing the Strategies for the Microbe-Mediated Remediation of Environmental Contaminants Using Omics Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01132>
- Mahto, K. U., Vandana, Priyadarshane, M., Samantaray, D. P., Das, S. 2022. Bacterial biofilm and extracellular polymeric substances in the treatment of environmental pollutants: Beyond the protective role in survivability. *Journal of Cleaner Production* 379, 134759. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134759>
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D., Feyhl-Buska, J., Wong, M. H., Zhang, S., & Giovannelli, D. 2019. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Miljkovic, M., Marinkovic, P., Novović, K., Jovicic, B., Terzic-Vidojevic, A., & Kojic, M. 2018. AggLr, a novel aggregation factor in *Lactococcus raffinolactis* BGTRK10-1: its role in surface adhesion. *Biofouling*. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1481956>
- Misra, D., Dutta, W., Jha, G., & Ray, P. 2023. Interactions and regulatory functions of phenolics in soil-plant-climate nexus. *Agronomy*, 13, 280. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020280>
- Mtibaà, R., Ezzanad, A., Aranda, E., Pozo, C., Ghariani, B., Moraga, J., Nasri, M., Cantoral, J. M., Garrido, C. J., & Mechichi, T. 2020. Biodegradation and toxicity reduction of nonylphenol, 4-tert-octylphenol and 2,4-dichlorophenol by the ascomycetous fungus *Thielavia* sp. HJ22: Identification of fungal metabolites and proposal of a putative pathway. *Science of the Total Environment*, 708, 135129. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135129>
- Naidu, R., Biswas, B., Willett, I. R., Cribb, J.,

- Singh, B. K., Nathanail, C. P., Coulon, F., Semple, K. T., Jones, K. C., Barclay, A., & Aitken, R. J. 2021. Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environment International*, 156, 106616.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106616>
- Oleńska, E., Cowan, D. A., Kotowska, U., Wydrych, J., Polńska, W., Swiecicka, I., Thijs, S., & Vangronsveld, J. 2021. Exopolysaccharide Carbohydrate Structure and Biofilm Formation by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Strains Inhabiting Nodules of *Trifolium repens* Growing on an Old Zn–Pb–Cd-Polluted Waste Heap Area. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2808.
<https://doi.org/10.3390/ijms22062808>
- Panigrahy, N., Barik, M. R., & Sahoo, N. K. 2020. Kinetics of Phenol Biodegradation by an Indigenous *Pseudomonas citronellolis* NS1 Isolated from Coke Oven Wastewater. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, 24(3). [https://doi.org/10.1061/\(asce\)hz.2153-5515.0000502](https://doi.org/10.1061/(asce)hz.2153-5515.0000502)
- Panigrahy, N., Priyadarshini, A., Sahoo, M. M., Verma, A. K., Daverey, A., & Sahoo, N. K. 2022. A comprehensive review on eco-toxicity and biodegradation of phenolics: Recent progress and future outlook. *Environmental Technology and Innovation*, 27, 102423.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102423>
- Parvanova-Mancheva, T. 2020. *Phenol Biodegradation of Immobilized Bradyrhizobium japonicum Cells. Part 2.* https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:53000213
- Partovinia, A., & Rasekh, B. 2018. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. *Critical Reviews In Environmental Science and Technology*, 48(1):1-38.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1439652>
- Perez-Montano, F., Jimenez-Guerrero, I., Del Cerro, P., Baena-Ropero, I., Lopez-Baena, F. J., Ollero, F. J., Bellogin, R., Lloret, J., Espuny, R. The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of glycine max cv Osumi, is regulated by Quorum Sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS ONE* 9(8): e105901.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105901>
- Pinheiro, M.S.; Sousa, J.B.; Bertini, C.H.C.M.; Martins, S.C.S.; Martins, C.M, 2014. Isolation and screening of rhizobial strains native from semiarid tolerant to environmental stress. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10 (18), 2071 – 2082.
- Popova-Krumova, P., Beschkov, V., Vasileva, E., & Parvanova-Mancheva, T. 2022 Modeling of 1,2-Dibromoethane Biodegradation in Constant Electric Field. *ChemEngineering*, 6(4), 62.
<https://doi.org/10.3390/chemengineering6040062>
- Pradeep, N. V., S, A., Navya, K., Shalini, H. N., Idris, M., & Hampannavar, U. S. 2015a. Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review. *Applied Water Science*, 5(2), 105–112.
<https://doi.org/10.1007/s13201-014-0176-8>
- Qiao, D., Tu, W., Zhong, L., Wang, Z. L., Zhang, B., & Jiang, A. F. 2019. Microstructure and Mechanical/Hydrophilic Features of Agar-Based Films Incorporated with Konjac Glucomannan. *Polymers*, 11(12), 1952.
<https://doi.org/10.3390/polym11121952>
- Ramírez-Bahena, M., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Willems, A., & Velázquez, E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 1929–1934.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.006320-0>
- Rammo, R. N. N. 2020 Hydrophobicity and Adhesion Properties of Bacterial Growth Under Varying Temperature-Time Environment and Material Surface. *Prensa Médica Argentina*.
<https://doi.org/10.47275/0032-745x-216>
- Rucká, L., Nešvera, J., & Pátek, M. 2017. Biodegradation of phenol and its derivatives by engineered bacteria: current knowledge and perspectives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33(9).
<https://doi.org/10.1007/s11274-017-2339-x>
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kucerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., & Mustafa, A. 2021. Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10529.
<https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
- Said, K. A. M., Ismail, A. F., Karim, Z. A., Abdullah, M. Z., & Hafeez, A. 2021. A review

- of technologies for the phenolic compounds recovery and phenol removal from wastewater. *Chemical Engineering Research & Design*, 151, 257–289. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2021.05.015>
- Samadi, R., Ghalavand, Z., Nikmanesh, B., Farahani, N. N., Yasini, M., Benvidi, M. E., & Eslami, G. 2017. Investigation of Biofilm Formation Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Children. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 6(3). <https://doi.org/10.5812/pedinfect.61635>
- Santos, J. W. M. D., Da Silva, J. L., Ferreira, T. D. D. S., Dias, M. L., Fraiz, A. C. R., Escobar, I. E. C., Santos, R. C. D., De Lima, L. M., Morgante, C. V., & Fernandes-Júnior, P. I. 2017. Molecular and symbiotic characterization of peanut bradyrhizobia from the semi-arid region of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 121, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.033>
- Sayyed, R. Z.; Patel, P. R.; Shaikh, S. S., 2015. Plant growth promotion and root colonization by EPS producing *Enterobacter* sp. RZS5 under heavy metal contaminated soil. *Indian Journal of Experimental Biology*. 53, 116-123.
- Silva, C.S.; Silva, J.M.; Oliveira, J.U.L.; Araújo, R.G.V.; Lima, J.R.B.; Guedes, E.L.F.; Santos, M.T.; Montaldo, Y.C.; Santos, T.M.C., 2019. Bioprospecting rhizobacteria associated to cacti to water stress resistance and biofilm formation. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, v. 6 (14),873 - 881. <https://doi.org/10.21438/rbgas.061417>
- Silva, V.B. Micro-organismos colonizadores de nódulos de *Vigna* spp. cultivadas em solos de Caatinga. Areia, PB. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias – CCA. Tese. Setembro de 2020.
- Stepanović, S., Vuković, D., Holá, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., & Růžicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Suzuki, M. T., Giovannoni, S. J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):625-630, 1996. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.625-630.1996>
- Sudtachat, N., Ito, N., Itakura, M., Masuda, S., Eda, S., Mitsui, H., Kawaharada, Y., Minamisawa, K. 2009. Aerobic vanillate degradation and c1 compound metabolism in *bradyrhizobium japonicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 15 p. 5012–5017. <https://doi.org/10.1128/AEM.00755-09>
- Teng, Y., Shen, Y. Y., Luo, Y. M., Sun, X. H., Sun, M. M., Fu, D. Q., et al. 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 186, 1271–1276. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.11.126>
- Terrence, H. B., Etienne, Y., Christine, M., David, J., Lyle, G. W., Charles, W. G. 2011. Identification of nitrogen incorporating bacteria in petroleum-contaminated arctic soils by using [15N] DNA-based stable isotope probing and pyrosequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4163–4171. <https://doi.org/10.1128/AEM.00172-11>
- Toniutti, M. A., Albicoro, F. J., Castellani, L., García, S. L. L., Fornasero, L. V., Zuber, N., Vera, L. M., Vacca, C., Cafiero, J. H., Winkler, A., Kalinowski, J., Lagares, A., Tejerizo, G. a. T., & Del Papa, M. F. 2021. Genome sequence of *Bradyrhizobium yuanmingense* strain P10 130, a highly efficient nitrogen-fixing bacterium that could be used for *Desmodium incanum* inoculation. *Gene*, 768, 145267. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145267>
- Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 2000 Wiley EBooks. <https://doi.org/10.1002/14356007>
- Vasileva, E. (2020, September 12). *the bradyrhizobium japonicum 273 strain's ability to degrade phenol. part 1*. <https://www.scientific-publications.net/en/article/1002058/>
- Vasileva, E., Parvanova-Mancheva, T., Beschkov, V., Alexieva, Z., Gerginova, M., & Peneva, N. 2021. Effects of Constant Electric Field on Biodegradation of Phenol by Free and Immobilized Cells of *Bradyrhizobium japonicum* 273. *Chem. Engineering*, 5(4), 75. <https://doi.org/10.3390/chemengineering5040075>
- Vincent, J. M. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 164p. (IBP Handbook, 15).
- Wang, Z., Walker, G. R., Muir, D. C. G., & Nagatani-Yoshida, K. 2020. Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories. *Environmental Science & Technology*, 54(5), 2575–2584.

- <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06379>
 Weissengruber, L., Möller, K., Puschenreiter, M., & Friedel, J. K. 2018. Long-term soil accumulation of potentially toxic elements and selected organic pollutants through application of recycled phosphorus fertilizers for organic farming conditions. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 110(3), 427–449. <https://doi.org/10.1007/s10705-018-9907-9>
- Williams, M. 2013. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th Edition Edited by M.J.O'Neil, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK ISBN 9781849736701; 2708 pages. April 2013, "50 with 1-year free access to The Merck Index Online. *Drug Development Research*, 74(5), 339. <https://doi.org/10.1002/ddr.21085>
- Yang, E., Liu, J., Chen, D., Wang, S., Xu, L., Ma, K., Zhang, X., Sun, L., & Wang, W. 2022. *Rhizobium cremeum* sp. nov., isolated from sewage and capable of acquisition of heavy metal and aromatic compounds resistance genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(3), 126322. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126322>
- Yao, Z., Kan, F. L., Wang, E. T., Wei, G., & Chen, W. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2219>
- Zhou, M., Zhang, J., & Sun, C. 2017. Occurrence, Ecological and Human Health Risks, and Seasonal Variations of Phenolic Compounds in Surface Water and Sediment of a Potential Polluted River Basin in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(10), 1140. <https://doi.org/10.3390/ijerph14101140>