

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**Vitor Sousa Domingues**

**POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE SUBSTÂNCIAS  
POLIMÉRICAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE UMA MINA DE COBRE NA REGIÃO AMAZÔNICA**

**Belo Horizonte**

**2014**

**Vitor Sousa Domingues**

**POTENCIAIS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE SUBSTÂNCIAS  
POLIMÉRICAS EXTRACELULARES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE UMA MINA DE COBRE NA REGIÃO AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos**

**Coorientadora: Profa. Dra. Andrea de Souza Monteiro**

**Belo Horizonte**

**2014**

043 Domingues, Vitor Sousa.  
potenciais aplicações biotecnológicas de substâncias poliméricas extracelulares  
produzidas por bactérias isoladas de uma mina de cobre na região amazônica [manuscrito]  
/ Vitor Sousa Domingues. – 2014.  
143 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Vera Lúcia dos Santos. Coorientador: Andrea de Souza Monteiro.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Matriz Extracelular de Substâncias Poliméricas. 3. Metais  
Pesados. 4. Emulsificantes. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Co-orientador: Prof. Andréa de Souza Monteiro  
Relatora e Suplente: Dra. Swiany Silveira Lima  
Suplente externo: Dr. César Lúcio Lopes de Faria Júnior

Às 14:00 horas do dia 17 de fevereiro de 2014, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Andréa de Souza Monteiro - Co-Orientador (UNIVALE), Fátima de Cássia Oliveira Gomes (CEFET-MG), Miriam Cristina Santos Amaral (Escola de Engenharia) e a Profa. Vera Lúcia dos Santos - Orientadora, para julgar o trabalho final "Potenciais aplicações biotecnológicas das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por bactérias isoladas de uma mina de cobre na região Amazônica", do aluno Vitor Sousa Domingues, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2014.

Dra. Dr. Andréa de Souza Monteiro Andréa de Souza Monteiro

Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Dra. Miriam Cristina Santos Amaral Miriam C.S. Amaral

Profa. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora) Vera Lúcia dos Santos

Cláudio Antônio Bonjardim  
Prof. Cláudio Antônio Bonjardim  
Coordenador

Dedico esta dissertação a vó Iaiá, pelo  
amor incondicional, por acreditar em  
mim e por deixar saudades que tanto me  
motivam.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, a Profa. Dra. Vera Lúcia dos Santos, que há cinco anos me deu uma oportunidade e seguiu acreditando em mim. Obrigado pela liberdade que me deu para conduzir meus experimentos, pela confiança depositada e pela paciência nas longas discussões de projeto e resultados.

Agradeço também à minha coorientadora, Profa. Dra. Andrea de Souza Monteiro, que me acompanhou desde o primeiro dia de laboratório e me ajudou com sua experiência na bancada, sua disponibilidade e sua objetividade para lidar com os problemas que surgiam.

Agradeço a Amanda, que dividiu comigo este projeto, fazendo das minhas metas, as suas. Obrigado pela amizade, pela compreensão, por ter se dedicado e assumido responsabilidades e por ter aberto mão do seu tempo para que chegássemos aos nossos objetivos. Agradeço também a Ana Luiza, que esteve do meu lado mesmo quando os planos não estavam traçados e fez do início de tudo mais fácil com sua organização, seu capricho e sua disciplina. E ao Rodolfo, pela vontade de aprender e de se envolver no projeto.

Agradeço especialmente a todos os meus colegas que passaram pelo Laboratório de Microbiologia Aplicada por esses anos. Aprendi muito com todos vocês, desde quando nada ainda me era familiar até os últimos dias deste projeto. Vocês fizeram minhas tardes mais agradáveis e até as lavagens de material, mais divertidas. Sempre estiveram dispostos a me ajudar. Hoje levo comigo mais que colegas, levo amigos e espero um dia poder retribuir a cada um de vocês.

Agradeço a todos os outros alunos do departamento, aos técnicos e professores que contribuíram de uma maneira ou de outra para que os experimentos pudessem ser realizados. Em especial ao Jamil, pela atenção e presteza com que trata a todos e a quem recorri por muitas vezes ao longo dos anos. E à profa. Dra. Regina Maria Nardi Drummond, pelo carinho com que sempre me acolheu e pela personalidade afável e sempre disposta a ajudar.

Agradeço também à Equipe do Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Muito obrigado, profa. Cláudia Carvalhinho Windmöeller, por me receber e me acolher em seu laboratório e me ajudar na realização de etapas tão essenciais ao meu projeto. Obrigado também, Louise e Cláudia, que estiveram comigo durante os dias de medição me dando toda a base

para que eu pudesse realizar os experimentos necessários. Agradeço à equipe responsável pela plataforma de sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisa René Rachou pelas análises conduzidas e pelo atendimento excepcional. Agradeço ainda aos funcionários da Vale, em especial ao Tobias, por nos receberem com prontidão e nos fornecerem o suporte necessário à coleta das amostras.

Agradeço aos amigos que fiz na pós-graduação, que dividiram as angústias, as dúvidas, os desafios e intensificaram os momentos felizes que passamos, muitas vezes regados a cervejas e discos-voadores no Tia Ruth. Vocês fizeram a trajetória muito mais fácil.

Agradeço aos eternos amigos de graduação que não deixaram que a “Hakuna Matata” se tornasse só uma lembrança e estiveram sempre comigo. Obrigado pelos conselhos, pelos bons momentos e pelos encontros ao longo da semana que me divertiam, me animavam e me motivavam a continuar. Agradeço em especial àquelas que seguiram os mesmos caminhos e estiveram diariamente ao meu lado.

Agradeço aos meus outros amigos que por sorte acumulei ao longo da vida, em Pedro Leopoldo ou mundo afora, e que nunca me deixaram sozinho, nos bons e maus momentos, fazendo-os mais divertidos. Obrigado por serem minha dose de realidade quando trabalhar no fim de semana parecia ser sempre mais importante. Poder contar com vocês para esquecer dos problemas, beber uma cerveja e falar bobagem faz com que a semana comece bem melhor.

Por fim, agradeço à minha família, que sempre se preocupou comigo, se envolveu com meus problemas, me motivou e foi meu maior exemplo como pessoa e profissional. Graças a vocês pude chegar até aqui e tudo que vocês fizeram por mim fez com o que caminho parecesse menos árduo e eu o atravessasse mais confiante, com a certeza da base sólida que vocês construíram.

A todos vocês, muito obrigado, por tudo.

*“Vivendo, se aprende; mas o que se  
aprende, mais, é só a fazer outras  
maiores perguntas.”*

João Guimarães Rosa

## RESUMO

Substâncias poliméricas extracelulares são produtos microbianos que podem ser compostos por proteínas, lipídeos e, usualmente predominantes, polissacarídeos, e que desempenham diversas funções no ciclo de vida microbiano. Podem ainda estar envolvidas na resposta a fatores de estresse ambiental e agir na proteção das células, prevenindo a ação de compostos como os metais pesados, através da adsorção dos íons a grupos funcionais presentes na estrutura da molécula que impedem que causem danos ao penetrarem no citoplasma. Devido ao seu papel na colonização de superfícies, alguns exopolímeros também podem ser anfipáticos e agir como emulsificantes. Com todas essas propriedades, esses compostos possuem potencial utilização em processos que envolvam a remoção de metais do ambiente e a emulsificação de substâncias hidrofóbicas e este trabalho buscou, portanto, identificar moléculas com essas características. Para isso, a técnica de enriquecimento com chumbo, arsênio e cádmio ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e cobre e zinco ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi utilizada para o isolamento de bactérias resistentes aos metais em amostras coletadas em uma mina de cobre na região amazônica e as densidades variaram de  $2,42 \cdot 10^3$  a  $1,34 \cdot 10^8$  NMP  $\text{mL}^{-1}$ . Dos 77 isolados obtidos, 45 se mostraram produtores de exopolissacarídeos, indicando uma provável produção de outros polímeros extracelulares. Os gêneros *Bacillus* e *Alcaligenes* predominaram, mas a frequência relativa de cada um variou conforme a amostra e o metal utilizado. As características tensoativas do sobrenadante da cultura dos 45 isolados foram analisadas para a seleção de três deles, identificados como *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2. Suas moléculas precipitadas, predominantemente lipídicas, mostraram índices de emulsificação do tolueno acima de 50%, que se mantiveram estáveis a tratamentos térmicos, apesar de uma influência negativa do pH e da salinidade. Outros substratos, sobretudo organoclorados, também foram capazes de ser emulsificados. Nos testes de remoção de cobre e mercúrio de solução, a técnica de equilíbrio por diálise se mostrou mais eficiente. Outros ensaios conduzidos com a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 mostraram uma maior afinidade pelos íons  $\text{Hg}^{2+}$ . Além disso, um aumento na concentração do metal levou a uma maior quantidade de íons adsorvida por grama da molécula, apesar da diminuição nas taxas percentuais de remoção. Os resultados indicaram um potencial de utilização das substâncias poliméricas extracelulares analisadas em processos industriais ou de biorremediação, em que as propriedades testadas podem ser exploradas junto à natureza biológica dos compostos, que sugere maior compatibilidade ambiental.

**Palavras-chave:** substâncias poliméricas extracelulares, metais pesados, bioemulsificantes.

## ABSTRACT

Extracellular polymeric substances are microbial products, which can be composed of proteins, lipids and, usually prevailing, polysaccharides, and that perform many roles in the microbial lifecycle. They can still be involved in the response to environmental stress factors and act protecting the cells, avoiding the activity of compounds as heavy metals through adsorbing them into functional groups in the molecule structure and so preventing the damages caused due to the penetration in the cytoplasm. Because of their roles in the surfaces colonization, some exopolymers can also be amphiphilic and act as emulsifiers. With all these properties, these compounds have a potential to be used in processes involving the heavy metal removal from the environment and the emulsification of hydrophobic substances and therefore this study aimed to identify molecules owning these features. Thereunto, the enrichment technique using lead, arsenic and cadmium ( $3 \text{ mmol L}^{-1}$ ) and copper and zinc ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$ ) was used to isolate bacteria from samples gathered in a copper mine in the Amazon region and the densities varied from  $2,42 \cdot 10^3$  to  $1,34 \cdot 10^8 \text{ NMP mL}^{-1}$ . From the 77 isolates, 45 showed exopolysaccharides production, suggesting a probable production of other extracellular polymers. The genera *Bacillus* and *Alcaligenes* prevailed, but the relative frequency from each one varied according to the sample and the metal used. The surface activity of the 45 isolates culture supernatants was analyzed for selecting three of them, identified as *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 and *Bacillus* sp. E4.Cu 2. Their precipitated molecules, lipids prevailing, showed toluene emulsifying indexes higher than 50% that kept the stability after thermal treatments, in spite of a negative influence of pH and salinity. Other substrates, especially organochlorides, could be also emulsified. In the removal essays of copper and mercury from solution, the dialysis equilibrium technique showed a higher efficiency. Other experiments performed using the biomolecule produced by *Bacillus* sp. E4.Cu 2 verified a more intense affinity for  $\text{Hg}^{2+}$  ions. Furthermore, an increase in the metal concentration led to a higher amount of ions adsorbed for gram of the molecule, in spite of a decrease in the removal percentage rates. The results presented a potential use of the extracellular polymeric substances analyzed in industrial or bioremediation processes in which the evaluated properties could be exploited along with the biological nature of the compounds that suggest a higher environmental compatibility.

**Key words:** extracellular polymeric substances, heavy metals, bioemulsifiers.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Determinação da concentração micelar crítica .....	31
<b>FIGURA 2</b>	Modelo esquemático da assimilação bacteriana de poluentes oleosos por ação de um composto ativo de superfície .....	36
<b>FIGURA 3</b>	Esquema para sequestro e recuperação de metais por emulsificação .....	39
<b>FIGURA 4</b>	Mina do Sossego .....	42
<b>FIGURA 5</b>	Fluxograma da Usina do Sossego, Carajás .....	43
<b>FIGURA 6</b>	Pontos de coleta das amostras.....	45
<b>FIGURA 7</b>	Densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes aos diferentes metais a partir das cinco amostras coletadas obtidas através da técnica de NMP ..	57
<b>FIGURA 8</b>	Densidade absoluta dos gêneros bacterianos de cada cultura de enriquecimento das cinco diferentes amostras utilizando os metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco .....	62
<b>FIGURA 9</b>	Frequência relativa dos gêneros bacterianos de cada cultura de enriquecimento das cinco diferentes amostras utilizando os metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco .....	63
<b>FIGURA 10</b>	Densidade microbiana absoluta das bactérias produtoras de exopolissacarídeos em cada cultura de enriquecimento das cinco diferentes amostras utilizando os metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco.....	65
<b>FIGURA 11</b>	Redução da tensão superficial em função da concentração, na solução, das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2.....	78
<b>FIGURA 12</b>	Influência da concentração da substância polimérica extracelular produzida por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5 no índice de emulsificação do tolueno.....	80
<b>FIGURA 13</b>	Influência da concentração da substância polimérica extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 no índice de emulsificação do tolueno .....	80
<b>FIGURA 14</b>	Influência da concentração da substância polimérica extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 no índice de emulsificação do tolueno .....	81
<b>FIGURA 15</b>	Influência do pH na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	83

<b>FIGURA 16</b>	Influência da temperatura na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	85
<b>FIGURA 17</b>	Influência da salinidade na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	86
<b>FIGURA 18</b>	Influência do substrato hidrofóbico na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	87
<b>FIGURA 19</b>	Remoção de íons $\text{Cu}^{2+}$ de solução através da formação de emulsões simples utilizando as substâncias poliméricas extracelulares de <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2.....	90
<b>FIGURA 20</b>	Remoção de íons $\text{Hg}^{2+}$ de solução através da formação de emulsões simples utilizando as substâncias poliméricas extracelulares de <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2.....	91
<b>FIGURA 21</b>	Remoção de íons $\text{Cu}^{2+}$ de solução através da aplicação da camada emulsificada formada com as substâncias poliméricas extracelulares de <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2.....	92
<b>FIGURA 22</b>	Remoção de íons $\text{Hg}^{2+}$ de solução através da aplicação da camada emulsificada formada com as substâncias poliméricas extracelulares de <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2.....	93
<b>FIGURA 23</b>	Remoção de íons $\text{Cu}^{2+}$ de solução em diferentes concentrações iniciais através da adsorção à substância polimérica extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	95
<b>FIGURA 24</b>	Remoção de íons $\text{Hg}^{2+}$ de solução a uma concentração inicial de 0,1 ppm através da adsorção às diferentes substâncias poliméricas extracelulares produzidas por <i>Actinomyces viscosus</i> E3.Pb 5, <i>Bacillus</i> sp. E3.Cd 2 e <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	96
<b>FIGURA 25</b>	Remoção de íons $\text{Hg}^{2+}$ de solução em diferentes concentrações iniciais através da adsorção à substância polimérica extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 .....	97

<b>FIGURA 26</b>	Quantidade de íons $Hg^{2+}$ adsorvidos por grama da substância polimérica extracelular produzida por <i>Bacillus</i> sp. E4.Cu 2 ao longo do período experimental dos ensaios de remoção através da técnica de equilíbrio de diálise .....	97
<b>FIGURA 27</b>	Isotermas dos modelos de Langmuir e Freundlich e dos dados experimentais da taxa de remoção de mercúrio de acordo com a concentração inicial do metal .....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Exemplos representativos de alguns polissacarídeos microbianos.....	27
<b>TABELA 2</b>	Combinação de soluções utilizadas para obtenção de cada um dos valores de pH .....	52
<b>TABELA 3</b>	Identificação dos isolados por meio da comparação das sequências obtidas da região 16S do DNA ribossomal com o banco de dados do GenBank .....	59
<b>TABELA 4</b>	Resultado dos testes de detecção da produção de exopolissacarídeos em meio acrescido dos corantes Vermelho Congo e Calcoflúor .....	64
<b>TABELA 5</b>	Resultado dos ensaios de atividade emulsificante (E <sub>24</sub> ), redução da tensão superficial e de produção de substâncias poliméricas extracelulares do sobrenadante da cultura dos isolados que obtiveram resultado positivo nos testes de Vermelho Congo e Calcoflúor .....	73
<b>TABELA 6</b>	Constantes das equações de Langmuir e Freundlich .....	98

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- **EPS** – exopolissacarídeo
- **EDTA** – ácido etilenodiamino tetra-acético
- **CMC** – concentração micelar crítica
- **DO** – densidade óptica
- **mN m<sup>-1</sup>** – milinewton por metro
- **E1** – amostra coletada da subsuperfície da extremidade depurada da lagoa de rejeitos, da água da barragem de rejeitos que infiltra no solo e brota na superfície da mina e da água depurada da barragem de rejeitos que é bombeada para ser reutilizada nos processos industriais
- **E2** – amostras coletadas nos flotores iniciais de calcopirita
- **E3** – amostras coletadas do efluentes depositado na lagoa e da lama recém-sedimentada na barragem
- **E4** – amostras coletadas da lama sedimentada já estabilizada em um ponto mais distante do despejo de efluentes na barragem de rejeitos
- **E5** – amostras coletadas próximas à lama sedimentada já estabilizada, mas distribuída em pontos com maior proximidade do solo, em que havia o crescimento de alguns vegetais e a atividade de ferrobactérias era evidenciada por uma coloração de ferrugem no sedimento
- **K<sub>L</sub>** – constante de Langmuir
- **K<sub>F</sub>** – constante de Freundlich

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>18</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>22</b>
2.1.	Micro-organismos e metais pesados.....	22
2.2.	Substâncias poliméricas extracelulares microbianas e sua interação com metais .....	26
2.3.	Compostos ativos de superfície microbianos .....	30
2.4.	Aplicações biotecnológicas .....	33
2.4.1.	Substâncias poliméricas extracelulares na adsorção de metais .....	33
2.4.2.	Substâncias poliméricas extracelulares na formação de emulsões.....	35
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1.	Objetivo geral .....	41
3.2.	Objetivos específicos.....	41
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1.	Área de coleta das amostras .....	42
4.2.	Coleta das amostras .....	43
4.3.	Determinação da densidade de bactérias heterotróficas resistentes a metais na amostra .....	44
4.4.	Isolamento de bactérias resistentes a metais pesados.....	46
4.5.	Identificação dos isolados por sequenciamento parcial do DNAr 16S .....	47
4.5.1.	Extração de DNA .....	47
4.5.2.	Amplificação das regiões do DNAr 16S .....	47
4.5.3.	Purificação dos produtos de amplificação.....	48
4.5.4.	Sequenciamento.....	48
4.5.5.	Identificação de morfotipos produtores de exopolissacarídeos.....	49
4.6.	Identificação de morfotipos produtores de exopolissacarídeos.....	49
4.7.	Caracterização da produção de substâncias poliméricas extracelulares e da atividade tensoativa do sobrenadante das culturas dos isolados produtores.....	50
4.8.	Potenciais aplicações tecnológicas .....	50
4.8.1.	Análise das características tensoativas .....	51

4.8.1.1.	Determinação da concentração micelar crítica.....	51
4.8.1.2.	Caracterização da atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares .....	51
4.8.1.2.1.	Avaliação da influência da concentração na atividade emulsificante .....	51
4.8.1.2.2.	Avaliação da influência do pH na atividade emulsificante .....	51
4.8.1.2.3.	Avaliação da influência do aquecimento na atividade emulsificante.....	52
4.8.1.2.4.	Avaliação da adição de eletrólitos na atividade emulsificante .....	52
4.8.1.2.5.	Avaliação da natureza da fase hidrofóbica na atividade emulsificante .....	52
4.8.2.	Ensaio de remoção de metal .....	53
4.8.2.1.	Ensaio de remoção de metais utilizando a camada emulsificada .....	53
4.8.2.2.	Ensaio de biossorção de metais pesados às substâncias poliméricas extracelulares .....	54
4.9.	Caracterização bioquímica .....	55
4.10.	Análises estatísticas.....	56
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1.	Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a metais pesados nas amostras.....	57
5.2.	Isolamento de bactérias resistentes a metais pesados pela técnica de enriquecimento e detecção dos isolados produtores de exopolissacarídeos .....	59
5.3.	Caracterização da atividade tensoativa do sobrenadante das culturas produtoras de exopolissacarídeos.....	72
5.4.	Aplicações biotecnológicas .....	76
5.4.1.	Análise das características tensoativas.....	77
5.4.1.1.	Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	77
5.4.1.2.	Caracterização da atividade emulsificante .....	79
5.4.1.3.	Avaliação da influência do pH na atividade emulsificante .....	82
5.4.1.4.	Avaliação da influência da temperatura na atividade emulsificante .....	84
5.4.1.5.	Avaliação da influência da salinidade na atividade emulsificante .....	85
5.4.1.6.	Avaliação da natureza da fase hidrofóbica na atividade emulsificante.....	87
5.4.2.	Ensaio de remoção de metal .....	89
5.4.2.1.	Ensaio de remoção de metais utilizando a camada emulsificada .....	91

5.4.2.2. Ensaio de biossorção de metais pesados às substâncias poliméricas extracelulares utilizando a técnica de equilíbrio por diálise.....	94
5.5. Caracterização bioquímica .....	100
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>
<b>8. APÊNDICES .....</b>	<b>139</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Estima-se que a saúde de 200 milhões de pessoas em todo o mundo esteja em risco devido aos compostos tóxicos despejados por indústrias e mineradoras que poluem o meio ambiente (Blacksmith Institute & Green Cross, 2013). A Organização Mundial da Saúde declarou que cerca de 19% da incidência global de câncer seja em decorrência da exposição a fatores ambientais, o que corresponde a 1,3 milhão de mortes por ano (Prüss-Üstun & Corvalán, 2006). E um estudo feito pelo Observatório da Saúde Mundial mostrou que 20% das mortes no Brasil são desencadeadas por alterações adversas no meio ambiente (Organização das Nações Unidas, 2004).

Além disso, a poluição causa prejuízos econômicos à sociedade. Em 2007, seus custos ao governo chinês eram estimados em até 100 bilhões de dólares, o que equivalia a 5,8% do PIB nacional, e cresciam em ritmo mais acelerado do que a efervescente economia do país (State Environmental Protection Administration & The World Bank, 2007). Outros danos difíceis de serem mensurados são aqueles causados ao patrimônio genético dos ecossistemas (Piola & Johnston, 2008).

Dentre os principais poluentes lançados no meio ambiente estão os metais pesados, que podem ter suas concentrações aumentadas por mecanismos naturais, como o intemperismo, mas que na maioria das vezes são subprodutos de atividades antropogênicas. Desde os primórdios, esses compostos estiveram associados ao desenvolvimento da humanidade, mas com o início da industrialização mundial, foram sendo constantemente descartados nos efluentes e constituem hoje, um dos mais importantes problemas de contaminação ambiental (Çelik *et al.*, 2005).

Essa preocupação advém do estresse oxidativo gerado pelos íons metálicos, que podem levar, dentre outras complicações, ao comprometimento do sistema imunológico, a neuropatias e neoplasias. Ademais, os danos causados pelos metais pesados não se limitam aos seres humanos, aos outros animais e às plantas, mas atingem também os micro-organismos, alterando seu crescimento, sua morfologia e sua atividade metabólica e resultando em uma diminuição da sua biomassa e da sua diversidade (Wang & Chen, 2009).

Dentre as maiores formas de despejo de metais pesados no meio ambiente, estão as minerações e as fundições de minérios, a metalurgia, a siderurgia, indústrias de tratamento de superfícies, galvanização, eletrólise, produção de energia e de combustíveis, usinas nucleares, fertilizantes e pesticidas, tratamento do couro, fotografia, fabricação de aparelhos eletrônicos e aeroespaciais (Wang & Chen, 2009). No fim do século passado, a indústria de metais contribuía

com a deposição de cerca de 0,39 milhão de toneladas por ano de metais no meio ambiente, enquanto a agricultura contribuía com 1,4 milhão de toneladas, a indústria de combustíveis e energia, com 2,4 milhões de toneladas, a indústria de produção de eletrônicos, com 0,24 milhão de toneladas e a destinação de resíduos, com 0,72 milhão de toneladas (Brower *et al.*, 1997). Os metais mais comumente encontrados em contaminações ambientais são cobre, cromo, níquel, zinco, arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio (Akpor & Muchie, 2010), sendo os quatro últimos, aqueles mais tóxicos ao homem.

De acordo com a Fundação Estadual do Meio Ambiente de Minas Gerais (FEAM), no ano de 2013, o estado possuía cerca de 354 áreas contaminadas gerenciadas pela instituição. Dentre as principais fontes de contaminação estão o chumbo, presente em 32 áreas, o arsênio, em 16, o cobalto, em 14, o manganês, em 14, o zinco, em 14, o cádmio, em 12, o cromo, em 12, o cobre, em quatro e o mercúrio, em duas (FEAM, 2013a). Dados da FEAM mostram também que o estado de Minas Gerais, notável pelo volume de mineradoras e pela importância do beneficiamento de metais para sua economia, produziu no ano de 2012, aproximadamente 51 milhões de toneladas de rejeito de beneficiamento mineral (FEAM, 2013b). E de todos os empreendimentos monitorados pela Fundação em 2011, dezesseis geram rejeitos contaminados com arsênio, dois, com cádmio, nove, com cobre, dois com chumbo e oito, com cromo. Sendo que dos efluentes líquidos gerados, os metais predominantemente presentes são ferro, arsênio, cromo, alumínio, lítio, prata e manganês (FEAM, 2011).

Paralelamente, a contaminação por produtos do refino de petróleo está presente em 83,6% de todas as áreas inventariadas pela FEAM em 2012, o que corresponde a 296 ocorrências (FEAM, 2013a). Os hidrocarbonetos se destacam por sua ampla utilização em diversos segmentos industriais, mas também podem causar danos aos seres vivos e ao meio ambiente, agindo como agentes carcinogênicos, alterando parâmetros ambientais, causando danos às células e ao metabolismo, sobretudo por sua natureza hidrofóbica (Chen & Liao, 2006).

Atualmente, buscam-se novas tecnologias para o tratamento de efluentes e a remediação de áreas contaminadas, sobretudo alternativas menos agressivas ao meio ambiente e economicamente vantajosas. As técnicas mais utilizadas consistem em tratamento químico e eletroquímico, que não removem eficientemente todos os poluentes e, muitas vezes, modificam os parâmetros físico-químicos naturais. Na remediação de metais, são utilizadas também a troca iônica e a adsorção em carvão ativado, que são extremamente caras. Neste contexto, se destaca a biossorção de íons metálicos à biomassa microbiana, em especial às substâncias poliméricas extracelulares. As diversas moléculas excretadas por micro-organismos, dentre elas

polissacarídeos e proteínas, possuem resíduos de carga negativa capazes de adsorver e complexar os metais, removendo-os do ambiente e permitindo sua recuperação (Pérez *et al.*, 2008).

Muitas substâncias poliméricas extracelulares possuem também ação surfactante e emulsificante, podendo ser aplicadas em diversas outras áreas, como a indústria farmacêutica, de alimentos, petrolífera, de produtos de limpeza e também na biorremediação. Os emulsificantes são capazes de disponibilizar poluentes hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos, para que os micro-organismos presentes no meio sejam capazes de absorvê-los e degradá-los (Makkar & Cameotra, 2002). Tais características podem ser aproveitadas, portanto, no tratamento de efluentes domésticos e industriais.

Em Minas Gerais, dez áreas monitoradas pela FEAM estão concomitantemente contaminadas com hidrocarbonetos e metais pesados, sobretudo chumbo (FEAM, 2013a). Nos Estados Unidos, estima-se que em 37% das áreas contaminadas com produtos petroquímicos também estejam presentes metais tóxicos, onde prevalecem chumbo, cádmio e mercúrio. Tal situação dificulta alguns processos de biorremediação, pois muitas vezes cada composto deve ser tratado de forma diferente, além de que alguns deles podem ser tóxicos aos micro-organismos degradadores utilizados sobretudo em processos de bioaugmentação. A utilização de uma técnica capaz de remover os dois tipos de poluentes seria, portanto, bastante útil para a descontaminação e, assim, as substâncias poliméricas extracelulares poderiam ser uma alternativa aos quelantes químicos, usualmente mais caros, como o EDTA. Por isso a utilização de micro-organismos resistentes ou moléculas estáveis à ação dos contaminantes se torna uma estratégia atraente para o tratamento dessas áreas (Singh & Cameotra, 2004).

O mercado de polímeros anfipáticos girava em torno de quatro milhões de dólares em 2008, mas o mercado de produtos biológicos ainda é dominado por polissacarídeos vegetais e de algas, como pectinas e alginatos. A única substância polimérica extracelular bacteriana produzida significativamente em larga escala é a goma xantana (Freitas *et al.*, 2011). Ainda é preciso desenvolver um processo de produção de baixo custo para biopolímeros com utilização na biorremediação de metais pesados e hidrocarbonetos e um passo importante é a triagem de micro-organismos produtores.

Explorando a floresta amazônica, considerada o mais importante reservatório mundial de biodiversidade, mas que é ainda pouco conhecida, pode-se obter micro-organismos autóctones com altos potenciais enzimáticos e de outros metabólitos, que vêm sendo negligenciados, mas que podem exibir elevada diversidade funcional de interesse biotecnológico. O estudo dos micro-organismos presentes nas áreas de exploração mineral da

região é ainda capaz de fornecer espécies adaptadas ao estresse físico-químico e a outras pressões seletivas da atividade mineradora e que possivelmente expressem mecanismos de resistência, como a produção de substâncias poliméricas extracelulares. Desta forma, este estudo visou à exploração dessa biodiversidade e das moléculas produzidas por bactérias presentes nessas áreas de estresse através da análise de suas características funcionais. O estudo dessas propriedades é um passo importante no descobrimento de substâncias com possíveis aplicações em processos biotecnológicos e de biorremediação e na utilização de bioprodutos em larga escala com potencial de substituir os compostos químicos atualmente empregados.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Micro-organismos e metais pesados

A definição do termo “metal pesado” ainda é muito controversa e esteve sempre associada a metais e metalóides envolvidos em contaminações e notáveis por sua potencial ecotoxicidade (Duffus, 2002). Muitas vezes, a sua densidade determina o conjunto de elementos sob esta denominação. Weast (1984) define como metais pesados, aqueles com densidade superior a  $5 \text{ g/cm}^3$ , incluindo, assim, na sua classificação, 52 metais e um metaloide, o arsênio, e essa será a definição adotada neste trabalho.

A distribuição eletrônica da maioria dos átomos categorizados como metais pesados lhes confere uma característica de cátions com perfil redox ativo. Graças a essa propriedade, muitos elementos participam de sistemas biológicos, como parte de uma série de reações bioquímicas (Nies, 1999). Entretanto, os metais pesados são requeridos em concentrações traço e aqueles com potencial redox muito elevado não são nem mesmo utilizados pela célula, uma vez que podem causar danos, sobretudo através de indução de auto-oxidação, que produz espécies reativas de oxigênio capazes de oxidar moléculas celulares importantes, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Flora *et al.*, 2008). Os metais pesados também exibem a capacidade de se ligar fortemente a átomos de enxofre, podendo inativar moléculas que contêm este elemento, como enzimas que possuem resíduos de cisteína (Zaidi *et al.*, 2012). Além disso, podem apresentar mais afinidade por ligantes com importância metabólica do que outros metais com funções biológicas, suprimindo suas atividades (Bruins *et al.*, 2000).

Os metais pesados ocorrem naturalmente no meio ambiente, mas desde a Revolução Industrial, suas concentrações vêm aumentando progressivamente, com alteração da sua distribuição na superfície terrestre e solubilização nos corpos d'água (Wood & Wang, 1983). Tais modificações expõem o ecossistema a efeitos adversos, os quais também são sentidos pelos micro-organismos.

Nos Estados Unidos, os metais mais encontrados em ambientes contaminados são chumbo, cromo, arsênio, zinco, cádmio, cobre e mercúrio (Wuana & Okieimen, 2011). Cobre, zinco e cromo desempenham papéis no metabolismo microbiano, enquanto cádmio, mercúrio, chumbo e arsênio raramente são essenciais às suas funções metabólicas (Bruins *et al.*, 2000).

O cobre é importante sobretudo no metabolismo de micro-organismos aeróbios, agindo como cofator enzimático, catalisando o transporte de oxigênio ou reações redox envolvendo, muitas vezes,  $\text{O}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{NO}_2^-$  (Solioz, 2001). O cobre também é importante na atividade de

citocromo oxidases, envolvidas na obtenção de energia, e superóxido dismutases, que protegem contra espécies reativas de oxigênio (Dupont *et al.*, 2011). Por outro lado, em altas concentrações, o cobre exerce efeito inverso, podendo prejudicar a respiração celular e gerando radicais livres que danificam, sobretudo, a membrana plasmática (Ochoa-Herrera *et al.*, 2011). Já o papel principal do zinco no metabolismo microbiano está na sua interação com as DNA e RNA polimerases bacterianas, que sintetizam as fitas de ácido nucléico. Ele também participa das reações catalisadas por anidrases carbônicas, importantes nos processos de fotossíntese e respiração celular (Giedroc *et al.*, 1986). Já a sua abundância prejudica a assimilação de outros íons fundamentais ao metabolismo microbiano, como o manganês (McDevitt *et al.*, 2011).

O cádmio, por sua vez, mesmo em baixíssimas concentrações, é capaz de alterar o crescimento e a morfologia bacteriana e também afetar a divisão celular (Hossain *et al.*, 2012). Os íons cádmio levam a significativos danos ao DNA, promovendo a ruptura de fitas-simples e inibindo sua replicação (Bruins *et al.*, 2000). O mercúrio se destaca por sua afinidade ainda maior por grupos sulfidrilas, inativando assim, enzimas importantes para o metabolismo da célula. Além disso, a facilidade em formar ligações covalentes com compostos celulares faz com que o mercúrio se acumule em sistemas biológicos e dificilmente seja excretado (Bruins *et al.*, 2000). Também possui capacidade de reagir com diversos sítios do DNA e apresenta uma relevante genotoxicidade, bem como pode se ligar à parede celular de bactérias e modificar, assim, sua densidade (Wang *et al.*, 2012).

O chumbo se liga à cromatina e desencadeia sua fragmentação, altera sua conformação e sua distribuição. Os danos ao material genético, à membrana plasmática e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio também podem induzir vias apoptóticas (Bussche & Soares, 2011). Por fim, o arsênio, por apresentar-se na forma de arseniato, que é muito semelhante aos íons fosfato, pode interferir em reações químicas em que o fósforo é essencial, como na fosforilação oxidativa e na glicólise. Também pode ser responsável pela ligação cruzada entre moléculas de DNA ou entre moléculas de DNA e proteínas, prejudicando suas funções metabólicas (Kaur *et al.*, 2011).

Diante dos efeitos dos metais pesados, diversos micro-organismos apresentam mecanismos selecionados ao longo da evolução que evitam ou amenizam os danos causados pela exposição a esses compostos e regulam seu equilíbrio acuradamente, de forma a impedir sua absorção, transformar os íons por reações de oxi-redução ou imobilizá-los em complexos biológicos (Bruins *et al.*, 2000).

Uma das respostas ao aumento das concentrações de metais pesados no meio ocorre através de alterações na membrana plasmática. Uma das principais alterações é a repressão da

expressão de canais iônicos inespecíficos que permitiriam o influxo de metais tóxicos, reduzindo sua permeabilidade aos íons (Nies, 1999). Outras respostas visam a manter a fluidez e a integridade da membrana celular, por exemplo, através da mudança no perfil de ácidos graxos (Markowicz et al., 2010). Um aumento na carga negativa da membrana também pode impedir que a repulsão de carga provocada pelos cátions rompa a bicamada lipídica (Mykytczuk et al., 2011).

A modificação mais estudada que ocorre no envoltório celular de procarionotes é o aumento da expressão ou da atividade de bombas de efluxo utilizadas para expulsar os metais tóxicos do citoplasma para o exterior (Nies, 2003). Este mecanismo é o mais utilizado pelos micro-organismos e pode ser codificado por genes cromossomais ou plasmidiais. Além disso, geralmente são dependentes de ATP e específicos para diferentes metais, ainda que trabalhos indiquem que algumas bombas de efluxo podem ser inespecíficas e até mesmo estar envolvidas na resistência microbiana a antibióticos e xenobióticos (Bruins et al., 2000; Martinez et al., 2009). Estão muitas vezes envolvidas na eliminação dos cátions, sobretudo  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (Silver, 1996).

Os micro-organismos podem ainda converter os metais pesados em formas menos tóxicas através de oxidação ou redução enzimáticas (Ehrlich, 1997). Dentre as possíveis reações, estão a oxidação do arsenito ( $\text{AsO}_2^-$ ) a arseniato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), sua forma menos tóxica, por uma linhagem de *Alcaligenes faecalis* (Ehrlich, 1996) ou a redução de cromo hexavalente ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) a cromo trivalente ( $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ), sua forma menos solúvel, por *Pseudomonas fluorescens* LB300 ou *Enterobacter cloacae* (Wang & Shen, 1995).

Muitas reações de oxi-redução de metais são dependentes de outras modificações celulares, como a expressão de proteínas transportadoras, por isso, os genes que codificam as enzimas responsáveis pela transformação desses íons podem estar contidos em operons que também codificam outras proteínas envolvidas na detoxificação. Surpreendentemente, algumas bactérias resistentes ao arsênio possuem um operon que codifica uma enzima capaz de converter o arseniato a arsenito, a forma mais tóxica do metaloide. Por outro lado, o mesmo operon codifica uma proteína transportadora que atua conjuntamente com a enzima redutora e expulsa rapidamente o ânion do citoplasma (Silver, 1996). No caso do mercúrio, sua redução de  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  está acoplada a processos respiratórios e é mediada por uma enzima presente no operon *mer* que sintetiza a forma elementar do metal, volátil, que é perdida pela célula por difusão. A presença, no operon, do gene codificador de uma enzima capaz de romper ligações entre mercúrio e carbonos orgânicos aumenta o espectro de resistência bacteriano a outros compostos contendo o átomo (Robinson & Tuovinen, 1984).

Outros íons, tais como o  $Zn^{2+}$  e o  $Cd^{2+}$ , possuem potenciais de redução muito baixos e, por isso, não podem ser convertidos pela maquinaria celular (Nies, 1999). Dessa forma, são necessários outros mecanismos para sua detoxificação.

Uma vez no citoplasma, a célula pode se utilizar da alta afinidade dos resíduos de enxofre por metais para sequestrá-los em substâncias orgânicas. Para isso, micro-organismos, tais como *Synechococcus* sp. ou *Pseudomonas* sp. produzem proteínas ricas em cisteína ou metalotioneínas que se ligam a cátions como  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  ou  $Zn^{2+}$  (Bruins *et al.*, 2000; Silver & Phung, 1996). Outras substâncias utilizadas são as glutatonas, peptídeos com resíduos de enxofre, que também podem se ligar aos íons, além de apresentarem propriedades antioxidantes, que reduzem os danos causados pelos metais pesados (Nies, 1999). As bactérias podem internalizar os íons metálicos ativamente, transportando-os para o citoplasma para que sejam sequestrados nessas substâncias, processo denominado bioacumulação (De Philippis *et al.*, 2011).

Uma diferente estratégia de resistência consiste em impedir que os metais pesados penetrem no citoplasma. Para tal, os micro-organismos podem agir de forma a precipitar os metais no exterior celular ou adsorvê-los a material biológico com grupos reativos (Gadd, 2010). Para que ocorra a precipitação, os micro-organismos podem secretar íons, tais como oxalatos, fosfatos ou sulfetos, que reagem com os metais, formando compostos insolúveis (Lloyd & Lovley, 2001). Mas talvez os processos de adsorção sejam os mais importantes na determinação da biodisponibilidade do metal no meio ambiente. Compostos orgânicos produzidos pelos micro-organismos podem ser utilizados para adsorver os metais e impedir sua penetração na célula. Essa adsorção pode ocorrer na superfície celular, onde os resíduos de amina, carboxila, hidroxila, sulfidril e fosfato são capazes de se ligar aos metais catiônicos (Lloyd, 2002). Dessa forma, tanto a biomassa viva como a morta são capazes de retirar metais de solução, processo denominado biossorção, e muitos estudos estão sendo conduzidos, sobretudo com a utilização de células de cianobactérias capazes de remover os poluentes (Rodrigues *et al.*, 2012).

Os micro-organismos também adsorvem os íons metálicos através da liberação de substâncias no meio circundante, como a glutatona, citada anteriormente pela importância no processo de detoxificação intracelular devido à sua grande afinidade por metais pesados (Bruins *et al.*, 2000). Entretanto, as principais moléculas excretadas por micro-organismos em ambientes com altas concentrações de metais pesados são as substâncias poliméricas extracelulares, que podem imobilizar os metais no exterior celular e impedir sua ação sobre as células (Naik *et al.*, 2011; Pal & Paul, 2008).

## 2.2. Substâncias poliméricas extracelulares microbianas e sua interação com metais

Substâncias poliméricas podem ser naturalmente excretadas por micro-organismos ou a partir de respostas a diferentes condições do meio ambiente (Marvasi *et al.*, 2010). Tais substâncias mediam o contato entre a superfície microbiana e seu substrato e também processos de troca entre a célula e o meio ambiente (Pal & Paul, 2008). São uma mistura complexa de macromoléculas de alto peso molecular, predominantemente constituídas por exopolissacarídeos (EPS). Os EPSs podem ser homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos, sendo, estes últimos, normalmente compostos de unidades repetidas e alinhadas de diferentes dissacarídeos até octassacarídeos, com dois a quatro tipos de monossacarídeos diferentes, geralmente glicose, manose e galactose, e com presença de grupos acetila e piruvato (Souza & Garcia-Cruz, 2004). As substâncias poliméricas extracelulares podem ainda conter quantidades consideráveis de proteínas, além de ácidos húmicos, ácido urônico e glucurônico e pequenas porções de ácidos nucleicos e lipídeos (Liu & Fang, 2002a). O material extracelular pode ainda apresentar conteúdo de lise celular e do meio circundante (Ni *et al.*, 2009).

O estudo das substâncias poliméricas extracelulares, principalmente de biofilmes e grânulos de reatores, corrobora essa maior proporção de açúcares. Jiao e colaboradores (2010), que estudaram biofilmes microbianos formados em soluções de drenagem ácida de mina, mostraram uma proporção três vezes maior de carboidratos em relação a proteínas, sobretudo galactose, glicose, heptose, ramnose e manose, e uma pequena fração de lipídeos e DNA, além da ocorrência de diversos metais. Entretanto, a composição dessas moléculas varia de acordo com a espécie e pode ser muito diferente, como ocorre com a substância polimérica extracelular produzida pela bactéria desnitrificante *Comamonas denitrificans* 110 que possui de 3 a 37% de proteínas, 9 a 50% de ácidos nucleicos e apenas 3 a 21% de carboidratos (Andersson *et al.*, 2009). Além do controle genético, condições ambientais são determinantes na estimulação de diferentes vias metabólicas da síntese de substâncias poliméricas extracelulares e, por isso, são responsáveis por parte da variabilidade estrutural das moléculas (Liu *et al.*, 2004).

Dogsa e colaboradores (2005) descreveram a substância polimérica extracelular produzida por um isolado bacteriano marinho, cuja fração polissacarídica é composta por monômeros de glicose e galactose unidos por ligações glicosídicas e até 15% de proteínas e que possuía uma estrutura tridimensional capaz de ser alterada de acordo com o pH. Já uma linhagem de *Lactobacillus rhamnosus* libera biopolímeros que consistem essencialmente de exopolissacarídeos, cujos principais monômeros são piruvato, glicose, galactose e ramnose (van

Calsteren *et al.*, 2002). *Bifidobacterium animalis lactis* IPLA-R1 foi descrita como produtora de exopolissacarídeos de alto peso molecular com resíduos de ramnopiranosil, glucopiranosil, galactopiranosil e galactofuranosil (Leivers *et al.*, 2011), enquanto *Pseudomonas mutabilis* ATCC 31014 produz apenas homopolímeros de manose com uma pequena fração residual de glicose (Kuzma *et al.*, 2012). Por outro lado, a goma xantana, muito utilizada como aditivo em fármacos e alimentos, é produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas* e possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeos. A cadeia linear é formada por duas unidades de glicose, e o trissacarídeo das ramificações, por duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico (Sharma *et al.*, 2006). Mais detalhes sobre a composição de outros exopolissacarídeos estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1: Exemplos representativos de alguns polissacarídeos microbianos (Bach & Gutnick, 2005).**

Polímero	Bactéria	Composição
Emulsan	<i>Acinetobacter venetianus</i> RAG1	D-galactosamina, L-galactosamina, ácido urônico, bacilosamina (2,4) diamino, 6-deoxi glicose
Exopolissacarídeos (EPS)	<i>Arthrobacter viscosus</i>	D-glicose, D-galactose, Ácido D-manurônico
	<i>Enterobacter</i> sp. 11870	Glicose, fucose, ácido glucurônico
	<i>Klebsiella aerogenes</i> 54 A3(sl)	Glicose, fucose, ácido glucurônico acetato
	<i>Rhizobium meliloti</i> YE-2	Glicose, galactose, acetato, piruvato, succinato
Gelana	<i>Sphingomonas elodea</i>	L-ramnose-( $\beta$ -1-3)-D-glucose-( $\beta$ -1-4)- ácido D-glucurônico-( $\beta$ -1-4)-D-glicose-( $\beta$ -1 O(2) L-gliceril / O(6) substituintes de acetilados)
$\gamma$ -Glutamil	<i>Bacillus liqueniformis</i>	ácido $\gamma$ -glutâmico

Além dessa constituição variável, as substâncias poliméricas extracelulares podem se apresentar fortemente ligadas à célula, na forma de polímeros capsulares, ou fracamente ligadas, como bainhas ou revestimentos, géis condensados ou materiais orgânicos aderidos, ou ainda podem ser solúveis, como macromoléculas solubilizadas, coloides ou limo (Sheng *et al.*,

2010). Aquelas que possuem interações mais fracas com os micro-organismos e são mais solúveis podem ser mais facilmente recuperadas dos sobrenadantes da cultura, enquanto aquelas mais intensamente ligadas usualmente se precipitam por centrifugação junto às células.

Tais biomoléculas são amplamente produzidas pelos micro-organismos com várias finalidades, principalmente em situações de estresse. As substâncias poliméricas extracelulares são importantes como reserva energética e de carbono em ambientes oligotróficos e sua produção pode ser aumentada quando há excesso de carbono e limitações de nitrogênio, potássio ou fósforo (Sutherland, 2001). Também são importantes na imobilização dos micro-organismos, sobretudo em ambientes aquáticos, por meio de ligação a superfícies ou formação de agregados. Os polímeros extracelulares também podem assumir função de proteção em ambientes desfavoráveis, prevenindo contra a dessecação, os danos causados por altas temperaturas e radiação, o estresse osmótico em ambientes hipersalinos, os efeitos dos extremos de pH, a ação de antibióticos e também de metais pesados (Xue *et al.*, 2013). A produção do exopolissacarídeo levana por espécies de *Pseudomonas* já foi relacionada à proteção em ambientes secos, contra ataques de fagos e ao equilíbrio osmótico do meio extracelular (Paton, 1960). Já Prado-Acosta e colaboradores (2005) mostraram a capacidade do exopolissacarídeo produzido por *Paenibacillus polymyxa* de sequestrar íons cobre e, aumentando a salinidade do meio, acrescentando-se NaCl, influenciaram positivamente a síntese da molécula e sua capacidade de se ligar aos cátions.

Outra variação importante na estrutura das substâncias poliméricas extracelulares ocorre nos grupos ionizáveis da molécula. A porção polissacarídica das substâncias pode variar em composição e apresentar diferentes perfis físico-químicos. Algumas moléculas não apresentam carga, mas a maioria delas é polianiônica devido, sobretudo, à presença de ácidos urônicos (Sutherland, 2001). Alguns polímeros podem ainda ser policatiônicos, como a adesina produzida por *Staphylococcus epidermidis* durante a formação de biofilmes (Mack *et al.*, 1996).

O padrão de cargas das substâncias poliméricas extracelulares é fundamental na determinação da sua afinidade por metais pesados e outros íons. Essa afinidade ocorre graças aos grupos funcionais ionizáveis presentes em sua estrutura, tais como carboxilas, grupos fosfóricos, aminas e hidroxilas, que estabelecem interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de van der Waals e pontes de hidrogênio capazes de se ligar e complexar estes íons metálicos, assim como outros minerais e nutrientes (Liu & Fang, 2002b).

Na espécie *Klebsiella aerogenes*, a presença de uma camada externa de polissacarídeos foi capaz de aumentar a sobrevivência de uma linhagem produtora em soluções de  $\text{Cd}^{2+}$ , resultando em uma concentração citoplasmática do metal  $1 \text{ nmol L}^{-1}$  menor se comparada com

a linhagem não produtora (Scott & Palmer, 1990). Semelhantemente, em *Pseudomonas putida*, a produção de substâncias poliméricas extracelulares foi capaz de sequestrar 100% dos íons  $\text{Cd}^{2+}$  adicionados ao meio na concentração de  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  (Scott et al., 1988).

Hou e colaboradores (2013) analisaram ainda o papel das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Sinorhizobium meliloti* CCNWSX0020 em sua resistência a íons  $\text{Cu}^{2+}$ . Uma diminuição na eficiência de remoção de cobre pelas substâncias produzidas por uma linhagem mutante da bactéria foi observada. A queda mais significativa foi de 11,79% para os polímeros fracamente ligados à célula, os mais importantes na adsorção do metal. Já Yadav e colaboradores (2013) descreveram uma maior sensibilidade de *Acinetobacter junii* BB1A a  $\text{Cu}^{2+}$  com a interrupção da síntese da sua substância polimérica extracelular utilizando-se um inibidor de *quorum sensing*. A concentração inibitória mínima do metal pesado foi reduzida de 1,0 para  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  com a inibição.

A presença de resíduos de ácido urônico em um exopolissacarídeo produzido por *Paenibacillus jamilae* conferiram-lhe a capacidade de sorver 303,03 mg de chumbo por grama da biomolécula, valor dez vezes maior que para os outros metais testados; o EPS demonstrou alta especificidade por cátions bivalentes (Pérez *et al.*, 2008). Baker e colaboradores (2010) demonstraram que a presença da substância polimérica extracelular na superfície de células de *Hymenobacter aerophilus* é fundamental na adsorção de cádmio, uma vez que disponibilizam mais sítios de ligação a metais, devido aos resíduos carboxila abundantes no biopolímero. Até mesmo radionuclídeos podem ser adsorvidos por polímeros extracelulares bacterianos, como relatado por Merroun e colaboradores (2003) que descreveram a adsorção a íons de urânio por EPSs produzidos por *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Foi demonstrado que uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a cobre produzia quase duas vezes mais polissacarídeos extracelulares se comparada com a linhagem sensível. Além disso, as macromoléculas produzidas possuíam composição diferente, sendo que aquela referente à linhagem resistente apresentava maior capacidade de se ligar aos íons  $\text{Cu}^{2+}$ . A presença de cobre no meio era ainda capaz de aumentar em quatro vezes a produção de EPSs pela linhagem resistente, enquanto essa resposta não foi verificada para a linhagem sensível (Kazy *et al.*, 2002). Efeitos semelhantes foram evidenciados no aumento da produção de EPSs por uma linhagem da espécie *Enterobacter cloacae* resistente a cromo com a adição do íon  $\text{Cr}^{6+}$  a seu meio de cultivo. O exopolissacarídeo foi capaz de acumular de 60 a 70% dos cátions (Iyer *et al.*, 2004).

As substâncias poliméricas extracelulares são também essenciais na formação de biofilmes, onde suas propriedades determinam a porosidade, a densidade e a estabilidade da

associação e atuam principalmente na adesão e na agregação das células às superfícies e em grânulos (Wingender *et al.*, 1999).

Marvasi e colaboradores (2010) classificam as substâncias poliméricas extracelulares formadoras de biofilmes em sete grupos. O primeiro deles corresponde aos estruturais, polímeros neutros que compõem a matriz, retêm água e protegem a célula. Os polímeros ionizáveis são denominados adsortivos e capturam os íons necessários à manutenção do biofilme, além de mediar o transporte de outras substâncias ionizáveis. Os polímeros ativos estão envolvidos na síntese extracelular de componentes do biofilme e também podem possuir atividade antimicrobiana. As substâncias poliméricas extracelulares podem ainda ser utilizadas como nutrientes ou ainda apresentarem perfil redox-ativo. Por fim, podem também ser classificadas como polímeros ativos de superfície, que possuem uma composição anfipática.

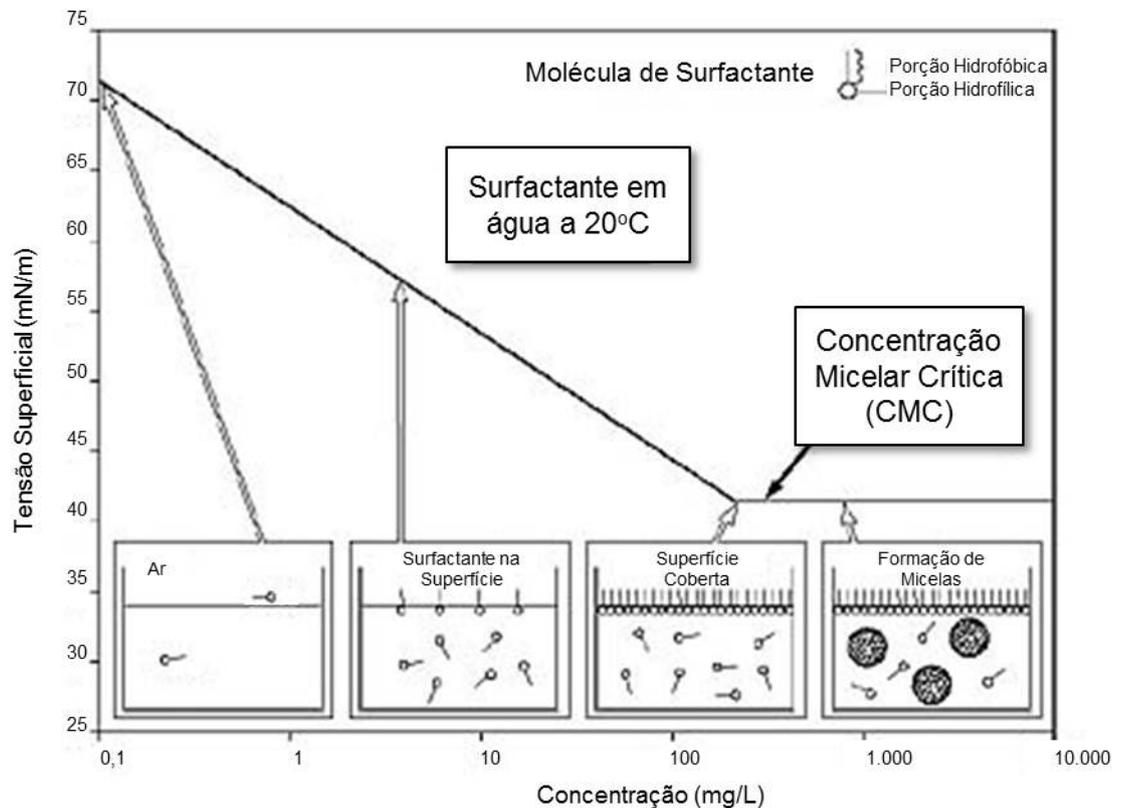
Os biofilmes podem ser formados em uma superfície sólida, em interfaces entre sólidos e líquidos ou até mesmo entre líquidos imiscíveis e entre líquidos e o ar (Wingender *et al.*, 1999). Por estarem envolvidas nessas funções, algumas biomoléculas, anfipáticas, possuem ação tensoativa, podendo agir como surfactantes ou emulsificantes (Huang *et al.*, 2012) e até mesmo solubilizar substratos hidrofóbicos a serem assimilados pelo micro-organismo (Yim *et al.*, 2005), como ocorre com os polissacarídeos produzidos pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 (Iyer *et al.*, 2006).

### **2.3. Compostos ativos de superfície microbianos**

Surfactantes são moléculas anfipáticas, ou seja, apresentam uma dupla afinidade polar-apolar, já que possuem grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos em sua estrutura. Devido a essa característica, tais compostos são moléculas tensoativas, agindo não apenas na redução da tensão superficial, mas também influenciando a superfície de contato entre dois líquidos (Cross, 1987).

Devido às suas propriedades anfipáticas, os surfactantes, quando em solução, acumulam-se formando um filme molecular entre as fases fluidas, evento responsável pela redução das tensões superficiais e interfaciais (Nitschke & Pastore, 2002). Após a formação de uma monocamada completa, a queda nas tensões para de ocorrer, pois as moléculas passam a se agregar em busca de uma conformação mais estável, formando as estruturas micelares. A concentração na qual esses arcabouços começam a ser constituídos é denominada concentração micelar crítica (CMC) e a formação dessas micelas é muito importante na determinação das características tensoativas do surfactante (Georgiou *et al.*, 1992) (Figura 1). Acima da CMC,

por exemplo, as moléculas podem apresentar atividade emulsificante sobre compostos insolúveis, em que há um aumento da área interfacial de uma das fases líquidas (Desai & Banat, 1997).



**Figura 1: Determinação da concentração micelar crítica.** Representação da ação de um surfactante sobre a tensão superficial de um líquido. Adaptado de Krüss (2011).

Devido à sua ampla utilização, a indústria de surfactantes terminou o século XX movimentando mais de nove bilhões de dólares por ano e com uma grande perspectiva de crescimento. Diante deste cenário, preocupações emergem no que concerne à sua toxicidade ao meio ambiente, já que a grande maioria destes compostos é sintetizada quimicamente a partir de derivados do petróleo. Assim sendo, não são facilmente biodegradáveis e muitos de seus subprodutos são perigosos. Com o aumento da rigidez da legislação e da preocupação com os recursos naturais, a toxicidade dos surfactantes se tornou um critério relevante na sua escolha (Makkar & Cameotra, 2002).

Diversas moléculas biológicas são anfipáticas e possuem propriedades tensoativas. Micro-organismos estão intimamente associados a superfícies e frequentemente se concentram em interfaces, por conseguinte, produzem uma significativa gama dessas substâncias, denominadas compostos ativos de superfície (Franzetti *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, os

compostos ativos de superfície microbianos emergiram como uma alternativa aos surfactantes químicos, uma vez que apresentam maior biodegradabilidade, toxicidade mais baixa, estabilidade a extremos de temperatura, pH e salinidade e possibilidade de produção a partir de substratos renováveis (Makkar & Cameotra, 2002).

As estruturas dos compostos ativos de superfície são também muito variáveis, assim como suas propriedades tensoativas, mas convencionou-se dividi-los em dois grandes grupos de características semelhantes, que foram reclassificados por Neu (1996): os biossurfactantes, de baixo peso molecular, e os bioemulsificantes, de alto peso molecular. Os biossurfactantes são geralmente representados por lipopeptídeos e glicolipídeos, dentre os quais se destacam os ramnolipídeos, os lipídeos de trealose e os soforolipídeos, mas podem também incluir ácidos graxos, fosfolipídeos e lipídeos neutros (Desai & Banat, 1997). Os compostos ativos de superfície de baixo peso molecular são mais efetivos na redução da tensão superficial (Desai & Banat, 1997). Por outro lado, bioemulsificantes são muitas vezes poliméricos e constituídos, sobretudo por polissacarídeos, e também proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou complexos destas substâncias (van Hamme *et al.*, 2006). Tal estrutura molecular confere eficiência na estabilização de emulsões e, por isso, muitas substâncias poliméricas extracelulares excretadas por micro-organismos possuem ação emulsificante.

Diversos micro-organismos são capazes de produzir compostos ativos de superfície, entretanto a maior parte dos tensoativos biológicos descritos é bacteriana e se destacam os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, e *Arthrobacter*. Dentre os bioemulsificantes, um dos mais bem caracterizados é o emulsan, um lipopolissacarídeo extracelular, produzido por *Acinetobacter venetianus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) RAG-1 e conhecido por sua capacidade de emulsificar diversos óleos em soluções aquosas a baixas concentrações (Bach *et al.*, 2003). Outras espécies do gênero *Acinetobacter* também são reconhecidas pela sua capacidade de produzir bioemulsificantes, dentre as quais *Acinetobacter radioresistens*, produtora do alasan, que é constituído por um heteropolissacarídeo contendo alanina e proteínas (Navon-Venezia *et al.*, 1995).

EPSs com propriedades emulsificantes foram também descritos para o gênero *Pseudomonas*, como o produzido pela espécie *Pseudomonas putida* ML2 e constituído, sobretudo, de ramnose, glicose e glucosamina (Bonilla *et al.*, 2005). O EPS produzido por *Enterobacter cloacae* e composto por glicose e galactose também atingiu altos índices de emulsificação (Hua *et al.*, 2010).

Substâncias poliméricas extracelulares com frações proteicas também foram descritas por sua atividade emulsificante. Kumar e colaboradores (2007) identificaram uma linhagem de

*Planococcus maitriensis* Anita I produtora de uma molécula constituída por cerca de 12% de carboidratos, 22% de proteínas, 11% de ácido urônico e 3% de sulfatos e capaz de emulsificar diversos óleos. Já Gutierrez e colaboradores (2009) identificaram um composto produzido por *Halomonas* sp. TG39 capaz de emulsificar n-hexadecano devido à sua porção proteica e aos resíduos aniônicos presentes na porção polissacarídica.

## **2.4. Aplicações biotecnológicas**

### **2.4.1. Substâncias poliméricas extracelulares na adsorção de metais**

Explorando as propriedades ligantes das substâncias extracelulares poliméricas, pode-se chegar a diversas aplicações industriais destes compostos. Dentre os possíveis empregos, está a biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados, em que os biopolímeros podem ser utilizados como adsorventes dos íons, formando um complexo estável não tóxico (Pal & Paul, 2008). Atualmente, se utilizam sobretudo precipitações químicas ou coagulações, processos muitas vezes pouco eficientes. Por outro lado, resinas de troca iônica e carvão ativado são eficazes adsorventes, mas seus altos custos limitaram sua aplicação comercial em larga escala (Park *et al.*, 2010). As vantagens das técnicas biológicas de descontaminação estão em seu baixo custo e em sua maior compatibilidade ambiental, mas dependem de fatores bióticos e abióticos, como a natureza da molécula e o pH do meio.

Apesar dos benefícios, a aplicação dos biopolímeros microbianos na remediação de resíduos contaminados com metais pesados não tem sido utilizada em larga escala e a produção das biomoléculas ainda não é suficiente para atender à demanda industrial, principalmente devido aos custos do processo. Assim, novas abordagens vêm sendo propostas, como a otimização das técnicas de produção existentes, com emprego de materiais de baixo custo como matéria-prima, visando a aumentar a viabilidade econômica dos produtos microbianos (Morillo *et al.*, 2006).

Dentre os processos de biorremediação desenvolvidos, as tecnologias baseadas no uso de biomassa aderida a material suporte na forma de biofilme podem constituir aplicações promissoras. Tecnologias de biodiscos, em que biofilmes são desenvolvidos em discos rotantes que recebem o efluente contaminado em sua superfície, foram desenvolvidas e mostraram maior resistência de *Pseudomonas aeruginosa* em associação se comparada a células planctônicas (Teitzel & Parsek, 2003), além de ser capaz de se ligar a uma maior quantidade de cátions (Langley & Beveridge, 1999). Os biofilmes são agregados de células microbianas

imobilizadas em uma matriz extracelular composta principalmente por substâncias poliméricas e devido à presença de resíduos aniônicos nesta matriz, íons metálicos podem ser aprisionados, com destaque para moléculas de ácido urônico e piruvatos que interagem com os metais pesados (van Hullebusch *et al.*, 2003). Outras abordagens consistem na utilização de biofilmes em filtros percoladores e de células ou produtos bacterianos em microesferas a serem utilizadas em reatores de leito fluidizado (Lloyd, 2002). Nessas técnicas, a biomassa adsorvente é imobilizada em matrizes poliméricas, como alginato de cálcio (da Costa & Leite, 1991) ou poliacrilamida (Wong & Kwok, 1992), ou ainda pode ser cultivada em suportes inertes para a formação de biofilmes. Os efluentes são então percolados pelas matrizes e o metal vai gradativamente sendo adsorvido e removido (Park *et al.*, 2010).

Entretanto, os processos que utilizam micro-organismos vivos possuem maior sensibilidade a algumas variações ambientais, como pH e temperatura, e aos poluentes que podem estar presentes no efluente a ser tratado. Além disso, usualmente exigem um aporte de nutrientes e sistemas de biorreatores mais complexos (Park *et al.*, 2010).

Células microbianas planctônicas, ou mesmo seus biopolímeros em solução, também são capazes de complexar e remover metais de ambientes contaminados (Pal & Paul, 2008). Um polímero extracelular produzido por *Pseudomonas putida* a uma concentração de 10,6 mg L<sup>-1</sup> foi capaz de complexar mais de 90% dos íons de cádmio presentes no meio (Chen *et al.*, 1995). Salehizadeh e Shojaosadati (2003) relataram que o polissacarídeo ácido produzido por *Bacillus firmus* apresentou uma taxa de remoção de 98,3% de íons de chumbo, 74,9% de cobre e 61,8% de zinco em soluções aquosas e na concentração de 1.000 mg L<sup>-1</sup>, sendo que a complexação foi dificultada em pH neutro e o equilíbrio foi atingido após 10 min. Espécies do gênero *Paenibacillus* também foram testadas quanto à capacidade de seus EPSs de complexarem metais pesados. O polímero de manose produzido por *Paenibacillus polymyxa* se destaca, dentre outros produzidos por membros da família Bacillaceae, por suas altas taxas de produção e sua capacidade de se ligar a Cu<sup>2+</sup> (Prado-Acosta *et al.*, 2005). Já uma linhagem de *Paenibacillus jamilae* foi capaz de produzir um polissacarídeo extracelular com propriedades de remoção semelhantes a partir de efluentes produzidos na extração de óleo de azeitonas (Morillo *et al.*, 2006).

Técnicas de lavagem de solo *in-situ* e *ex-situ* também podem se aproveitar das propriedades adsorventes das substâncias poliméricas extracelulares para retirar os íons de metais pesados adsorvidos às partículas de solo. Nesta técnica, uma solução aquosa dos exopolímeros passa pelo solo contaminado, complexando os metais e sendo posteriormente

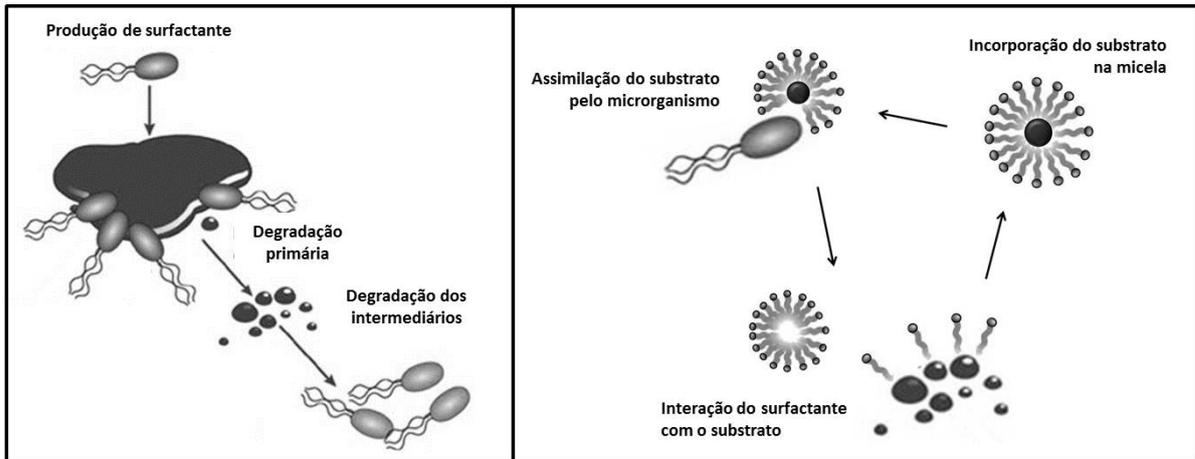
tratada para disposição final adequada (Singh & Cameotra, 2004). Tais técnicas já chegaram à eliminação de 70% de cobre, 25% de zinco e 15% de cádmio (Mulligan *et al.*, 1999).

Cianobactérias também se destacam pela produção de cápsulas polissacarídicas e, assim como outras bactérias encapsuladas, podem funcionar como biomassa capaz de complexar metais pesados (Pal & Paul, 2008). Vários sítios de ligação foram encontrados em polissacarídeos capsulares de *Calothrix marchita* capazes de se ligar a metais e adsorver até 26,85 mg de  $Pb^{2+}$  por grama de biomassa seca do procaríoto (Ruangsomboon *et al.*, 2007).

#### **2.4.2. Substâncias poliméricas extracelulares na formação de emulsões**

As substâncias poliméricas extracelulares com ação surfactante e emulsificante possuem outras aplicações importantes, até mesmo ligadas à recuperação e ao processamento do petróleo (Singh *et al.*, 2007). Podem agir como detergentes, agentes umectantes, dispersantes, emulsificantes, lubrificantes e espumantes, despertando o interesse de indústrias de produtos de higiene e limpeza, cosméticos, agroquímicos, petrolíferas, dentre outras (Brandão, 1999). Da mesma forma, algumas substâncias poliméricas extracelulares tensoativas possuem ação antimicrobiana e podem inibir a colonização de superfícies e formação de biofilmes por micro-organismos (Singh *et al.*, 2007).

A capacidade de substâncias poliméricas extracelulares com atividade surfactante e emulsificante de elevar a biodisponibilidade de substâncias hidrofóbicas é muito explorada na área de biorremediação de ambientes contaminados com materiais oleosos. Em grande parte das vezes, a recuperação da área consiste na bioaugmentação ou bioestimulação dos micro-organismos para que degradem o poluente presente. Essa degradação é dificultada pela presença de contaminantes apolares em meios aquosos, mas pode ser otimizada pela emulsificação dos óleos e sua disponibilização aos micro-organismos pelas biomoléculas anfipáticas (Ron & Rosenberg, 2002) (Figura 2).



**Figura 2: Modelo esquemático da assimilação bacteriana de poluentes oleosos por ação de um composto ativo de superfície.** As figuras representam a produção de um composto ativo de superfície por bactérias degradadoras de petróleo e a ação da biomolécula na assimilação do substrato oleoso como fonte de nutriente. Modificado de Head e colaboradores (2006).

Calvo e colaboradores (2002) descreveram a capacidade de linhagens de *Halomonas eurihalina* de produzir biopolímeros com resíduos acetil, sulfatos e ácido urônico e com capacidade de emulsificar hidrocarbonetos, sobretudo petróleo bruto. E Hua e colaboradores (2010) mostraram a importância do EPS produzido por uma linhagem de *Enterobacter cloacae* TU degradadora de hidrocarbonetos, na assimilação de hexadecano.

O exopolissacarídeo AD2 sintetizado por uma linhagem bacteriana da espécie *Ochrobactrum anthropi* foi caracterizado quanto à sua atividade emulsificante e exibiu índices de até 95,1% para óleo bruto. Sua capacidade de bioestimulação foi então avaliada em solos contaminados com petróleo e a biomolécula se mostrou eficiente em manter o crescimento microbiano por até 21 dias quando sua aplicação foi combinada a um enriquecimento nos níveis de nitrogênio, fósforo e potássio. O tratamento combinado aumentou ainda a porcentagem de hidrocarbonetos eliminados (Calvo *et al.*, 2008).

Experimentos que analisaram a influência do exopolissacarídeo emulsificante produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* CBS 962.97 em processos de biorremediação também foram conduzidos por Cappello e colaboradores (2012). A substância foi adicionada a microcosmos de água do mar contaminada com petróleo e se mostrou capaz de dispersar manchas de óleo e favorecer a seleção das bactérias degradadoras *Alcanivorax* sp. e *Marinobacter* sp., aumentando também a abundância total de bactérias e as taxas de biodegradação do óleo em até cinco vezes.

Outra capacidade das substâncias extracelulares poliméricas é a de promover a dessorção de poluentes orgânicos ou metais do solo, etapa necessária em processos de tratamentos por lavagem da matriz de terrenos contaminados, assim como ocorre para os metais pesados (Singh *et al.*, 2007).

O bioemulsificante lipopolissacarídico produzido por *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 mostrou alta atividade emulsificante para querosene, estável a mudanças de temperatura e ao aumento do pH e sua capacidade de remover íons de cobre e cromo do solo através de lavagem foi avaliada. Apesar da ineficiência em adsorver os íons cobre, foram removidos cerca de 16% do cromo a uma concentração inicial de 0,05% (Colin *et al.*, 2013). Já o tensoativo produzido por *Bacillus subtilis* A21 foi utilizado na lavagem de solos concomitantemente contaminados com hidrocarbonetos de origem do petróleo e metais pesados como chumbo, cádmio, cobre e zinco. Após 24 h de lavagem, a biomolécula removeu 63,4% dos poluentes hidrofóbicos, 42,2% do cádmio, 38,8% do chumbo, 26,2% do cobre e 32,2% do zinco numa concentração de 50 vezes a sua CMC. O estudo mostrou ainda que vegetais da espécie *Brassica juncea* foram capazes de crescer nos solos lavados com o tensoativo e não naqueles lavados apenas com água (Singh & Cameotra, 2013).

Lima e colaboradores (2011) estudaram a capacidade dos tensoativos produzidos por diferentes linhagens bacterianas de remover os poluentes de solos argilosos concomitantemente contaminados com íons  $\text{Cd}^{2+}$  ( $1,124 \text{ mg g}^{-1}$ ) e com o hidrocarboneto fenantreno ( $200 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ ). As moléculas produzidas por *Arthrobacter oxydans* LBBMA 201 e *Bacillus* sp. LBBMA111A removeram 99,2% do metal na presença do ligante iodeto e a remoção de fenantreno atingiu 87,2 e 88,2%, respectivamente.

Em aplicações diretamente *in situ* e em outros processos industriais, as biomoléculas apresentam enormes vantagens em relação aos surfactantes químicos, uma vez que são mais estáveis, seletivas, possuem uma toxicidade menor ao meio ambiente e, sobretudo, são mais facilmente biodegradáveis, característica essencial que permite que sejam utilizadas para a recuperação de sistemas abertos poluídos por compostos hidrofóbicos e/ou metais. Tais vantagens, aliadas à crescente contaminação de ecossistemas com poluentes oleosos tóxicos, especialmente ligados à imensurável exploração de produtos de origem do petróleo, promovem tais produtos microbianos a um nível preferencial de utilização nas tecnologias para biorremediação.

O sobrenadante da cultura de *Variovorax paradoxus* 7bCT5, produtora de um bioemulsificante polissacarídico, apresentou um índice de emulsificação de 68% para hexadecano que permaneceu estável por até 12 meses. A biomolécula mostrou-se estável a

variações de temperatura e não apresentou toxicidade a crustáceos, bactérias e plantas ou inibição da germinação de sementes. O polissacarídeo apresentou também alta biodegradabilidade e potencial de utilização em processos de lavagem de solos com pouca matéria orgânica em sua matriz (Franzetti *et al.*, 2012).

Zajic e colaboradores (1977) mostraram ainda que a substância polimérica extracelular produzida por *Corynebacterium hydrocarboclastus* manteve sua atividade emulsificante de querosene em até 5% de NaCl e foi facilmente biodegradada por micro-organismos isolados do solo quando utilizada como única fonte de carbono da cultura.

A glicolipoproteína produzida por *Microbacterium* sp. MC3B-10 apresentou altos índices de emulsificação para compostos como óleo de motor e girassol, atingindo 96 e 84%, respectivamente, e as emulsões se mantiveram estáveis por até 96 h. A molécula mostrou resistência à temperatura e o índice para óleo de motor se manteve em 80% após aquecimento a 100 °C por 15 min. Já a adição de NaCl a 10% diminuiu os valores para cerca de 60%, mas ainda manteve a capacidade emulsificante. As variações no pH não apresentaram alterações significativas nas emulsões. Além disso, os testes de toxicidade mostraram inocuidade da biomolécula ao crustáceo *Artemia salina* (Camacho-Chab *et al.*, 2013).

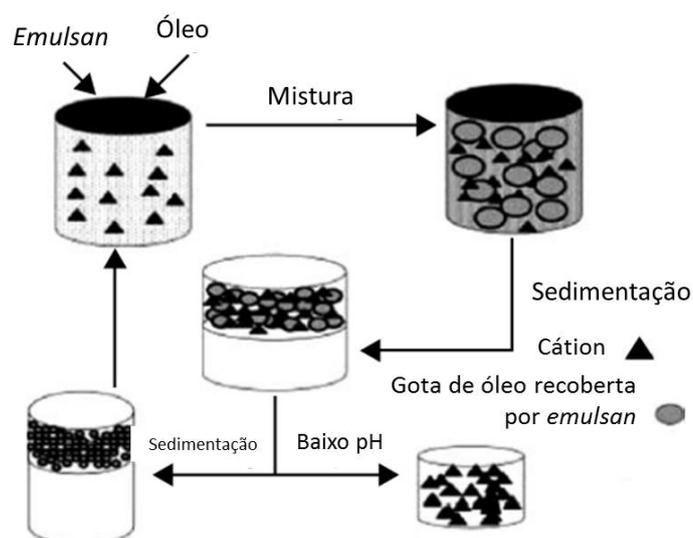
Por fim, em ambientes concomitantemente contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados, as substâncias poliméricas extracelulares surgem como um recurso eficiente, já que podem mobilizar e permitir a assimilação dos compostos hidrofóbicos e sequestrar os íons tóxicos.

Llamas e colaboradores (2010) avaliaram a atividade emulsificante de um exopolissacarídeo produzido pela bactéria halofílica *Salipiger mucosus* A3<sup>T</sup>, bem como sua capacidade de adsorver íons metálicos. Os índices de emulsificação foram maiores que 70% para óleo de girassol, óleo mineral, tetradecano, octano e querosene, superando os emulsificantes comerciais Triton X-100 e Tween 80. Além disso, os índices de adsorção atingiram até 43,5 mg de chumbo por grama da biomolécula, apresentando valores significativos também para cobre (15,7 mg g<sup>-1</sup>) e cobalto (8,7 mg g<sup>-1</sup>). Já Mata e colaboradores (2008) estudaram os exopolissacarídeos produzidos pelas linhagens *Idiomarina fontislapidosi* F23<sup>T</sup>, *Idiomarina ramblicola* R22<sup>T</sup> e *Alteromonas hispanica* F32<sup>T</sup> e obtiveram índices de emulsificação máximos de 65% para óleo de girassol, 65% para óleo de oliva e 72,5% para miristato de isopropila, respectivamente. Na adsorção de metais, o polímero produzido por *Idiomarina ramblicola* R22<sup>T</sup> se destacou, quelando 26,25 mg de cobre, 44,65 mg de chumbo e 10 mg de cobalto por grama da molécula.

Micelas formadas pela emulsificação de hexadecano por ação da substância extracelular polimérica emulsan foram capazes de se ligar e remover íons como  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{UO}_2^{2+}$  e outros estudos mostraram que os íons metálicos poderiam ser completamente recuperados da emulsão em solução aquosa através da diminuição do pH (Bach & Gutnick, 2005).

O emulsan é um agente emulsificante polianiónico com uma massa molecular de cerca de 1.000 kDa produzido por *Acinetobacter venetianus* (*Acinetobacter calcoaceticus*) RAG-1, uma bactéria degradadora de petróleo. A molécula é composta por um esqueleto carbônico polissacarídico e cadeias laterais de ácido graxo que permitem atingir índices de emulsificação de 60% utilizando-se óleo mineral como fase hidrofóbica (Su *et al.*, 2009). O emulsan é ainda capaz de acelerar a biodegradação de óleo bruto (Foght *et al.*, 1989) e também é capaz de ser biodegradado (Shoham *et al.*, 1983).

Zosim e colaboradores (1983) utilizaram a camada de hexadecano emulsificado em água através da ação do emulsan para sequestrar o urânio em soluções aquosas (Figura 3). Análises preliminares mostraram que os íons  $\text{UO}_2^{2+}$  eram capazes de ser adsorvidos em até  $0,9 \mu\text{mol g}^{-1}$  do lipopolissacarídeo. Entretanto, quando utilizadas as gotículas de hexano emulsificado em água, denominadas *emulsanosóis*, os índices de adsorção chegaram a  $3,55 \mu\text{mol}$  de urânio por grama de emulsan, quando os íons foram adicionados a uma concentração inicial de  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Uma diferença na conformação da biomolécula que constitui a micela pode explicar os maiores índices de sequestro do metal, assim como uma maior interação dos íons metálicos com a interface polar-apolar estabilizada pelo lipopolissacarídeo.



**Figura 3: Esquema para sequestro e recuperação de metais por emulsificação.** Uma emulsão é formada e suas micelas são capazes de se ligar a íons metálicos que são posteriormente recuperados pela acidificação do meio (Bach & Gutnick, 2005).

A imobilização dos metais pesados permite ainda o crescimento de bactérias degradadoras de petróleo sensíveis aos danos causados pelos íons, tornando desnecessária a utilização de quelantes químicos, mais caros e mais tóxicos ao meio ambiente (Singh & Cameotra, 2004).

Considerando as aplicações biotecnológicas das substâncias poliméricas extracelulares microbianas, surge uma demanda por novos micro-organismos produtores e diversas biomoléculas estruturalmente variadas com diferentes propriedades e especificidades. Uma abordagem de triagem dessa biodiversidade consiste em explorar ambientes sujeitos a pressões seletivas que favoreçam micro-organismos produtores destes metabólitos, como é o caso de barragens de rejeitos de mineradoras. Novas descobertas nessa área possibilitariam contornar a sistemática negligência ao potencial destes exopolímeros e dar um passo adiante na viabilização da utilização destas moléculas em larga escala.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Bioprospecção de substâncias poliméricas extracelulares produzidas por bactérias resistentes a íons metálicos e com potencial aplicação em processos de biorremediação através da emulsificação de hidrocarbonetos e da remoção de metais pesados.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Quantificar a densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes aos metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco, presentes em amostras coletadas de uma mina de exploração de cobre na região amazônica.
- Isolar bactérias resistentes aos cinco diferentes metais (chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco) através da técnica de enriquecimento e identificá-los por métodos moleculares.
- Analisar a diversidade de gêneros em cada uma das amostras.
- Selecionar as bactérias resistentes capazes de sintetizar substâncias poliméricas extracelulares através da detecção da produção de exopolissacarídeos.
- Avaliar a capacidade de produção de substâncias poliméricas extracelulares de cada um dos isolados selecionados, bem como a atividade emulsificante e surfactante do sobrenadante de sua cultura.
- Caracterizar a atividade emulsificante das substâncias poliméricas extraídas dos isolados com os melhores resultados, variando a concentração da molécula, as condições de pH, temperatura e salinidade e a fase orgânica da emulsão.
- Determinar a concentração micelar crítica (CMC) das substâncias poliméricas extracelulares dos isolados selecionados.
- Testar as substâncias poliméricas extraídas quanto à capacidade de adsorver íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  em solução pela técnica de equilíbrio por diálise, assim como a capacidade de remoção destes íons através da utilização da camada emulsificada formada entre tolueno e água.
- Realizar a caracterização bioquímica primária das moléculas analisadas por seu potencial de aplicação industrial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Área de coleta das amostras

As amostras para o isolamento dos micro-organismos foram coletadas da Mina do Sossego, uma mina de cobre de propriedade da empresa Vale S.A. localizada no município de Canaã dos Carajás, no estado do Pará (Figura 4).



**Figura 4: Mina do Sossego.** Vista da mina do Sossego de propriedade da Vale S.A. em Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (2012).

A mina se situa no bioma amazônico, que abriga a maior biodiversidade do planeta (Rodrigues *et al.*, 2013). A região apresenta clima tropical úmido de monção, com uma pequena amplitude térmica, variando entre os extremos de 19,2 a 31,8 °C e com a temperatura média variando entre 25,0 e 26,0 °C. A pluviosidade é elevada e atinge aproximadamente 1.900 mm ao ano (Chapadeiro *et al.*, 2006).

Em 2012, a Mina do Sossego produziu cerca de 110 mil toneladas de cobre em concentrado (VALE S.A., 2013). Na mina, o cobre se encontra na forma de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) e o minério bruto é britado antes de ser processado em um moinho de bolas. Após a moagem, o minério passa por flotores do tipo Rougher e Scavenger dispostos em série. Nos flotores são adicionados o propilenoglicol, um agente espumante, e o metil isobutil carbinol, responsável por associar a calcopirita às bolhas emergentes e, assim, separá-la por flotação. O material obtido passa, então, por um processo de desaguamento e atravessa espessadores e filtros que

retêm um concentrado com 30% de cobre (Figura 5). Os resíduos dos processos de flotação, desaguamento, espessamento e filtração são depositados na barragem de rejeitos. A água da barragem é reaproveitada na extremidade oposta ao lançamento, após autodepuração, para outros processos industriais da mina.

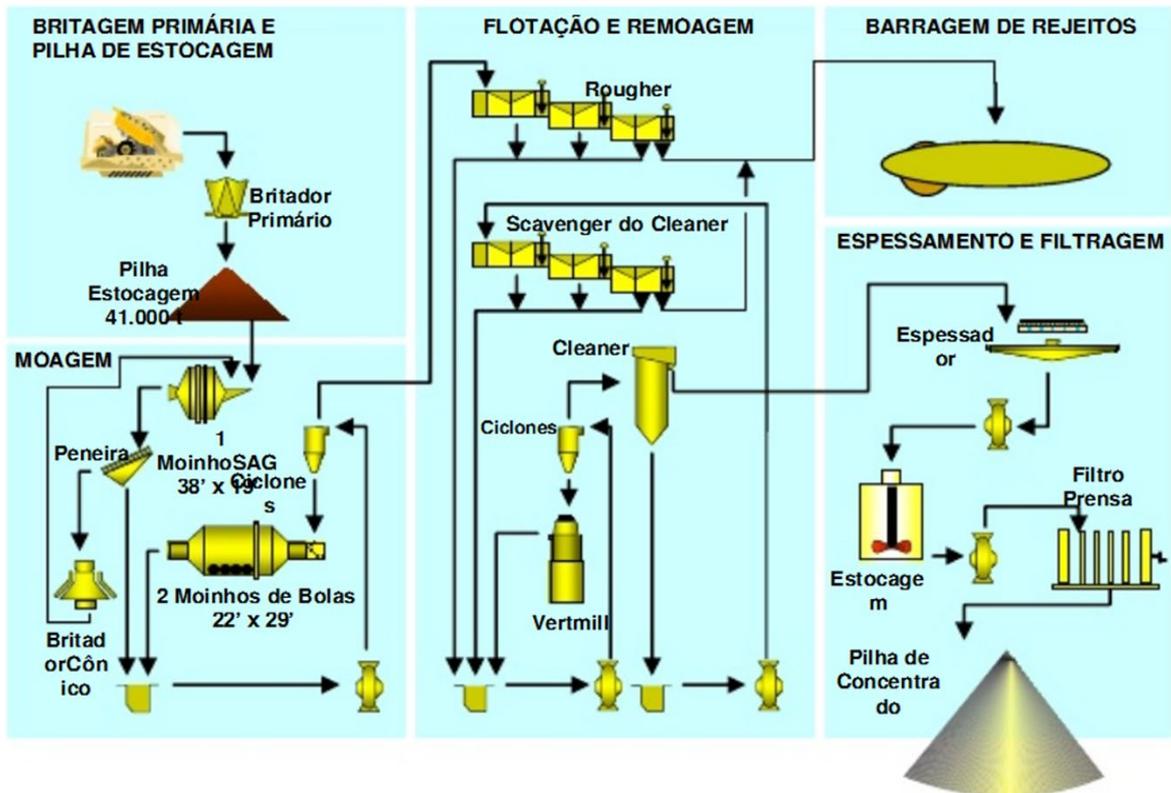


Figura 5: Fluxograma da Usina do Sossego, Carajás (Silva-Dias-Filho, 2009).

#### 4.2. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no dia 1º de junho de 2013 em cinco diferentes pontos e consistiram de três subamostras de 150 mL retiradas aleatoriamente e misturadas em garrafas plásticas, que foram imersas em gelo e acondicionadas em caixas de isopor durante 48 horas até o seu processamento em laboratório.

A primeira amostra, denominada E1, foi composta por três subamostras retiradas da subsuperfície da extremidade depurada da lagoa de rejeitos, da água da barragem de rejeitos que infiltra no solo e brota na superfície da mina e da água depurada da barragem de rejeitos que é bombeada para ser reutilizada nos processos industriais. A segunda amostra foi denominada E2 e suas subamostras foram coletadas nos flotadores iniciais de calcopirita. A terceira amostra, denominada E3, consistiu de subamostras retiradas do efluente depositado na

lagoa e da lama recém-sedimentada na barragem. A quarta amostra, E4, teve suas subamostras retiradas da lama sedimentada já estabilizada em um ponto mais distante do despejo de efluentes na barragem de rejeitos, em que a atividade de água era menor. A quinta e última amostra foi denominada E5 e foi coletada próximo à amostra anterior, mas com suas subamostras distribuídas em um ponto com maior proximidade do solo, em que havia o crescimento de alguns vegetais e a atividade de ferrobactérias era evidenciada por uma coloração de ferrugem no sedimento. Os pontos de coleta estão representados na Figura 6.

### 4.3. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas resistentes a metais na amostra

As amostras foram diluídas serialmente em uma solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e a densidade de bactérias heterotróficas de cada uma delas foi mensurada através da determinação do número mais provável (NMP mL<sup>-1</sup>) de acordo com o protocolo descrito por (Ruggeri *et al.*, 2009). Em uma placa de 96 poços, foram adicionados a 180 µL de caldo BHI, 20 µL das diluições de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-7</sup>, sendo cada uma delas inoculada em quatro poços. As placas foram incubadas por sete dias a 37 °C e a atividade respiratória das bactérias, indicativa da ocorrência de crescimento microbiano, foi determinada adicionando-se, a cada poço, 50 µL de solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a 3,0 g L<sup>-1</sup>. Após 24 horas de incubação a 37 °C, a coloração rosa nos poços, resultante da redução do reagente, foi mensurada por leitura da absorbância a 485 nm.

Posteriormente à determinação do número de poços positivos e negativos, o NMP, representado pelo valor de x, foi calculado para cada diluição através do software Microsoft Excel, seguindo a seguinte equação (Briones Jr & Reichardt, 1999):

$$a_1 \cdot p_1 / (1 - e^{-a_1 \cdot x}) + a_n \cdot p_n / (1 - e^{-a_n \cdot x}) = a_1 \cdot n_1 + a_n \cdot n_n$$

onde a é o volume inoculado no poço, p é o número de poços positivos da sequência e n é o número de poços inoculados.

Para a determinação da densidade de bactérias heterotróficas resistentes a metais pesados nas amostras coletadas, o mesmo procedimento foi simultaneamente executado, desta vez adicionando-se ao meio BHI em que as diluições foram inoculadas, os metais chumbo, arsênio e cádmio, de maior toxicidade, na concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup> e cobre e zinco, de menor

toxicidade, na concentração de  $3 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os sais solubilizados para atingir os níveis almejados de metal foram, respectivamente, acetato de chumbo, arseniato de sódio, cloreto de cádmio, sulfato de cobre e sulfato de zinco.



**Figura 6: Pontos de coleta das amostras.** (A) corresponde à extremidade depurada da lagoa de rejeitos e (B) à água da barragem de rejeitos que infiltra no solo e brota na superfície da mina; ambas são subamostras da amostra E1. (C) corresponde aos flotadores e à amostra E2. (D) corresponde ao ponto de despejo dos resíduos e à área de coleta da amostra E3. (E) equivale à área de depósito da lama coletada na amostra E4 e (F) à lama sob influência do solo coletada na amostra E5.

#### 4.4. Isolamento de bactérias resistentes a metais pesados

Para o isolamento de bactérias resistentes a metais pesados, foi utilizada a técnica de enriquecimento, em que uma alíquota de 10 mL de cada uma das cinco amostras coletadas foi inoculada em um frasco contendo 90 mL de caldo BHI acrescido isoladamente dos seguintes metais: chumbo, arsênio e cádmio na concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup> e cobre e zinco na concentração de 5 mmol L<sup>-1</sup>. Os sais utilizados para atingir as concentrações almejadas de metal foram, respectivamente, acetato de chumbo, arseniato de sódio, cloreto de cádmio, sulfato de cobre e sulfato de zinco,

Os 25 frascos foram incubados a 37 °C e, após sete dias, uma alíquota de 10 mL de cada cultura foi transferida a novos meios, desta vez com os metais chumbo, arsênio e cádmio na concentração de 2 mmol L<sup>-1</sup> e cobre e zinco na concentração de 10 mmol L<sup>-1</sup>. Novamente, os frascos foram incubados a 37 °C por dez dias, quando alíquotas de 10 mL foram transferidas para outros meios de cultura com as concentrações dos íons chumbo, arsênio e cádmio a 3 mmol L<sup>-1</sup> e cobre e zinco a 15 mmol L<sup>-1</sup>.

Após 15 dias, as culturas foram diluídas serialmente em uma solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e alíquotas de 100 µL das diluições de 10<sup>0</sup> até 10<sup>-6</sup> foram espalhadas na superfície do meio Brain Heart Infusion (BHI - Difco) acrescido de 1,75% de ágar. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C até o crescimento das colônias.

Os diferentes morfotipos obtidos foram diferenciados, enumerados para determinação da densidade em UFC mL<sup>-1</sup> e descritos quanto à coloração da colônia, o aspecto da borda, as características da superfície, do verso e do reverso, dentre outras particularidades. As contagens foram realizadas para uma das diluições que apresentou um número de colônias entre 30 e 300, entretanto diferentes morfotipos presentes em outras diluições também foram isolados e caracterizados.

Células das colônias de bactérias representantes dos diferentes morfotipos foram inoculadas em meio sólido, visando à obtenção de cultura pura e submetidos à coloração de Gram para verificação da pureza e determinação da sua morfologia e do tipo de reatividade à coloração. Para manutenção das culturas em estoque, as bactérias foram mantidas em tubos inclinados com meio BHI sólido a 4 °C e armazenadas em criotubos a -80 °C em caldo BHI acrescido de 20% de glicerol.

Os isolados foram denominados considerando a amostra coletada seguida do metal utilizado no enriquecimento de sua cultura e o número do morfotipo descrito.

## 4.5. Identificação dos isolados por sequenciamento parcial do DNAr 16S

### 4.5.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA das bactérias, utilizou-se o protocolo proposto por Pitcher e colaboradores (1989). Cada um dos isolados foi cultivado em meio BHI sólido por 24 h a 37 °C e as células da colônia foram ressuspensas em um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL contendo 300 µL de tampão TE adicionado de lisozima (Tris-HCl 10 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>, lisozima 50 mg mL<sup>-1</sup>, pH 8,0) ao qual foi acrescentada uma porção de vidro moído. Os tubos foram vortexados por 2 min e incubados em banho-maria a 37 °C por 2 h. Após o período de incubação, adicionou-se 600 µL de uma solução contendo tiocianato de guanidina (5 mol L<sup>-1</sup>), EDTA (100 mmol L<sup>-1</sup>) e sarcosil (0,5%). Os tubos foram agitados por inversão e incubados por 10 min à temperatura ambiente. 300 µL de acetato de amônio (7,5 M) foram, então, adicionados à reação e os tubos foram novamente agitados por inversão e incubados por 10 min, desta vez, imersos em gelo. Após esse período, 600 µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 24:1 (v:v) foram acrescentados e os tubos agitados por inversão e centrifugados a 12.000 g por 10 min. Transferiu-se, posteriormente, a fase aquosa para novos tubos de centrífuga nos quais era adicionado o mesmo volume de isopropanol e os quais eram incubados a -20 °C por 12 h. Na etapa seguinte, os tubos foram centrifugados a 5.000 g por 20 min para que o DNA precipitasse, o sobrenadante foi descartado e o material lavado duas vezes com etanol (70%). Após a última lavagem o etanol foi descartado e os tubos submetidos a secagem antes que o DNA fosse ressuspensado em 50 µL de água livre de nucleases. A concentração e a pureza do produto obtido foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop<sup>TM</sup> 1000 a 260 e 280 nm.

### 4.5.2. Amplificação das regiões do DNAr 16S

Para amplificar as sequências parciais de DNAr 16S, foram utilizados os iniciadores universais para bactérias 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTC AATTCCTTTRAGTTT-3') (Stackebrandt & Goodfellow, 1991). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 10 µL de tampão de Taq IVB (5x), 2,5 U de Taq DNA polimerase tamponada com KCl (Phoneutria), 200 µmol L<sup>-1</sup> de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 pmol L<sup>-1</sup> de cada iniciador, 40 a 240 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume. A

amplificação foi realizada em termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido por 21 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min nos primeiros três ciclos com queda de 1 °C a cada dois ciclos até uma temperatura de 49 °C nos dois últimos ciclos e extensão a 72 °C por 3 min, finalizando com uma extensão final a 72 °C por 10 min (Marchesi *et al.*, 1998). A concentração e a pureza do produto da amplificação foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm e a integridade do fragmento, de aproximadamente 900 pares de bases, analisada por eletroforese em gel de agarose 10 g L<sup>-1</sup>.

#### 4.5.3. Purificação dos produtos de amplificação

O produto de amplificação das sequências parciais de DNAr 16S foi purificado adicionando-se 11,25 µL de EDTA (125 mmol L<sup>-1</sup>) e 135 µL de etanol absoluto e incubando a reação por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 25 min, o sobrenadante descartado e 120 µL de etanol (70%) foram adicionados para lavagem. Mais uma vez, o material foi centrifugado a 12.000 g por 10 min e o sobrenadante, descartado. Após a evaporação do etanol residual, o produto de amplificação purificado foi ressuspendido em 10 µL de água livre de nucleases e sua concentração e pureza quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm.

#### 4.5.4. Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento da região do DNAr 16S, realizada em placas de 96 poços, foi estabelecido um volume final de 10 µL em que foram adicionados 20 ng do produto de amplificação purificado, o tampão de reação, a mistura de reação BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix e os iniciadores 8F e 907R nas concentrações de 5 µmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida seguindo uma desnaturação do material genético a 96 °C por 1 min, 35 ciclos com desnaturação a 96 °C por 15 s, anelamento a 50 °C por 15 s e extensão a 60 °C por 5 min e, por fim, um resfriamento a 4 °C.

O produto da reação de sequenciamento foi purificado adicionando-se a cada poço um volume de 1 µL de EDTA (125 mmol L<sup>-1</sup>), 1 µL de acetato de amônio (7,5 mol L<sup>-1</sup>) e 50 µL de etanol absoluto. A placa foi selada, vortexada brevemente e incubada à temperatura ambiente por 15 min. Após esse período, foi submetida à centrifugação a 2.500 g por 45 min, o

sobrenadante foi descartado e 100  $\mu\text{L}$  de etanol (70%) adicionados a cada poço. Mais uma vez, a placa foi centrifugada a 2.500 g por 15 min, o sobrenadante descartado e o produto de purificação ressuspendido em formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems) para ser analisada no sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas utilizando-se o programa Sequencher 4.1.4 e, quando possível, o produto das reações utilizando os diferentes iniciadores foram alinhados para geração da sequência consenso para então serem comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) através da ferramenta BLAST. Os isolados foram considerados da mesma espécie da sequência do banco de dados que apresentou maior identidade com a sua, quando este valor foi maior que 97%.

#### **4.5.5. Frequência dos gêneros**

Após a identificação dos isolados, as frequências absoluta e relativa de cada gênero foram obtidas para as diferentes amostras submetidas ao enriquecimento com cada um dos metais. Apenas os isolados selecionados nas diluições utilizadas para a contagem das colônias foram considerados.

A frequência absoluta é resultado do somatório da contagem de colônias em UFC  $\text{mL}^{-1}$  do mesmo gênero presente em cada amostra. Já a frequência relativa foi calculada dividindo-se a frequência absoluta de cada um dos gêneros pelo somatório de todas as outras frequências absolutas da amostra.

#### **4.6. Identificação de morfotipos produtores de exopolissacarídeos**

Todos os morfotipos isolados foram submetidos a ensaios de detecção da produção de exopolissacarídeos, um possível indicador da produção de substâncias poliméricas extracelulares. Cada um deles foi inoculado em meio Ágar Vermelho Congo sólido (meio BHI a 37 g  $\text{L}^{-1}$ , sacarose a 50 g  $\text{L}^{-1}$ , ágar a 10 g  $\text{L}^{-1}$  e corante Vermelho Congo 0,8 g  $\text{L}^{-1}$ ), onde as colônias produtoras apresentaram pigmentação negra (Schito *et al.*, 2011) e em meio BHI acrescido de 0,02 g  $\text{L}^{-1}$  de Calcoflúor Branco M2R (Sigma) que conferiu fluorescência às colônias das bactérias que sintetizam exopolissacarídeos.

#### **4.7. Caracterização da produção de substâncias poliméricas extracelulares e da atividade tensoativa do sobrenadante das culturas dos isolados produtores**

Os isolados capazes de sintetizar exopolissacarídeos foram inoculados a uma concentração inicial de 0,1 DO<sub>600 nm</sub> em 50 mL de meio mínimo mineral contendo 0,5 g L<sup>-1</sup> de ureia, 0,5 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 0,2 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 0,1 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio, 0,2 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 5 g L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio dibásico e 2 g L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico e suplementado com 25 g L<sup>-1</sup> de glicose. As culturas foram incubadas por até sete dias a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 5.000 g por 15 min e os sobrenadantes utilizados nos testes de detecção de atividade surfactante e emulsificante e para extração dos exopolissacarídeos.

Para avaliação da redução na tensão superficial do meio, os sobrenadante foram submetidos à análise em um tensiômetro modelo K100C-MK2 (Krüss). As medições foram realizadas à temperatura ambiente utilizando uma placa de platina flambada a cada troca de amostra. Os sobrenadantes foram acondicionados em placas de vidro que eram lavadas com água, acetona e submetidas à secagem em cada medição.

A quantificação da atividade emulsificante do sobrenadante foi realizada conforme descrito por Cameron e colaboradores (1988), com modificações. Em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, 1 mL do sobrenadante foi misturado a 1,5 mL de tolueno. A mistura foi submetida à agitação em agitador do tipo vórtex por 2 min e após 24 h, o índice de emulsificação (E<sub>24</sub>) foi determinado dividindo-se a altura da camada emulsionada pela altura total da mistura, sendo expresso em porcentagem.

Por fim, para a extração das substâncias poliméricas extracelulares do meio de cultura livre de células, quatro volumes de etanol P.A. resfriado a 4 °C foram adicionados aos sobrenadantes para a precipitação das biomoléculas. O precipitado formado ao fundo foi separado por centrifugação a 5.000 g por 15 minutos e, após o descarte da fase líquida, foi submetido a secagem a 37 °C por 72 h. O produto obtido foi pesado para cálculo da produção, expressa em g L<sup>-1</sup>.

#### **4.8. Potenciais aplicações biotecnológicas**

Dentre todos os isolados, os melhores foram selecionados para produção e extração de suas substâncias poliméricas extracelulares em maior escala. As biomoléculas foram analisadas

quanto a potenciais aplicações biotecnológicas na emulsificação de hidrocarbonetos e na remoção de metais pesados.

#### **4.8.1. Análise das características tensoativas**

##### **4.8.1.1. Determinação da concentração micelar crítica**

A determinação da concentração micelar crítica foi realizada diluindo-se em água ultrapura em concentrações crescentes, a substância polimérica extracelular extraída dos isolados selecionados. A tensão superficial das soluções em  $\text{mN m}^{-1}$  foi então mensurada utilizando-se um tensiômetro modelo K100C-MK2 (Krüss) até que o aumento da concentração não levasse a uma diminuição da tensão superficial.

##### **4.8.1.2. Caracterização da atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares**

###### **4.8.1.2.1. Avaliação da influência da concentração na atividade emulsificante**

A atividade emulsificante de diferentes soluções das substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos isolados selecionados foi avaliada de acordo com o teste descrito no item 4.7. Concentrações crescentes ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $4,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $15,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $17,5 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $20,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram utilizadas para a construção de uma curva relacionando-as com os respectivos índices de emulsificação.

###### **4.8.1.2.2. Avaliação da influência do pH na atividade emulsificante**

A atividade emulsificante ( $E_{24}$ ) foi determinada para a substância polimérica extracelular em uma concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  diluída em diferentes soluções tampão em função do pH desejado e utilizando-se tolueno como fase orgânica. Para se atingir os pH determinados foram utilizadas combinações de diferentes soluções de acordo com a Tabela 2.

**Tabela 2: Combinação de soluções utilizadas para obtenção de cada um dos valores de pH.**

<b>pH</b>	<b>Solução</b>
1	200 mmol L <sup>-1</sup> de cloreto de potássio / ácido clorídrico
2	
3	200 mmol L <sup>-1</sup> de acetato de sódio / ácido acético
4	
5	
6	100 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato de sódio
7	
8	
9	100 mmol L <sup>-1</sup> de glicina / hidróxido de sódio
10	
11	50 mmol L <sup>-1</sup> de fosfato de sódio dibásico / hidróxido de sódio
12	

#### **4.8.1.2.3. Avaliação da influência do aquecimento na atividade emulsificante**

A atividade emulsificante (E<sub>24</sub>) foi determinada para a substância polimérica extracelular a 10 mg mL<sup>-1</sup> após aquecimento à temperatura de 100 °C por 60 min e também autoclavagem a 120 °C por 15 min. O tolueno foi utilizado como fase orgânica.

#### **4.8.1.2.4. Avaliação da adição de eletrólitos na atividade emulsificante**

A atividade emulsificante (E<sub>24</sub>) foi determinada para a substância polimérica extracelular a 10 mg mL<sup>-1</sup> em solução de água contendo o sal cloreto de sódio em concentrações de 0, 5, 10, 15 e 30% e o tolueno foi utilizado como fração hidrofóbica. Os tubos foram submetidos a agitação por vórtice por 2 min e a atividade emulsificante (E<sub>24</sub>) foi determinada e comparada com o controle sem adição de sais.

#### **4.8.1.2.5. Avaliação da natureza da fase hidrofóbica na atividade emulsificante**

A atividade emulsificante (E<sub>24</sub>) foi determinada para a substância polimérica extracelular a 10 mg mL<sup>-1</sup>, utilizando-se diferentes fases hidrofóbicas: óleo de algodão, óleo de

girassol, óleo de soja, óleo de oliva, óleo diesel, querosene, xileno, n-heptano, isooctano, hexadecano, diclorometano, tetracloroetileno e clorofórmio.

#### **4.8.2. Ensaio de remoção de metal**

Testes iniciais foram realizados analisando a remoção de íons  $\text{Cu}^{2+}$ , a 100 ppm, e  $\text{Hg}^{2+}$ , a 0,1 ppm, através da emulsificação de soluções contendo os metais e as substâncias poliméricas extracelulares na concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  em um volume de 1,0 mL, e utilizando-se o tolueno como fração hidrofóbica em um volume de 2,0 mL. A mistura foi submetida à agitação em agitador do tipo vórtex por 2 min e após 24 h em repouso, uma alíquota da fração hidrofílica não emulsificada foi retirada para análise da concentração dos metais. A diferença entre a concentração inicial e final, expressas em  $\text{mg mL}^{-1}$ , mostra a quantidade de metal removida.

A concentração de mercúrio foi mensurada utilizando-se o equipamento Direct Mercury Analyzer DMA-80 (Milestone). Já a detecção de cobre foi realizada após uma digestão da amostra conduzida adicionando-se quatro volumes de ácido nítrico e submetendo a mistura a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 5 min em banho-maria. As concentrações foram, então, analisadas por espectrometria de absorção atômica no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para a obtenção da concentração desejada dos íons, foram solubilizados os sais sulfato cúprico ( $\text{CuSO}_4$ ) e cloreto mercúrico ( $\text{HgCl}_2$ ).

##### **4.8.2.1. Ensaio de remoção de metais utilizando a camada emulsificada**

Para determinar a capacidade das micelas formadas no processo de emulsificação de sequestrar íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), foi realizado o experimento de remoção proposto por Zosim e colaboradores (1983) utilizando-se a camada emulsificada.

No experimento, emulsões foram formadas utilizando-se tolueno como fase hidrofóbica e uma solução da substância polimérica extracelular a  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Após agitação em agitador do tipo vórtex por 2 min e posterior repouso por 24 h, uma alíquota de  $400 \text{ }\mu\text{L}$  da camada emulsificada foi retirada e inoculada em frascos contendo 2 mL de soluções de íons cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e íons mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) a 100 ppm e 0,1 ppm, respectivamente. A mistura foi submetida a agitação por 5 min e após uma hora de repouso e a separação das fases, uma alíquota da fase aquosa foi retirada para a determinação da concentração final dos metais.

A concentração de mercúrio foi mensurada utilizando-se o equipamento Direct Mercury Analyzer DMA-80 (Milestone). Já a detecção de cobre foi realizada após uma digestão da amostra conduzida adicionando-se quatro volumes de ácido nítrico e submetendo a mistura a 100 °C por 5 min em banho-maria. As concentrações foram, então, analisadas por espectrometria de absorção atômica no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### **4.8.2.2. Ensaio de bioadsorção de metais pesados às substâncias poliméricas extracelulares**

O ensaio de bioadsorção de metais pesados foi realizado pela técnica de equilíbrio por diálise, em que alíquotas de 5 mL das substâncias poliméricas extracelulares (10 mg mL<sup>-1</sup>) foram inoculadas em tubos de diálise com membranas de éster de celulose de limite de peso molecular entre 3,5 e 5 kDa (Spectra/Pro<sup>®</sup> Float-A-Lyzer<sup>®</sup> G2). Os tubos foram imersos em uma solução de 500 mL de ácido clorídrico de pH 1,0 durante 24 h para converter as substâncias em sua forma acídica e eliminar sua forma catiônica. Nesse processo, íons de outros metais que poderiam interferir nos resultados por estarem interagindo com os grupos funcionais são substituídos por H<sup>+</sup>. Logo após, o tubo de diálise foi imerso em 500 mL de água ultra-pura por outras 24 h para lavagem dos íons cloreto.

A capacidade de adsorver íons cobre (Cu<sup>2+</sup>) e íons mercúrio (Hg<sup>2+</sup>) foi determinada pelo procedimento de equilíbrio por diálise descrito por Geddie e Sutherland com modificações (1993). O tubo de diálise foi transferido para uma proveta contendo 150 mL de soluções de íons metálicos nas concentrações de 0,05 a 100 ppm, obtidas com os sais sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>) e cloreto mercúrico (HgCl<sub>2</sub>). O controle negativo consistiu de água ultra-pura sem a presença da substância. Após incubação a 25 °C por 120 min sob agitação de 360 rpm, a quantidade do metal removido a partir da solução foi calculada pela diferença na quantidade inicial de íons em solução e os remanescentes finais.

A concentração de mercúrio foi mensurada utilizando-se o equipamento Direct Mercury Analyzer DMA-80 (Milestone). Já as concentrações de cobre foram analisadas por espectrometria de absorção atômica no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### 4.9. Caracterização bioquímica

Uma análise primária dos componentes das substâncias poliméricas extracelulares selecionadas foi realizada através de testes colorimétricos e gravimétricos após uma purificação parcial por fracionamento molecular.

Primeiramente, as substâncias foram dialisadas, adicionando-se 5 mL de sua solução a 10 mg mL<sup>-1</sup> em tubos de diálise com membranas de éster de celulose de limite de peso molecular entre 3,5 e 5 kDa (Spectra/Pro<sup>®</sup> Float-A-Lyzer<sup>®</sup> G2) depositados em béqueres contendo 500 mL de água ultra-pura por 24 h a 4 °C. Após o período, a solução foi retirada dos tubos e submetida a liofilização e o precipitado obtido foi utilizado nos testes para a caracterização bioquímica da molécula.

Para análise dos carboidratos presentes, 100 µg das substâncias poliméricas extracelulares dialisadas, diluídos em 150 µL de água ultra-pura, foram hidrolisados com 750 µL de ácido sulfúrico e os subprodutos sacarídicos corados com fenol (5%). A absorbância da reação foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 485 nm e comparada com uma curva construída utilizando-se diferentes concentrações de glicose (Dubois, 1956).

Já as proteínas foram quantificadas pela técnica descrita por Bradford (1976). No ensaio, 100 µg de cada molécula dialisada, diluídos em 150 µL de água ultra-pura foram acrescidos de 1 mL do corante de Bradford, composto por Coomassie Brilliant Blue G-250 a 0,1 g L<sup>-1</sup>, etanol a 4,75% e ácido fosfórico a 8.5%. Na presença de peptídeos, a reação origina uma coloração azul que foi mensurada em espectrofotômetro a 595 nm e comparada com uma curva construída utilizando diferentes concentrações de albumina.

Por fim, os lipídeos foram quantificados gravimetricamente seguindo o protocolo descrito por Bligh & Dyer (1959) com algumas modificações. Nos ensaios, a 30 mg de cada substância polimérica extracelular foram adicionados 100 µL de clorofórmio, 200 µL de metanol e 80 µL de água ultra-pura. As misturas foram submetidas à agitação de 180 rpm por 30 min, após os quais foram adicionados outros 100 µL de clorofórmio a cada uma delas para que fossem, então, submetidas a agitação em vórtex por 2 min. As camadas foram separadas naturalmente por decantação e a camada aquosa, superior, foi retirada por pipetagem. A fase orgânica foi submetida à secagem em estufa a 80 °C até completa evaporação dos solventes e a fração residual das substâncias poliméricas extracelulares foi pesada em uma balança analítica.

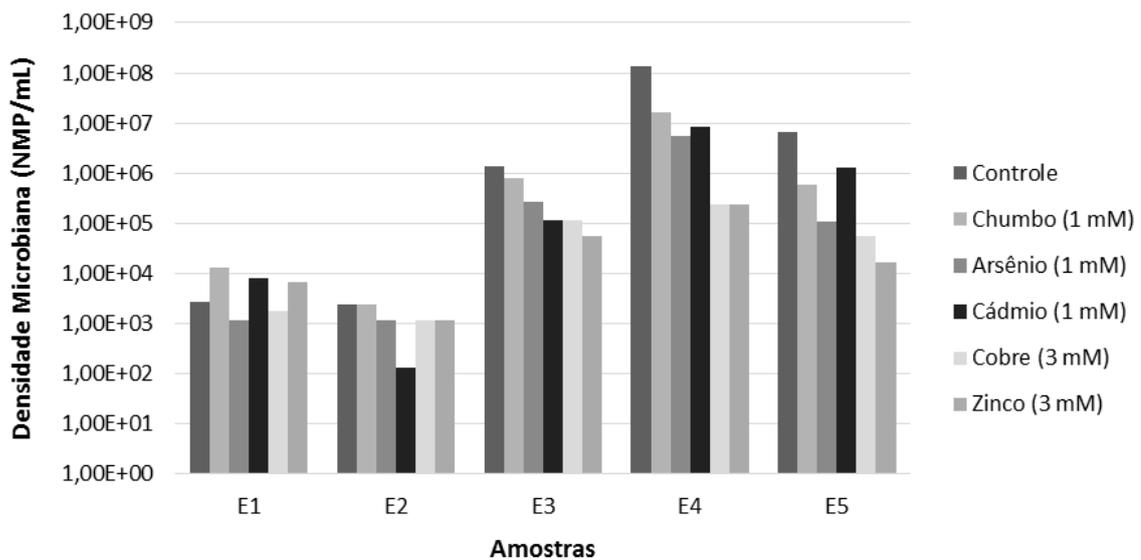
#### **4.10. Análises estatísticas**

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os valores obtidos submetidos à análise de variância (ANOVA), aplicando o teste F com um nível de significância de 5%. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao mesmo nível de 5%, utilizando *software* Action como suplemento do programa Microsoft Office Excel.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes a metais pesados nas amostras

Os ensaios de determinação do número de bactérias heterotróficas presentes nas amostras coletadas mostrou uma variação na densidade microbiana. Na água depurada usada nos processos da mina (E1) e para as amostras dos flutuadores (E2), os valores atingiram três ordens de grandeza, com  $2,69 \cdot 10^3$  e  $2,42 \cdot 10^3$  NMP mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Já as densidades das amostras coletadas na lama ultrapassaram seis ordens de grandeza, com valores de  $1,41 \cdot 10^6$  em E3 e  $6,71 \cdot 10^6$  em E5 e um máximo de  $1,34 \cdot 10^8$  NMP mL<sup>-1</sup> na lama sedimentada já estabilizada em um ponto mais distante do despejo de efluentes na barragem de rejeitos (E4) (Figura 7).



**Figura 7: Densidade de bactérias heterotróficas totais e resistentes aos diferentes metais a partir das cinco amostras coletadas obtidas através da técnica de NMP.**

O'Neill e colaboradores (2009) também analisaram a densidade bacteriana em solos amazônicos através da técnica de NMP. Os estudos mostraram uma variação semelhante, entre seis e oito ordens de grandeza nas diferentes amostras estudadas retiradas da superfície, incluindo entre elas solos secos e pobres em nutrientes.

Apesar das maiores densidades, as comunidades bacterianas de E3, E4 e E5 se mostraram mais sensíveis à presença dos metais pesados nos meios de cultura em relação ao controle. Em E3, os metais chumbo, arsênio, cádmio e cobre reduziram as densidades de  $10^6$

para  $10^5$  e o zinco reduziu esses valores para  $10^4$ . Em E4, o chumbo reduziu os valores de  $10^8$  para  $10^7$ , arsênio e cádmio para  $10^6$  e cobre e zinco reduziram as densidades microbianas para até  $10^5$ . Já em E5, a presença do cádmio não provocou alterações expressivas na densidade de  $10^6$ , mas arsênio e chumbo levaram a uma redução para  $10^5$  e cobre e zinco, para  $10^4$ . Por outro lado, nas amostras E1 e E2, apenas a presença do cádmio, em E2, levou a uma redução expressiva na densidade bacteriana, de  $10^3$  para  $10^2$  (Figura 7).

Outros estudos chegaram a resultados semelhantes sobre a resistência a metais pesados por populações bacterianas de diferentes ambientes. Matyar (2012) estudou bactérias Gram-negativas isoladas da costa oriental do Mar Mediterrâneo, ao sul da Turquia, e verificou que dos seus 255 isolados, 79,22% eram resistentes a concentrações de cádmio até  $0,89 \text{ mmol L}^{-1}$ , 69,80% eram resistentes a concentrações de cobre até  $3,15 \text{ mmol L}^{-1}$  e 62,35% eram resistentes a concentrações de chumbo até  $0,97 \text{ mmol L}^{-1}$ . Já Ansari & Malik (2010) também utilizaram a técnica de NMP para analisar a comunidade bacteriana de solos contaminados com metais pesados em um parque industrial indiano ao longo das estações do ano. As densidades, que apresentaram valores com seis ordens de grandeza, mostravam, na presença de cádmio a  $0,89 \text{ mmol L}^{-1}$ , uma redução entre 74,29 a 45,20% no período entre o inverno e o verão e no período pós-moções, caíam uma ordem de grandeza.

As densidades bacterianas mais baixas podem ser resultado de um ambiente oligotrófico presente em E1, com uma água pobre em matéria orgânica e outros nutrientes, e um meio adverso com excesso de minerais e substâncias químicas em E2, como surfactantes utilizados na recuperação de calcopirita. As condições do meio podem ter favorecido a maior resistência das populações dessas amostras aos metais pesados, pelas adaptações das bactérias às situações de estresse. Enquanto isso, em E3, E4 e E5, a proximidade com o solo e a vegetação permitem maior acesso a nutrientes, podendo justificar os valores obtidos.

Apesar da inibição observada em algumas amostras, os resultados obtidos mostraram a presença de bactérias heterotróficas resistentes às concentrações testadas de todos os metais pesados utilizados nos ensaios. Tais micro-organismos poderiam ser isolados pela técnica de enriquecimento, portanto, todas as amostras foram submetidas a crescimento em diferentes culturas contendo os cinco metais em concentrações crescentes, sendo os níveis iniciais estabelecidos em  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  para chumbo, arsênio e cádmio, e  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  para cobre e zinco.

## 5.2. Isolamento de bactérias resistentes a metais pesados pela técnica de enriquecimento e detecção dos isolados produtores de exopolissacarídeos

Do plaqueamento direto de amostras das 25 culturas de enriquecimento, foram obtidos 77 isolados morfológicamente distintos com possível resistência a metais pesados. Dentre eles, 21 isolados foram selecionados nos ensaios com chumbo, 20, nos ensaios com arsênio, 13, com cádmio, 9 com cobre e 14 com zinco. Apenas dois foram obtidos da amostra E1, 18 da amostra E2, 21, da amostra E3, 20, de E4 e 16, de E5. A descrição de cada isolado, sua reatividade à coloração de Gram e sua densidade absoluta estão presentes no Apêndice I.

Ao todo, foram *identificados* 17 gêneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Tessarococcus*, *Bhargavaeae*, *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Cellulosimicrobium*, *Georgenia*, *Dietzia*, *Acetobacter*, e *Staphylococcus* (Tabela 3).

**Tabela 3: Identificação dos isolados por meio da comparação das sequências obtidas da região 16S do DNA ribossomal com o banco de dados do GenBank.**

Isolado	Identificação	Score	Identidade (%)
E1.Pb 1	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1661	99%
E1.Zn 1	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1657	100%
E2.Pb 1	<i>Paenibacillus</i> sp.	1133	96%
E2.Pb 2	<i>Paenibacillus apiarius</i>	950	98%
E2.Pb 3	<i>Enterobacter asburiae</i>	1280	98%
E2.Pb 4	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1081	99%
E2.As 1	-	-	-
E2.As 2	<i>Dietzia cinnamea</i>	1171	99%
E2.As 3	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	953	100%
E2.As 4	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	359	99%
E2.As 5	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	686	100%
E2.As 6	<i>Lysinibacillus contaminans</i>	1086	97%
E2.Cd 1	<i>Tessarococcus profundi</i>	1094	99%
E2.Cd 2	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1236	100%
E2.Cd 3	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1358	100%
E2.Cd 4	<i>Enterococcus faecalis</i>	878	100%

<b>E2.Cu 1</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1664	99%
<b>E2.Cu 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	774	100%
<b>E2.Zn 1</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1216	100%
<b>E2.Zn 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	763	100%
<b>E3.Pb 1</b>	<i>Bhargavaea ullalensis</i>	1171	100%
<b>E3.Pb 2</b>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1005	100%
<b>E3.Pb 3</b>	<i>Lysinibacillus contaminans</i>	918	97%
<b>E3.Pb 4</b>	<i>Enterobacter</i> sp. complejo <i>Enterobacter cloacae</i>	915	99%
<b>E3.Pb 5</b>	<i>Actinomyces viscosus</i>	1218	99%
<b>E3.Pb 6</b>	<i>Actinomyces johnsonii</i>	741	100%
<b>E3.Pb 7</b>	<i>Actinomyces oris</i>	1053	99%
<b>E3.As 1</b>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1293	99%
<b>E3.As 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Subtilis	1011	99%
<b>E3.As 3</b>	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	580	99%
<b>E3.As 4</b>	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	904	98%
<b>E3.As 5</b>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	909	98%
<b>E3.As 6</b>	<i>Arthrobacter creatinolyticus</i>	627	99%
<b>E3.As 7</b>	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1253	98%
<b>E3.Cd 1</b>	<i>Enterobacter asburiae</i>	1304	99%
<b>E3.Cd 2</b>	<i>Bacillus</i> sp.	1291	100%
<b>E3.Cu 1</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1157	100%
<b>E3.Zn 1</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1280	99%
<b>E3.Zn 2</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1280	99%
<b>E3.Zn 3</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1280	99%
<b>E3.Zn 4</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1279	99%
<b>E4.Pb 1</b>	<i>Bacillus fortis</i>	719	99%
<b>E4.Pb 2</b>	<i>Bacillus fortis</i>	1242	98%
<b>E4.Pb 3</b>	<i>Bacillus fortis</i>	1389	98%
<b>E4.Pb 4</b>	<i>Bacillus fortis</i>	545	99%
<b>E4.As 1</b>	<i>Paenibacillus alvei</i>	915	96%
<b>E4.As 2</b>	<i>Bacillus shackletonii</i>	924	97%
<b>E4.As 3</b>	<i>Bacillus fortis</i>	1149	98%
<b>E4.As 4</b>	<i>Bacillus fortis</i>	464	98%

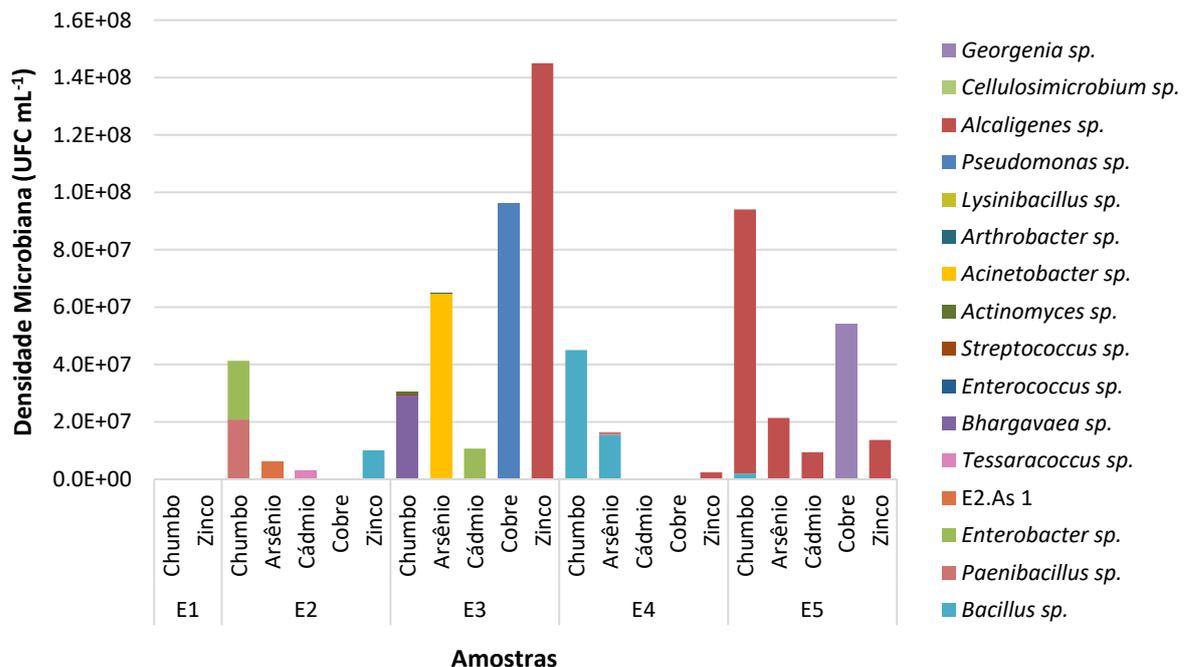
<b>E4.As 5</b>	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1251	98%
<b>E4.Cd 1</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1362	100%
<b>E4.Cd 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1236	100%
<b>E4.Cd 3</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1498	100%
<b>E4.Cd 4</b>	<i>Staphylococcus hominis</i>	1310	99%
<b>E4.Cu 1</b>	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1243	99%
<b>E4.Cu 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1153	100%
<b>E4.Cu 3</b>	<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	1352	98%
<b>E4.Cu 4</b>	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	749	99%
<b>E4.Zn 1</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1280	99%
<b>E4.Zn 2</b>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1341	98%
<b>E4.Zn 3</b>	<i>Enterobacter asburiae</i>	1284	99%
<b>E5.Pb 1</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1347	99%
<b>E5.Pb 2</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1365	99%
<b>E5.Pb 3</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1256	99%
<b>E5.Pb 4</b>	<i>Bacillus fortis</i>	1077	99%
<b>E5.Pb 5</b>	<i>Bacillus fortis</i>	1066	99%
<b>E5.As 1</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1378	99%
<b>E5.As 2</b>	<i>Staphylococcus hominis</i>	1310	99%
<b>E5.Cd 1</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1428	98%
<b>E5.Cd 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	931	100%
<b>E5.Cd 3</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1269	99%
<b>E5.Cu 1</b>	<i>Georgenia thermotolerans</i>	571	99%
<b>E5.Cu 2</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1330	99%
<b>E5.Zn 1</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1184	99%
<b>E5.Zn 2</b>	<i>Bacillus</i> sp. grupo Cereus	1552	100%
<b>E5.Zn 3</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>	1327	99%
<b>E5.Zn 4</b>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	1347	99%

\* O código dos isolados faz referência à amostra coletada, seguida do metal utilizado no enriquecimento da cultura e do número do morfotipo.

\*\* O isolado E2.As 1 não pode ser identificado por apresentar dificuldades em seu cultivo.

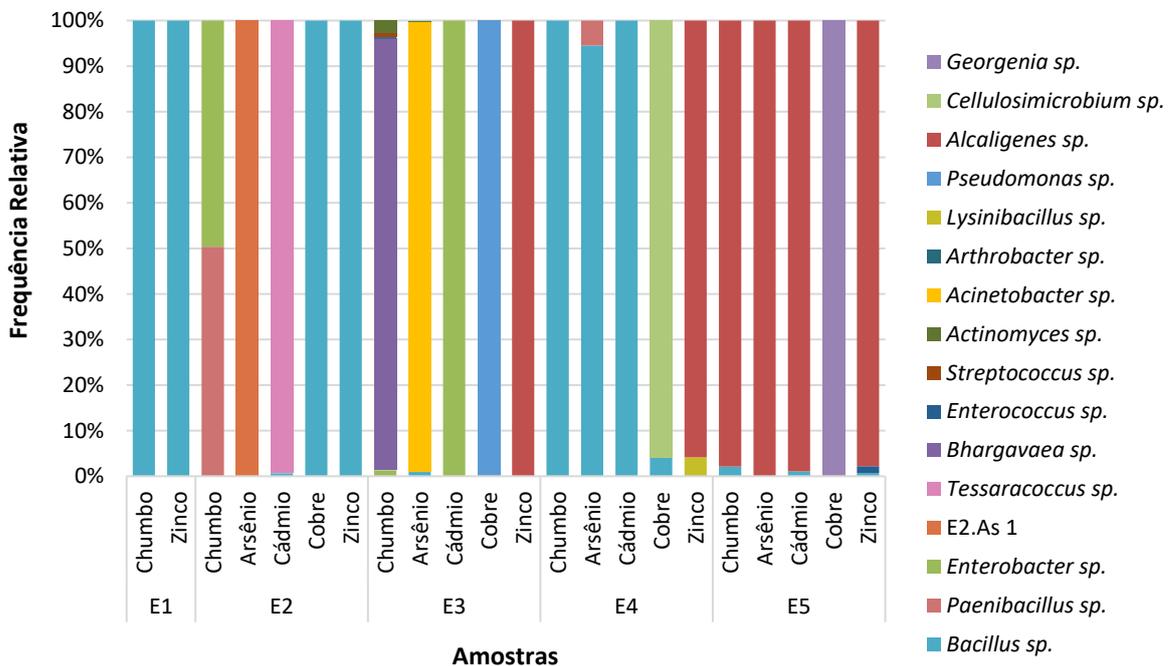
O sequenciamento do DNA ribossomal 16S poucas vezes permite a identificação das espécies de *Bacillus* devido à similaridade das sequências em grupos muito próximos filogeneticamente (Satomi *et al.*, 2006). A taxonomia dos grupos *Cereus* e *Subtilis* ainda não foi completamente elucidada, com uma estreita proximidade genética entre as espécies (Qi *et al.*, 2001). Todos os isolados do grupo *Cereus*, o isolado E3.As 2, do grupo *Subtilis* e o isolado E3.Cd 2 não puderam ser identificados a nível de espécie através dessa técnica. Assim, torna-se necessária a análise da sequência de outros genes conservados do genoma bacteriano, usualmente genes constitutivos, como o gene codificador da subunidade  $\beta$  da RNA polimerase ou da enzima DNA topoisomerase do tipo II, podendo ainda serem aplicadas técnicas como a hibridização entre moléculas de DNA ou a análise de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) (Huang, 1996; La Duc *et al.*, 2004).

Os dados de densidade bacteriana dos gêneros foram determinados em cada cultura de enriquecimento (Figura 8). Aqueles realizados com as amostras coletadas da subsuperfície da extremidade depurada da lagoa de rejeitos, da água que brota na mina e da água de processos (E1) não apresentaram crescimento quando submetidos a concentrações de 3 mmol L<sup>-1</sup> de arsênio e cádmio e a 15 mmol L<sup>-1</sup> de cobre. Todas as outras culturas apresentaram uma população bacteriana que variou de 6,1.10<sup>2</sup> UFC mL<sup>-1</sup> no enriquecimento de E2 utilizando-se 3 mmol L<sup>-1</sup> de cobre até 1,45.10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> em E3, utilizando-se 15 mmol L<sup>-1</sup> de zinco.



**Figura 8:** Densidade absoluta dos gêneros bacterianos de cada cultura de enriquecimento das cinco diferentes amostras utilizando os metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco.

Os valores de frequência relativa dos gêneros bacterianos de cada cultura de enriquecimento estão apresentados na Figura 9. Em E1, o gênero *Bacillus* é dominante em ambas as culturas com seu crescimento totalizando 100% da frequência relativa. Já em E2, duas amostras também mostraram dominância do gênero, nos enriquecimentos para cobre e zinco. Por outro lado, no enriquecimento com concentrações de até 3 mmol L<sup>-1</sup> de chumbo, observou-se um desvio na tendência de dominância de apenas um gênero, que ocorreu em todas as outras culturas onde uma densidade relativa sempre ultrapassou 94,5%. Nesse enriquecimento, houve uma codominância e o gênero *Paenibacillus* foi responsável por 50,36% da densidade microbiana, enquanto o gênero *Enterobacter* correspondeu aos 49,64% restantes. Em E3, cada uma das culturas de enriquecimento foi dominada por um gênero diferente, enquanto em E4, três delas foram dominadas pelo gênero *Bacillus*, utilizando-se arsênio, chumbo e cádmio. Por fim, E5 apresentou um padrão mais homogêneo, com quatro enriquecimentos, com os metais chumbo, arsênio, cádmio e zinco, mostrando uma dominância do gênero *Alcaligenes*, sempre maior que 97,81%.



**Figura 9:** Frequência relativa dos gêneros bacterianos de cada cultura de enriquecimento das cinco diferentes amostras utilizando os metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco.

Não houve relação entre os metais utilizados e o gênero dominante. Dentre as culturas enriquecidas com chumbo, duas foram dominadas por *Bacillus* e naquelas utilizando zinco, três foram dominadas por *Alcaligenes*. Por outro lado, os resultados sugerem que, em cada cultura,

um ou mais gêneros apresentaram maior resistência ao estresse gerado pelos metais e, assim, se sobressaíram em relação aos outros, resultando em uma maior densidade de suas células.

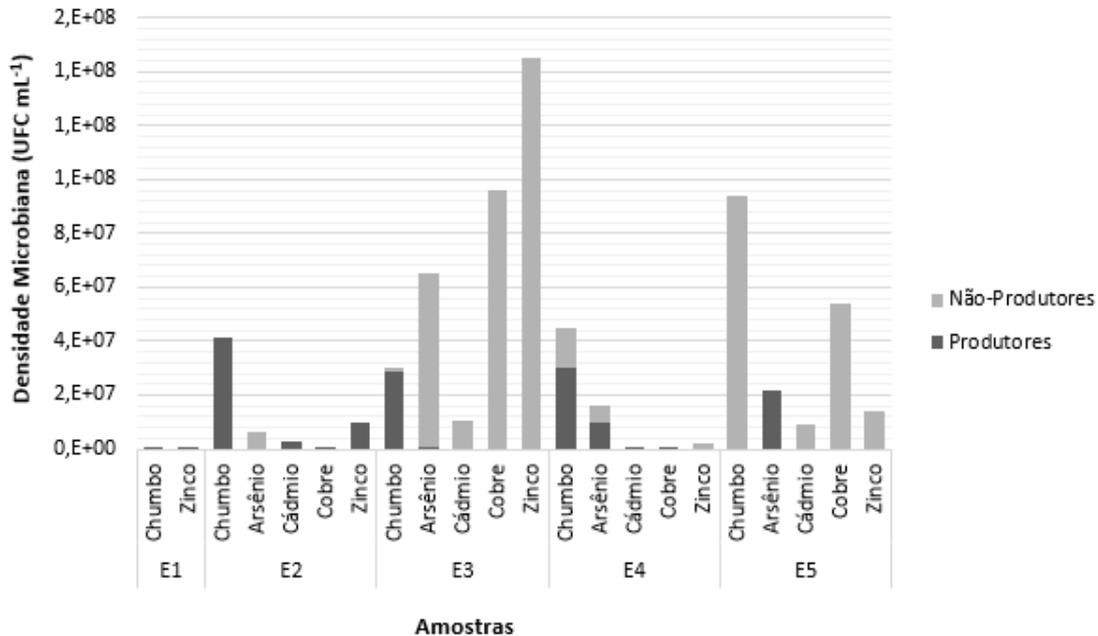
Nos ensaios de detecção da produção de exopolissacarídeos, 34 isolados apresentaram colônias enegrecidas quando crescidos em meio BHI acrescido de vermelho congo, indicando resultado positivo (Tabela 4). Para o crescimento em meio BHI acrescido de calcoflúor, 39 isolados apresentaram fluorescência em suas colônias, sugerindo também a produção das moléculas. Ambos os corantes são incorporados paralelamente à molécula de polissacarídeo durante sua síntese (Herth & Schnepf, 1980). Entretanto, nenhum dos testes é capaz de identificar todos os isolados produtores de exopolissacarídeos, havendo colônias produtoras que não apresentam as características diferenciais esperadas ou ainda aquelas que produzem polissacarídeos que se mantêm aderidos à parede bacteriana (Freeman *et al.*, 1989). Dessa forma, as bactérias que apresentaram resultado positivo em apenas um dos testes foram selecionadas para os ensaios subsequentes, o que corresponde a 45 isolados, ou seja, 58,44% do total.

**Tabela 4: Resultado dos testes de detecção da produção de exopolissacarídeos em meio acrescido dos corantes Vermelho Congo e Calcoflúor.**

Teste	Produtores	Não-Produtores
Vermelho Congo	34	43
Calcoflúor	39	38
<b>Total</b>	45	32

Um gráfico mostrando a densidade de bactérias produtoras de exopolissacarídeos em cada cultura de enriquecimento (Figura 10) mostra que em algumas delas, a maior densidade absoluta de espécies é de micro-organismos produtores, enquanto em outras, não. Correlacionando os dados com as espécies dominantes mostradas na Figura 9, observamos que em E1, E2 e E4, a maior parte das espécies dominantes é produtora de exopolissacarídeos, o que não acontece em E3 e E5.

A produção de exopolissacarídeos foi utilizada como um indicador da produção de substâncias poliméricas extracelulares. Apesar de outras macromoléculas poderem estar presentes dentre os polímeros excretados pelas bactérias, os exopolissacarídeos estão presentes na maior parte dessas substâncias e a facilidade na sua detecção permitiu uma triagem mais rápida dos isolados produtores das biomoléculas de interesse.



**Figura 10:** Densidade microbiana absoluta das bactérias produtoras de exopolissacarídeos em cada cultura de enriquecimento das cinco diferentes amostras utilizando os metais chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco.

Há uma similaridade entre os gêneros obtidos no enriquecimento com aqueles documentados na literatura em outros isolamentos de solos contaminados com metais pesados ou ainda a partir de técnicas de enriquecimento semelhantes que visavam a obter micro-organismos resistentes a metais. O mesmo acontece para grande parte dos isolados produtores de exopolissacarídeos. Além disso, há uma ampla gama de espécies que ainda são pouco conhecidas e pouco caracterizadas com escassos registros científicos.

O gênero *Bacillus* foi dominante em sete culturas de enriquecimento e é encontrado com predominância em grande parte dos isolamentos feitos em áreas contaminadas com metais pesados e também em ensaios que selecionam micro-organismos resistentes através da técnica de enriquecimento. Lenart e Wolny-Koladka (2013) isolaram micro-organismos do solo e do filoplano presente na beira de estradas. Os solos continham de 0,5 a 1,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio, 138,2 a 900,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de zinco e de 6,1 a 442,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo. Dentre as bactérias, 31,51% da população pertencia ao gênero *Bacillus*, seguido por 29,6% pertencente à espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Já dentre as linhagens selecionadas por Jing e colaboradores (2012) obtidas de um solo contaminado com metais pesados na China e submetido a um enriquecimento em meio contendo 200  $\text{mg L}^{-1}$  de chumbo, 50  $\text{mg L}^{-1}$  de cobre e 50  $\text{mg L}^{-1}$  de cádmio, três das quatro espécies identificadas pertenciam a esse gênero.

74% dos isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* obtidos no enriquecimento foram capazes de produzir exopolissacarídeos e os 24% não produtores pertenciam exclusivamente à espécie *Bacillus fortis*. Exemplares dessa espécie foram inicialmente isolados a partir de fontes de uma fazenda de gado leiteiro, mas ainda foram pouco caracterizados, com escassos registros disponíveis (Scheldeman *et al.*, 2004).

Já linhagens de *Bacillus shackletonii* foram isoladas de solos com presença de musgo em ilhas antárticas (Logan *et al.*, 2004). A espécie ainda é pouco estudada, mas alguns trabalhos já mostraram evidências de resistência a mercúrio e cádmio por espécies filogeneticamente relacionadas, como *B. oleronius* (Edward *et al.*, 2012).

Diversas outras espécies do gênero *Bacillus*, sobretudo dos grupos Cereus e Subtilis, são conhecidas por sua resistência a íons metálicos. Trabalhos já demonstraram a resistência de linhagens a arsênio, chumbo, cobre, cádmio e zinco, usualmente isoladas de áreas contaminadas sob pressão seletiva exercida pelos metais pesados presentes e com alta capacidade de adsorção desses íons (Andreazza *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Pandey *et al.*, 2013; Podlesek *et al.*, 1993). Sundar e colaboradores (2011) isolaram ainda 45 morfotipos bacterianos resistentes a cromo de uma bacia hidrográfica indiana altamente contaminada com o metal através da técnica de enriquecimento. Dentre os isolados, uma espécie de *Bacillus subtilis* se destacou pela tolerância a até 1.500 mg L<sup>-1</sup> de cromo e o isolado ainda era capaz de produzir exopolissacarídeos e essa produção foi correlacionada à concentração dos íons metálicos presentes no meio de cultivo.

Paralelamente, diversas outras substâncias poliméricas extracelulares produzidas por espécies do gênero *Bacillus* já foram descritas e bem caracterizadas, variando de 0,57 a 128 kDa, compostas por polissacarídeos neutros, polímeros com cargas, moléculas anfipáticas e proteínas, sendo inclusive relacionadas aos seus genes codificadores (Marvasi *et al.*, 2010). Além de serem importantes na resistência a metais, as moléculas podem ser fundamentais na formação de biofilmes, na adesão dos micro-organismos, na sua motilidade e também podem ter a função de agentes emulsificantes (Chowdhury, *et al.*, 2011a; Nagorska *et al.*, 2010).

*Paenibacillus* codominou apenas a cultura de E2 submetida ao enriquecimento com chumbo junto a *Enterococcus*. Cébron e colaboradores (2014) cultivaram a comunidade bacteriana presente em um solo contaminado com hidrocarbonetos e metais pesados em um meio contendo exsudado artificial de raízes e arsênio na forma de arsenito (0,66 mmol L<sup>-1</sup>) e arseniato (12,5 mmol L<sup>-1</sup>). As comunidades foram dominadas por espécies do gênero *Pseudomonas* e *Paenibacillus*, mas também foram isoladas linhagens dos gêneros *Arthrobacter* e *Enterobacter*. Houve pouca alteração nos índices de diversidade, equitabilidade e riqueza se

comparados com a comunidade cultivada sem a presença do metal pesado, indicando que os micro-organismos já estavam adaptados ao estresse gerado pelos íons tóxicos.

Diversas espécies de *Paenibacillus* são conhecidas por apresentarem resistência a metais e também por produzirem exopolissacarídeos. Linhagens resistentes já foram isoladas por Chien & Han (2009) de um rio chinês contaminado com efluentes de indústrias eletrônicas. Pepi e colaboradores (2009) isolaram de áreas contaminadas com hidrocarbonetos e metais pesados no litoral italiano, através de enriquecimento, a linhagem *Paenibacillus* sp. ORNaP1, capaz de degradar naftaleno e resistente a até 3,5 mmol L<sup>-1</sup> de As<sup>3+</sup>, 6,0 mmol L<sup>-1</sup> de As<sup>5+</sup> e 1,2 mmol L<sup>-1</sup> de Pb<sup>2+</sup>, além de suportar concentrações mais baixas de mercúrio, cádmio, cobre e zinco. Já Truyens e colaboradores (2013) mostraram que espécies de *Paenibacillus* sp. só se associavam a sementes de *Arabidopsis thaliana* quando estas eram expostas a quantidades de cádmio por gerações sucessivas.

Outras espécies de *Paenibacillus* tiveram seus exopolissacarídeos analisados quanto à adsorção de íons cádmio (Mokaddem *et al.*, 2009) e também quanto à capacidade de sequestrar íons cromo na matriz dos seus biofilmes (Khan *et al.*, 2012). Uma nova espécie descrita, *Paenibacillus jamilae*, isolada de um moinho de extração de azeite de oliva, se mostrou ótima produtora de exopolissacarídeos, que apresentaram alta capacidade de adsorver metais como cobre, zinco, cádmio e, sobretudo, íons de chumbo (Morillo *et al.*, 2006).

O gênero *Pseudomonas* foi encontrado apenas no enriquecimento de E3 utilizando cobre e dominou a cultura com uma densidade relativa de 100%. Muitas linhagens da mesma espécie são conhecidas por apresentar resistência a metais pesados, como cádmio, cobre, zinco, níquel, manganês e chumbo (Zhang *et al.*, 2012). Mas apesar de ser amplamente estudada pela produção de biomoléculas extracelulares com potencial de aplicação industrial e em processos de biorremediação, para o isolado da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, E3.Cu 1, não foi verificada a produção de exopolissacarídeos nos testes utilizando o vermelho congo e o calcoflúor. Tais resultados podem evidenciar uma característica do isolado obtido ou das moléculas por ele produzidas ou ainda ser uma consequência da variação nos fatores utilizados.

De e colaboradores (2008) analisaram bactérias isoladas da costa indiana quanto a sua resistência a metais pesados mediante cultivo em meios contendo mercúrio. Dos onze isolados obtidos, seis pertenciam à espécie *Alcaligenes faecalis*, três, à *Bacillus pumilus*, um outro pertencia à espécie *Pseudomonas aeruginosa* e um último, à *Brevibacterium iodinium*. Todos eram capazes de volatilizar o mercúrio inorgânico. Além disso, o isolado *Alcaligenes faecalis* GP06 era capaz de remover 70% do cádmio presente na cultura a uma concentração inicial de 100 ppm, enquanto *Pseudomonas aeruginosa* CH07 removeu 70% dos íons. Já nos ensaios de

remoção de chumbo, *Brevibacterium iodinium* GP13, *Bacillus pumilus* S3 e *Pseudomonas aeruginosa* CH07 removeram, respectivamente, 87, 88 e 98% da concentração inicial de 100 ppm. Nesse último experimento, foi analisada ainda a produção de substâncias poliméricas extracelulares pelos isolados e os resultados mostraram uma correlação entre o aumento da síntese dessas moléculas e a resistência a chumbo, sobretudo para *Pseudomonas aeruginosa* CH07, atribuída aos grupos funcionais aniônicos das moléculas.

O gênero *Alcaligenes* se destacou, sendo dominante em 6 culturas de enriquecimento, sobretudo para a amostra E5, mas aparecendo também nas outras amostras de lama da barragem de rejeitos. Espécies de *Alcaligenes*, sobretudo *Alcaligenes faecalis*, são usualmente analisadas por sua resistência a metais pesados. Entretanto, essa resistência geralmente está relacionada a reações de oxidação-redução seguidas de efluxo dos metais, como demonstrado no trabalho de Cavalca e colaboradores (2013), que estudaram uma linhagem capaz de reduzir o arseniato e expulsá-lo das células através de bombas de efluxo do tipo ACR3. Collard e colaboradores analisaram ainda isolados que possuíam plasmídios que conferiam resistência a cobalto, níquel, cromo, mercúrio, cobre, zinco e cádmio, mediada sobretudo pelas bombas de efluxo. Além disso, é comum a resistência conferida pela produção de sulfetos e proteínas que se ligam aos íons (McEntee *et al.*, 1986; Remacle & Vercheval, 1991).

Por outro lado, pouco se sabe da produção de substâncias poliméricas extracelulares por bactérias do gênero *Alcaligenes*, com escassos registros que notifiquem a produção de polissacarídeos extracelulares, o que justifica a obtenção de apenas um isolado produtor de exopolissacarídeos selecionado a partir do enriquecimento.

A espécie *Georgenia thermotolerans* também é muito pouco conhecida, e seus primeiros isolados foram obtidos de solos de florestas no Japão (Hamada *et al.*, 2009). Uma espécie filogeneticamente relacionada, *Georgenia soli* foi isolada do solo contaminado de uma mina de ferro na Índia, mas sua resistência a metais não foi analisada (Kämpfer *et al.*, 2010).

A espécie *Dietzia cinnamomea*, também pouco estudada, já foi isolada de um solo contaminado presente em uma reserva de Mata Atlântica no Brasil e possui alta capacidade de degradação de hidrocarbonetos (Procopio *et al.*, 2013). A produção de tensoativos pela bactéria ainda não foi estudada, mas foi levantada pelos autores e pode estar relacionada com sua capacidade de produzir exopolissacarídeos. Outro isolado do gênero *Dietzia* já foi obtido a partir de resíduos de usinas siderúrgicas contendo cromo no estado de Minas Gerais. A bactéria apresentou níveis de resistência a até 2 mmol L<sup>-1</sup> de cobre e chumbo (Freitas *et al.*, 2008)

Isolados do gênero *Cellulosimicrobium* também já foram obtidos de solos contaminados com cromo ou de efluentes de curtumes, que contêm altas concentrações do metal. As bactérias

se destacaram por sua capacidade de reduzir os íons (Camargo *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2009; Naeem *et al.*, 2013).

Espécies do gênero *Enterobacter*, sobretudo do complexo *Enterobacter cloacae*, que inclui a espécie *Enterobacter asburiae*, são comumente estudadas por sua capacidade de serem utilizadas em processos de biorremediação. Chien e colaboradores (2013) comprovaram a importância de um gene codificador de bombas de efluxo na detoxificação de zinco e cádmio em um isolado do gênero. Alguns autores isolaram também linhagens de *Enterobacter* sp. multirresistentes a diferentes metais pesados, como cádmio, chumbo, zinco, cobre e mercúrio (Holmes *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013). E a capacidade de bioacumulação de mercúrio em células bacterianas do gênero já foi utilizada em testes de descontaminação de efluentes contaminados com o metal (Sinha & Khare, 2012).

Além de produzirem alguns biosurfactantes, espécies de *Enterobacter* sp. também produzem substâncias poliméricas extracelulares com ação tensoativa ou importância na formação de biofilmes (Skillman *et al.*, 1998). Entretanto, a produção de muitas de suas biomoléculas também apresentou relação com a contaminação por metais pesados. Harish e colaboradores (2012) isolaram a bactéria *Enterobacter cloacae* SUKCr1D de uma mina de cromo na Índia, resistente ao metal e capaz de sintetizar um exopolissacarídeo. A molécula era capaz de retirar o cromo de solução, chegando a remover 31,7% da sua concentração inicial de 10 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, sua produção era aumentada com a elevação da concentração do metal no meio de cultura. Já Naik e colaboradores (2012) analisaram o exopolissacarídeo produzido por *Enterobacter cloacae* P2B, uma bactéria resistente a chumbo isolada de um efluente com altas concentrações do metal. Além de adsorver íons Pb<sup>2+</sup>, a produção do biopolímero aumentou de 28 para 108 mg L<sup>-1</sup> quando o micro-organismo foi exposto a concentrações de 1,6 mmol L<sup>-1</sup> de chumbo em seu meio de cultura.

Bactérias do gênero *Lysinibacillus* foram poucas vezes associadas à produção de substâncias poliméricas extracelulares. Apesar da natureza Gram positiva, apresentam alta variabilidade na coloração final e muitas vezes são visualizadas com esporos terminais circulares, uma característica do grupo. Por outro lado, diversas espécies já foram caracterizadas quanto à sua resistência a metais pesados. Isolados de *Lysinibacillus sphaericus*, obtidos de áreas contaminadas com metais pesados e também de solo de florestas tropicais, se mostraram resistentes a diversos metais pesados. As linhagens ATCC 14577, OT4b.26, OT4b.49, III(3)7 e IV(4)10 suportaram concentrações de 7.492 a 11.238 ppm de arsênio, 500 a 750 ppm de chumbo e 104 a 156 ppm de cromo (Lozano & Dussan, 2013). Já a linhagem multirresistente *Lysinibacillus sphaericus* G1 foi capaz de acumular cádmio, cobalto e zinco e

de reduzir cromo e mercúrio (Bafana *et al.*, 2013). As espécies *Lysinibacillus contaminans* e *Lysinibacillus boronitolerans* ainda são pouco estudadas, mas recentemente, uma espécie nova filogeneticamente relacionada foi isolada de uma mina de manganês chinesa em solos contaminados com o metal (Liu *et al.*, 2013a).

Poucos registros caracterizaram espécies do gênero *Tessaracoccus*, sobretudo *Tessaracoccus profundi*. Entretanto, uma nova espécie desse gênero foi isolada de efluentes de indústrias de processamento e produção de metais (Kämpfer *et al.*, 2009).

A resistência de bactérias do gênero *Acetobacter* a metais pesados também é pouco estudada. Entretanto, alguns trabalhos demonstraram a produção de exopolissacarídeos por algumas linhagens (Couso *et al.*, 1982; Jansson *et al.*, 1993) e a carboximetilcelulose produzida por *Acetobacter xylinum* já foi utilizada na remoção de cobre e chumbo de soluções (Chen *et al.*, 2009).

A presença da espécie *Enterococcus faecalis* pode indicar contaminação por dejetos humanos ou até mesmo por fezes de outros mamíferos (Farnleitner *et al.*, 2010). Estudos relatam que essas espécies podem, ainda, permanecer por muito tempo no ambiente sob condições de estresse, além de apresentarem resistência a metais pesados. Mondragón e colaboradores (2011) isolaram espécies de *Enterococcus faecalis* em um lago mexicano contaminado com esgoto e rejeitos industriais e isolaram linhagens resistentes a cromo, mercúrio e cádmio, sendo que em um dos pontos de amostragem, 63,2% das bactérias eram resistentes a cádmio. Genes de resistência a este metal já foram identificados e caracterizados em outros isolados da espécie (Laplace *et al.*, 2000). A produção de substâncias poliméricas extracelulares por *Enterococcus faecalis* já foi caracterizada, sobretudo, durante a formação de biofilmes por essas bactérias (Santos *et al.*, 2008).

*Bhargavaea ullalensis* é uma bactéria pertencente a um gênero ainda pouco caracterizado, recentemente descrito e sem indicações de resistência a metais ou produção de substância polimérica extracelular (Glaeser *et al.*, 2013).

Algumas espécies do gênero *Actinomyces*, sobretudo *Actinomyces viscosus*, são formadoras de biofilmes e a produção de substâncias poliméricas extracelulares usualmente está condicionada à constituição dessas estruturas (Hu *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2013). Já a resistência a metais pesados possui poucos registros, mas Oyetibo e colaboradores (2010) isolaram uma linhagem de *Actinomyces turicensis* de áreas contaminadas da Nigéria que era resistente a até 10 mmol L<sup>-1</sup> de Cd<sup>2+</sup>, 6 mmol L<sup>-1</sup> de Co<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup> e 7 mmol L<sup>-1</sup> de Cr<sup>6+</sup>, além de apresentar resistência a 18 antibióticos.

*Acinetobacter radioresistens* foi primeiramente isolada de solos e algodoeiros e é conhecida por sua resistência a radiação e também pela produção do bioemulsificante alasan (Navon-Venezia *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1988). A resistência de bactérias do gênero *Acinetobacter* a metais pesados também já foi bem documentada, sobretudo para linhagens redutoras de cromo hexavalente (Bhattacharya & Gupta, 2013). Uma linhagem de *Acinetobacter junni* contendo genes de oxidação do arsênio também foi isolada de uma mina abandonada contaminada com o metaloide (Chang *et al.*, 2011).

A resistência a metais pesados também já foi observada em espécies do gênero *Arthrobacter*. A linhagem *Arthrobacter ramosus* G2, isolada de áreas contaminadas com mercúrio na Índia, foi capaz de crescer em meios contendo cádmio (37  $\mu\text{M}$ ), cobalto (525  $\mu\text{M}$ ), zinco (348  $\mu\text{M}$ ), cromo (1.530  $\mu\text{M}$ ) e mercúrio (369  $\mu\text{M}$ ) (Bafana *et al.*, 2010). Já a linhagem *Arthrobacter* sp. As 9, isolada de solos, apresentou resistência a até 1 g L<sup>-1</sup> de íons As<sup>5+</sup>. A produção de exopolissacarídeos também já foi observada em diversos isolados (Senchenkova *et al.*, 1995) e algumas moléculas já foram inclusive utilizadas na adsorção de cromo, chumbo e cobre (Quintelas *et al.*, 2011; Shuhong *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Staphylococcus* isoladas possuem relação com os humanos, colonizando pele e mucosas, mas já foram diversas vezes isoladas de solos, destacando-se aqueles contaminados com hidrocarbonetos (Huang *et al.*, 2011; Mariano *et al.*, 2008; Sánchez-Peinado *et al.*, 2008; Standing *et al.*, 2013; Tow & Cowan, 2005). A resistência a metais já foi verificada em diversos isolados, sobretudo a cromo e chumbo, mas também a outros íons, como mercúrio e cobre (Ug & Ceylan, 2003). Já foram também detectados plasmídeos que conferem resistência a cádmio (Gill *et al.*, 2005) e também a mercúrio, zinco e arsênio (Baldwin *et al.*, 1969). Ambas as espécies produzem substâncias poliméricas extracelulares que estão principalmente associadas à formação de biofilmes (Campoccia *et al.*, 2011; Ganesan *et al.*, 2013).

Ali e colaboradores (2012) utilizaram amostras de solo desértico do Kuwait contaminado com materiais oleosos e metais pesados em um enriquecimento com concentrações de até 300 mmol L<sup>-1</sup> de arseniato, 20 mmol L<sup>-1</sup> de arsenito e 1 mmol L<sup>-1</sup> de cádmio. Na cultura de enriquecimento com o arseniato, a frequência relativa dentre as bactérias do gênero *Bacillus* equivalia a 32%, do gênero *Corynebacterium*, 24%, do gênero *Alcaligenes*, 15% e do gênero *Enterobacter*, 6%. As espécies isoladas foram as mesmas nos três enriquecimentos, mas sua frequência relativa teve uma pequena variação. No enriquecimento com o arsenito, *Bacillus* equivalia a 30%, *Corynebacterium*, a 26%, *Alcaligenes*, a 16% e *Enterobacter*, a 7%. Por fim, no enriquecimento com cádmio, o gênero *Bacillus* alcançou uma

frequência de 32%, enquanto *Corynebacterium* chegou a 24%, *Alcaligenes*, a 12% e *Enterobacter*, a 8%.

### 5.3. Caracterização da atividade tensoativa do sobrenadante das culturas produtoras de exopolissacarídeos

Todos os isolados que apresentaram resultado positivo nos testes de produção de exopolissacarídeos foram crescidos em meio mínimo mineral suplementado com glicose. O sobrenadante de cada cultura foi submetido aos testes de atividade emulsificante (E<sub>24</sub>) utilizando o tolueno como fase hidrofóbica, de medição de tensão superficial ( $\text{mN m}^{-1}$ ) e de precipitação do exopolissacarídeo, utilizando-se quatro volumes de etanol para determinação da taxa de produção ( $\text{g L}^{-1}$ ).

Apesar das taxas de produção com valores chegando a  $6,6 \text{ g L}^{-1}$ , quando os ensaios foram realizados em maior volume, houve um decréscimo significativo na produtividade das biomoléculas. O efeito verificado pode ser decorrência de uma menor aeração das culturas, uma vez que esse parâmetro já se mostrou determinante nos índices de produção de exopolissacarídeos por outras bactérias (Serrato *et al.*, 2006).

Nos ensaios de atividade emulsificante, dos 45 isolados selecionados, 15 apresentaram índices superiores a 50%, constituindo 33,3% do total, sendo eles *Paenibacillus apiarius* E2.Pb 2, *Acetobacter pasteurianus* E2.As 4, *Enterococcus casseliflavus* E2.Cd 3, *Bacillus* sp. E2.Cu 1, *Bacillus* sp. E2.Zn 1, *Enterococcus casseliflavus* E3.Pb 2, *Bacillus* sp. E3.As 2, *Bacillus* sp. E3.Cd 2, *Bacillus* sp. E4.Cd 2, *Staphylococcus epidermidis* E4.Cd 3, *Staphylococcus hominis* E4.Cd 4, *Bacillus* sp. E4.Cu 2, *Cellulosimicrobium funkei* E4.Cu 4, *Staphylococcus hominis* E5.As 2 e *Bacillus* sp. E5.Zn 2. Em seguida, 7 deles apresentaram atividade entre 30 e 50%. Já os 23 restantes apresentaram valores inferiores a 30%, sendo que 13, ou 28,9% do total, não apresentaram nenhuma atividade emulsificante (Tabela 5).

Já nas medições de tensão superficial, apenas dois foram capazes de reduzir os valores do meio para abaixo de  $35 \text{ mN m}^{-1}$ , *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e *Bacillus* sp. E3.As 2 (Tabela 5). Segundo Desai & Banat (1997), micro-organismos com boa produção de surfactantes reduzem a tensão superficial do meio para valores próximos a  $35 \text{ mN m}^{-1}$ . Já Cooper (1986) estabelece um limite de  $40 \text{ mN m}^{-1}$  para que sejam considerados promissores quanto à produção dos tensoativos. Nenhum outro isolado atingiu valores abaixo de  $40 \text{ mN m}^{-1}$  (Tabela 5).

**Tabela 5: Resultado dos ensaios de atividade emulsificante ( $E_{24}$ ), redução da tensão superficial e de produção de substâncias poliméricas extracelulares do sobrenadante da cultura dos isolados que obtiveram resultado positivo nos testes de Vermelho Congo e Calcoflúor.**

<b>Isolado</b>	<b><math>E_{24}</math> (%)</b>	<b>Tensão Superficial (<math>\text{mN m}^{-1}</math>)</b>	<b>Produção (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>
<b>E1.Pb 1</b>	42,73 $\pm$ 3,9	63,35	4,0
<b>E1.Zn 1</b>	49,28 $\pm$ 1,3	58,58	4,0
<b>E2.Pb 1</b>	8,33 $\pm$ 2,9	39,67	3,2
<b>E2.Pb 2</b>	59,01 $\pm$ 6,4	40,58	6,8
<b>E2.Pb 3</b>	26,68 $\pm$ 0,8	59,25	3,2
<b>E2.Pb 4</b>	41,97 $\pm$ 7,6	45,86	3,5
<b>E2.As 2</b>	0,00 $\pm$ 0,0	61,46	3,9
<b>E2.As 3</b>	30,77 $\pm$ 1,9	52,04	1,4
<b>E2.As 4</b>	51,77 $\pm$ 0,9	58,77	2,4
<b>E2.As 5</b>	11,35 $\pm$ 3,2	57,57	6,6
<b>E2.Cd 1</b>	18,83 $\pm$ 8,4	47,08	5,2
<b>E2.Cd 2</b>	0,00 $\pm$ 0,0	60,78	3,9
<b>E2.Cd 3</b>	62,95 $\pm$ 4,9	42,13	3,7
<b>E2.Cd 4</b>	0,00 $\pm$ 0,0	59,42	3,6
<b>E2.Cu 1</b>	51,94 $\pm$ 9,7	59,96	3,5
<b>E2.Cu 2</b>	13,17 $\pm$ 7,4	50,38	4,0
<b>E2.Zn 1</b>	67,21 $\pm$ 1,6	53,32	4,1
<b>E2.Zn 2</b>	0,00 $\pm$ 0,0	55,01	4,3
<b>E3.Pb 2</b>	57,05 $\pm$ 2,1	48,20	6,0
<b>E3.Pb 3</b>	0,00 $\pm$ 0,0	55,61	0,0
<b>E3.Pb 4</b>	16,43 $\pm$ 3,1	49,87	2,7
<b>E3.Pb 5</b>	25,00 $\pm$ 0,0	33,52	3,0
<b>E3.Pb 6</b>	21,50 $\pm$ 2,1	59,07	4,4
<b>E3.Pb 7</b>	0,00 $\pm$ 0,0	53,33	0,0
<b>E3.As 2</b>	51,52 $\pm$ 3,5	32,75	2,7
<b>E3.As 6</b>	0,00 $\pm$ 0,0	56,86	4,1
<b>E3.Cd 2</b>	53,60 $\pm$ 5,9	54,94	6,4
<b>E4.Pb 2</b>	22,53 $\pm$ 10,9	56,09	5,7
<b>E4.Pb 3</b>	0,00 $\pm$ 0,0	56,80	4,6

<b>E4.As 1</b>	0,00 ± 0,0	64,15	5,0
<b>E4.As 2</b>	30,95 ± 12,4	59,10	6,1
<b>E4.Cd 1</b>	44,44 ± 1,39	56,06	5,3
<b>E4.Cd 2</b>	63,10 ± 8,4	58,01	6,3
<b>E4.Cd 3</b>	54,55 ± 4,6	46,94	4,2
<b>E4.Cd 4</b>	61,00 ± 2,0	53,63	5,3
<b>E4.Cu 1</b>	0,00 ± 0,0	67,98	2,4
<b>E4.Cu 2</b>	58,00 ± 1,0	58,02	3,2
<b>E4.Cu 4</b>	57,00 ± 4,2	56,44	4,1
<b>E4.Zn 3</b>	0,00 ± 0,0	61,07	1,5
<b>E5.As 1</b>	0,00 ± 0,0	69,40	0,0
<b>E5.As 2</b>	53,42 ± 1,9	51,05	2,7
<b>E5.Cd 2</b>	9,76 ± 0,3	61,99	3,4
<b>E5.Cu 2</b>	0,00 ± 0,0	43,20	1,1
<b>E5.Zn 2</b>	58,32 ± 5,3	51,70	4,1
<b>E5.Zn 3</b>	42,86 ± 8,2	45,64	4,0

Curiosamente, alguns isolados apresentaram uma tensão superficial de seu sobrenadante maior que a do meio de cultura estéril, que foi de 58,11 mN m<sup>-1</sup>. Alguns substratos complexos no meio de cultura, como o extrato de levedura, podem conter substâncias que geram uma queda na tensão superficial e, ao longo do tempo de cultivo, os micro-organismos podem degradar esses compostos e, dessa forma, os valores de tensão se aproximam dos índices da água destilada, que é de 72,8 mN m<sup>-1</sup>.

O método de triagem utilizado visou à detecção da produção de exopolissacarídeos, que são substâncias poliméricas. Dessa forma, era esperada uma maior atividade emulsificante do sobrenadante das culturas se comparada à redução da tensão superficial do meio, uma vez que os bioemulsificantes são, na maioria das vezes, moléculas de maior massa molecular (Neu, 1996).

Outros trabalhos verificaram a produção de moléculas com atividade tensoativa por bactérias resistentes a metais pesados. Colin e colaboradores (2013) isolaram a linhagem *Streptomyces* sp. MC1 de cana-de-açúcar e observaram que a bactéria apresentava resistência a cromo e a capacidade de reduzir cromo hexavalente a espécies menos tóxicas. Ensaio de atividade emulsificante foram realizados com o sobrenadante da cultura do isolado e atingiram

índices de até 70%. Mesmo com a adição de até 10 mg L<sup>-1</sup> do metal ao meio de cultura, a atividade foi mantida, ainda que com valores menores. A biomolécula responsável pela atividade foi extraída e sua caracterização mostrou frações proteicas e sacarídicas.

Outros micro-organismos isolados de solo também apresentaram resistência a metais pesados e capacidade de produzir compostos tensoativos, como a linhagem *Bacillus cereus* NK1, capaz de crescer na presença de íons tóxicos, sobretudo chumbo e zinco. A bactéria também produz um lipopeptídeo extraído do meio de cultura que foi capaz de emulsificar óleo de motor em índices de 80% e óleo bruto, em 70%. A biomolécula foi capaz de reduzir a tensão superficial da água a 36 mN m<sup>-1</sup> a uma concentração de 45 mg L<sup>-1</sup> (Sriram *et al.*, 2011).

Das 15 espécies com melhor atividade emulsificante, sete pertenciam ao gênero *Bacillus* assim como uma das que apresentou alta atividade surfactante. Os índices chegaram a 67,21% para *Bacillus* sp. E2.Zn 1 e uma redução da tensão superficial para 32,75 mN m<sup>-1</sup> por *Bacillus* sp. E3.As 2. Toledo e colaboradores (2008) isolaram a linhagem *Bacillus subtilis* 28 de um tanque de armazenagem de óleo. O isolado foi capaz de produzir polímeros extracelulares a uma taxa de 0,43 g L<sup>-1</sup> e as biomoléculas extraídas, compostas por carboidratos e proteínas, apresentaram uma atividade emulsificante de até 70% para o tolueno e 88% para o petróleo bruto, reduzindo também a tensão superficial da água a até 50 mN m<sup>-1</sup>. Já Viramontes-Ramos e colaboradores (2010) isolaram a linhagem *Bacillus* sp. R1M5 de solos contaminados com óleo combustível e obtiveram índices de emulsificação do meio de cultura livre de células de 78% com querosene e 80% com óleo de motor, além de verificarem uma tensão superficial de 33,3 mN m<sup>-1</sup>.

Poucos registros da produção de tensoativos por espécies do gênero *Paenibacillus* aparecem na literatura, sobretudo bioemulsificantes. Amirabadi e colaboradores (2013) descreveram a produção de um de-emulsificante por *Paenibacillus alvei* ARN63 que era capaz de quebrar emulsões de óleo bruto em água e também reduzia a tensão superficial de seu meio de cultura para 24,7 mN m<sup>-1</sup>. *Paenibacillus apiarius* E2.Pb 2 atingiu um índice de emulsificação de 59,01%, apesar de não provocar uma redução expressiva na tensão superficial.

Já para o gênero *Enterococcus*, o principal registro encontrado descreve a atividade emulsificante do exopolissacarídeo produzido pela linhagem *Enterococcus faecium* MC13, isolada como um probiótico (Kanmani *et al.*, 2013). A otimização da produção da biomolécula permitiu a obtenção de uma taxa de 11,91 g L<sup>-1</sup> quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono e o índice de emulsificação atingiu 89,5% na concentração de 0,9 mg mL<sup>-1</sup> utilizando-

se hexadecano como fase aquosa. O sobrenadante da cultura de *Enterococcus casseliflavus* E3.Pb 2 atingiu uma atividade emulsificante de 57,05% com tolueno.

Para o gênero *Actinomyces*, apenas a linhagem *Actinomyces* L2, isolada através de uma técnica de enriquecimento utilizando-se apenas óleo diesel como fonte de carbono, foi avaliada quanto à sua atividade tensoativa. O sobrenadante da cultura apresentou tensão superficial de  $48,6 \text{ mN m}^{-1}$ , enquanto a atividade emulsificante atingiu 12%, menor que aquela alcançada pelo meio com as células, de 68% (Bento *et al.*, 2005). A tensão superficial do meio de cultura de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 foi reduzida a  $33,52 \text{ mN m}^{-1}$ , indicando a produção de uma molécula surfactante.

Não há registros de produção de substâncias tensoativas pelos gêneros *Cellulosimicrobium* e *Acetobacter*. O sobrenadante de *Cellulosimicrobium funkei* E4.Cu 4 foi capaz de emulsificar tolueno a índices de 54%, enquanto o de *Acetobacter pasteurianus* E2.As 4 chegou a 52%.

Todas as três linhagens do gênero *Staphylococcus* produziram exopolissacarídeos. Além disso, *Staphylococcus epidermidis* E4.Cd 3, *Staphylococcus hominis* E4.Cd 4 e *Staphylococcus hominis* E5.As 2 mostraram atividades emulsificantes expressivas de 54,55, 61,00 e 53,42%, respectivamente. Eddouaouda e colaboradores (2012) isolaram a linhagem *Staphylococcus* sp. 1E em um enriquecimento que utilizava óleo bruto como única fonte de carbono. A bactéria foi, então, crescida utilizando outros substratos e seu sobrenadante foi avaliado quanto à atividade emulsificante, que atingiu 98,9% para óleo bruto e 78,57% para óleo de motor. A CMC da biomolécula foi determinada em  $750 \text{ mg L}^{-1}$ , em que a tensão superficial foi reduzida a  $26 \text{ mN m}^{-1}$ . Algumas moléculas surfactantes foram descritas para *Staphylococcus epidermidis*, mas sua caracterização é frequentemente relacionada à estruturação dos biofilmes formados por bactérias dessa espécie (Wang *et al.*, 2011).

#### 5.4. Aplicações biotecnológicas

Considerando os valores obtidos nos ensaios de caracterização da atividade tensoativa do sobrenadante, foram escolhidos três isolados para uma análise das potenciais aplicações biotecnológicas de suas substâncias poliméricas extracelulares, que compreendem a emulsificação de hidrocarbonetos e outras análises das características tensoativas das moléculas e sua capacidade de remoção de metais pesados. Além dos valores de atividade emulsificante, tensão superficial e produção, foram observados critérios como consistência da emulsão e

reprodutibilidade dos resultados e tentou-se selecionar isolados obtidos em culturas de enriquecimento utilizando diferentes metais.

Dessa forma, foram escolhidas as linhagens *Actinomyces viscosus* E3.Pb5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2. Os isolados foram crescidos em 600 mL de meio mínimo mineral suplementado com glicose a 37 °C e sob agitação de 180 rpm e a substância polimérica extracelular foi extraída através de precipitação com etanol para ser utilizada nos ensaios subsequentes.

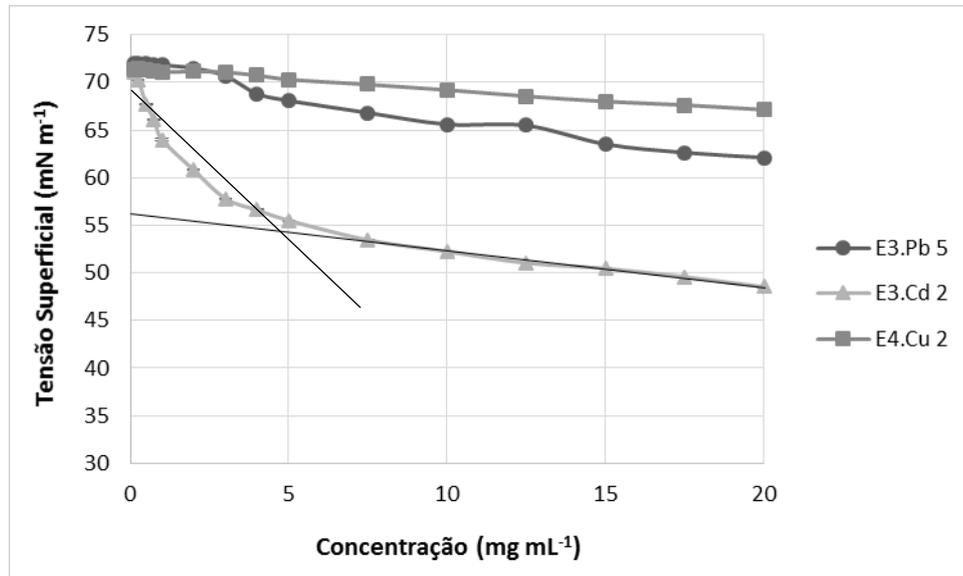
#### 5.4.1. Análise das características tensoativas

##### 5.4.1.1. Determinação da concentração micelar crítica (CMC)

As substâncias poliméricas extracelulares de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 foram dissolvidas em água em concentrações crescentes de 0 a 20 mg mL<sup>-1</sup> e a tensão superficial da solução foi medida em tensiômetro. Dessa forma, os valores foram comparados com a tensão superficial da água e a CMC foi definida como a concentração em que a tensão para de decrescer mesmo com o aumento da quantidade da biomolécula dissolvida.

O único isolado cujo biopolímero mostrou uma redução expressiva da tensão superficial foi *Bacillus* sp. E3.Cd 2, apesar de ter apresentado um valor, no sobrenadante de sua cultura, de 54,94 mN m<sup>-1</sup>. Com o aumento da concentração da substância polimérica extracelular, a tensão superficial chegou a 48,54 mN m<sup>-1</sup> e a CMC da molécula foi determinada em 4,69 mg mL<sup>-1</sup> (Figura 11). Os valores mínimos de tensão obtidos para as biomoléculas produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 foram 62,12 e 67,15 mN m<sup>-1</sup>, respectivamente.

Apesar de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 reduzir a tensão superficial do meio de cultura para 33,52 mN m<sup>-1</sup>, nos ensaios de CMC da molécula precipitada do seu sobrenadante, a tensão superficial da solução permaneceu em 62,12 mN m<sup>-1</sup>. Uma redução maior na concentração provavelmente não ocorreu porque o método de precipitação com etanol favorece a obtenção de moléculas poliméricas, por isso, provavelmente o isolado produz durante o seu crescimento exopolímeros de alta atividade emulsificante e também outras moléculas de menor peso molecular, com ação surfactante e que não foram precipitadas pela técnica.



**Figura 11:** Redução da tensão superficial em função da concentração, na solução, das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2. O ponto de intercessão entre as barras indicam a concentração a partir da qual não há diminuição significativa na tensão superficial.

Cooper & Goldenberg (1987) também identificaram uma linhagem de *Bacillus cereus* IAF 346 capaz de diminuir a tensão superficial do meio para  $28 \text{ mN m}^{-1}$  após o cultivo e o sobrenadante atingia níveis de emulsificação de aproximadamente 70%. Entretanto, após a extração com clorofórmio, a atividade emulsificante era mantida, mas a tensão superficial do meio aumentava para  $40 \text{ mN m}^{-1}$ , indicando a presença de uma molécula com atividade surfactante e, outra, polimérica, emulsificante. A outra molécula emulsificante extraída, produzida pela linhagem *Bacillus* sp. IAF 343, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água a até  $53 \text{ mN m}^{-1}$ . Várias espécies de *Bacillus* produzem biosurfactantes, muitas vezes lipopeptídeos, dentre os quais se destaca a surfactina, e que são extraídos preferencialmente por precipitação ácida devido ao seu menor peso molecular (Al-Wahaibi *et al.*, 2014; Haddad *et al.*, 2008).

Diferentes substâncias de ação tensoativa produzidas por bactérias filogeneticamente relacionadas já foram descritas, como o ramnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* FIN2 que diminui a tensão superficial para  $28,6 \text{ mN m}^{-1}$  e possui uma CMC de  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  (Liu *et al.*, 2013b). Já o bioemulsificante lipopeptídico produzido por *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 não apresentou qualquer redução na tensão superficial da solução, indicando uma ausência de atividade surfactante, apesar dos seus elevados índices de emulsificação (de Sousa & Bhosle, 2012).

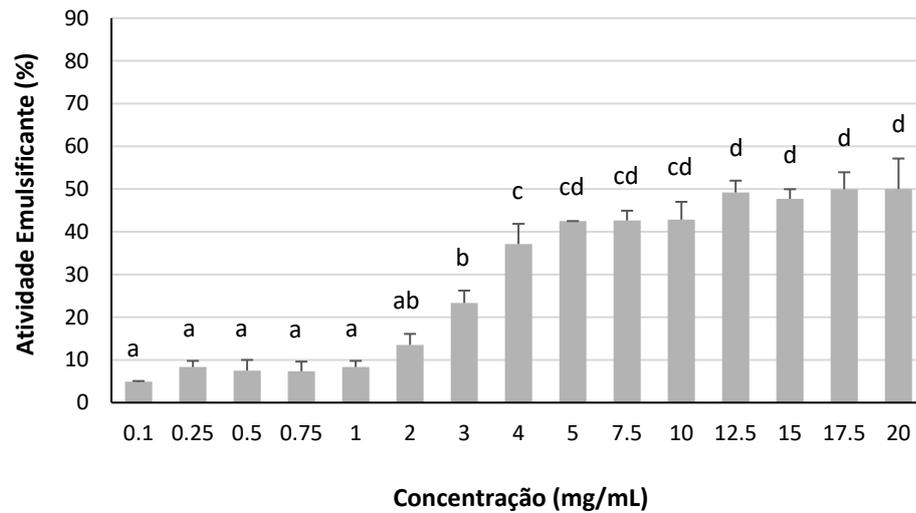
Alasan, o bioemulsificante polimérico produzido por *Acinetobacter radioresistens* KA53 e composto por carboidratos aniônicos e proteínas, foi capaz de reduzir a tensão superficial da água para  $42 \text{ mN m}^{-1}$  a uma concentração de  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  (Barkay *et al.*, 1999). Já o lipopolissacarídeo emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1, possui uma CMC de cerca de  $0,025 \text{ mg mL}^{-1}$  em que a tensão superficial da solução é reduzida para  $46,4 \text{ mN m}^{-1}$ . Zhang e colaboradores (1999) estudaram diversos análogos de emulsan, produzidos pelo mesmo isolado, mas utilizando fontes alternativas de carbono e os valores variaram de  $0,025$  a  $0,058 \text{ mg mL}^{-1}$ , mas não houve alteração significativa na menor tensão superficial obtida.

As substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Enterobacter* sp. 214, *Bacillus subtilis* 28 e *Alcaligenes faecalis* 212 levaram a uma redução da tensão superficial da água, quando em solução, para valores mínimos de  $50 \text{ mN m}^{-1}$ . As moléculas apresentaram CMC próxima a  $1$ ,  $2$  e  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente (Toledo *et al.*, 2008). O bioemulsificante produzido por *Streptomyces* sp. S22 consiste em uma molécula composta por lipídeos, carboidratos e proteínas e apresenta uma CMC de  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  em que a tensão superficial foi reduzida para  $23,09 \text{ mN m}^{-1}$  (Maniyar *et al.*, 2011).

#### 5.4.1.2. Caracterização da atividade emulsificante

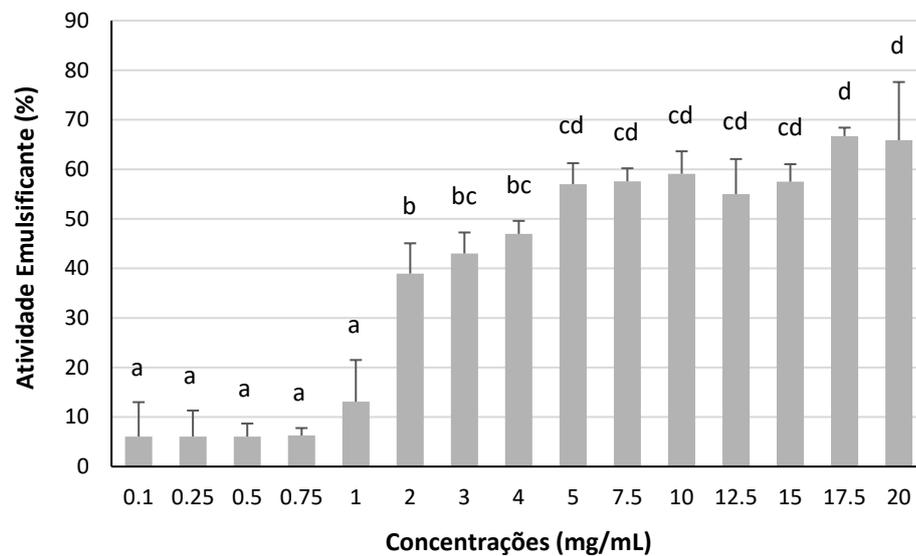
Para as substâncias poliméricas extracelulares estudadas, foi observado um aumento da atividade emulsificante ( $E_{24}$ ) em resposta ao aumento da concentração da biomolécula na fase aquosa utilizada na preparação da emulsão (Figuras 12 a 14). No entanto, os índices máximos de  $E_{24}$  e as concentrações limites, a partir das quais não foram observados acréscimos significativos na atividade variaram com o isolado em estudo.

O isolado *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 foi aquele que apresentou os índices mais baixos de emulsificação, atingindo um máximo de  $50,00\%$  na concentração de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ . Apesar disso, após uma concentração de  $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , em que a atividade emulsificante foi de  $42,50\%$ , não houve uma alteração significativa em seus valores, mostrando que concentrações mais baixas da molécula eram capazes de atingir seus índices máximos de atividade (Figura 12).



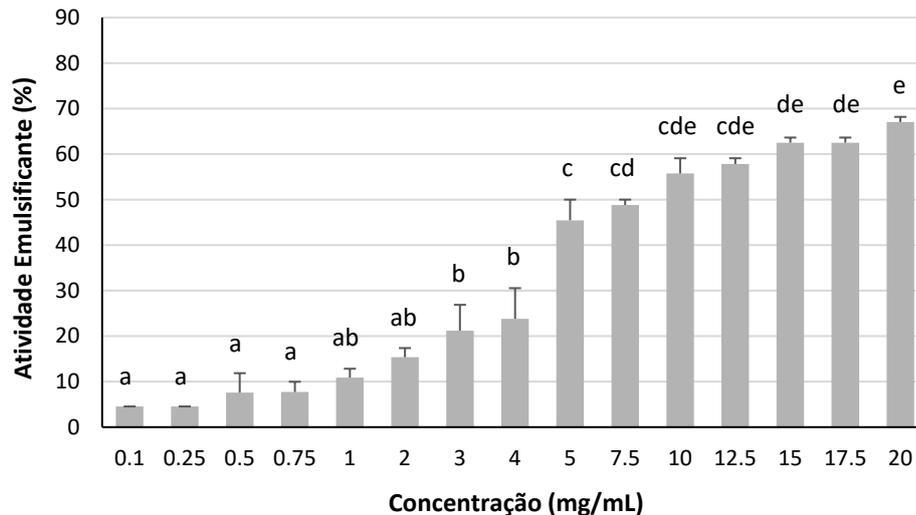
**Figura 12:** Influência da concentração da substância polimérica extracelular produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 no índice de emulsificação do tolueno. Diferentes letras mostram diferenças significativas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Já o isolado *Bacillus sp.* E3.Cd 2 apresentou índices de emulsificação mais altos, atingindo um máximo de 66,70% na concentração de 17,5 mg mL<sup>-1</sup> (Figura 13). A partir da concentração de 5,0 mg mL<sup>-1</sup> também não houve alterações significativas na atividade emulsificante.



**Figura 13:** Influência da concentração da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus sp.* E3.Cd 2 no índice de emulsificação do tolueno. Diferentes letras mostram diferenças significativas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Dentre as três moléculas testadas, o maior índice de emulsificação foi obtido do isolado *Bacillus* sp. E4.Cu 2, com um valor de 67,05% na concentração de 20 mg mL<sup>-1</sup>. A partir de 5 mg mL<sup>-1</sup> a atividade emulsificante se torna considerável, evidenciando valores expressivos mesmo em concentrações mais baixas, e atinge sua estabilidade a partir de 10 mg mL<sup>-1</sup>, em que não há alterações significativas em seus valores (Figura 14).



**Figura 14:** Influência da concentração da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 no índice de emulsificação do tolueno. Diferentes letras mostram diferenças significativas pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

Padrões de atividade emulsificantes semelhantes aos dos isolados do presente estudo foram descritos para uma substância polimérica extracelular produzida por *Acinetobacter junii* BB1A, uma bactéria isolada de um rio na Índia. O índice de emulsificação do tolueno, de 66,6%, foi obtido na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup> (Yadav *et al.*, 2012).

Viñarta e colaboradores (2007) determinaram a concentração ótima em que os exopolissacarídeos produzidos por *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 atingiam a atividade emulsificante máxima para três substratos hidrofóbicos. Utilizando-se hexadecano, o EPS I atingia 29,5% a uma concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto o EPS II atingia 30,8% na mesma concentração. Para o querosene, os valores máximos foram 56,1 e 60,1% para o EPS I e o EPS II, respectivamente, na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>. O EPS I não foi capaz de emulsificar azeite de oliva, enquanto o EPS II atingiu a atividade emulsificante de 6,3% na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup>.

Hua e colaboradores (2010) avaliaram um exopolissacarídeo produzido por *Enterobacter cloacae* TU que atingia índices de emulsificação de 75% e atingiu o máximo de

solubilização do hexadecano a uma concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , com valores de  $64,2 \text{ mg L}^{-1}$ . Já o exopolissacarídeo produzido pela cianobactéria *Nostoc flagelliforme* apresentou um padrão em que a atividade emulsificante atingia seu máximo (27,5%) na concentração de  $3 \text{ mg mL}^{-1}$  e passava a decrescer com o seu aumento, chegando a 24,3% na concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  (Han *et al.*, 2013).

O polissacarídeo extracelular produzido por *Enterococcus faecium* MC13 também foi avaliado quanto à sua capacidade de emulsificar hexadecano através da técnica de medição de absorção da emulsão e os resultados indicaram um aumento crescente da atividade emulsificante até atingir o seu valor máximo, 84,5%, à concentração de  $1,8 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Chowdhury e colaboradores (2011a) analisaram a atividade emulsificante do exopolissacarídeo produzido por *Bacillus megaterium* RB-05, isolado do sedimento de um corpo d'água, com diferentes substratos hidrofóbicos e em diferentes pH. Dentre todas as concentrações avaliadas, os índices de emulsificação foram maiores na maior delas,  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , em que chegou a atingir 90% no ensaio com óleo de coco em pH 8,0. Chowdhury e colaboradores (2011b) também realizaram os mesmos ensaios com o carboidrato polimérico produzido por *Bacillus pumilus* UW-02, uma bactéria isolada de uma área de agricultura irrigada com efluentes industriais. Os resultados foram muito semelhantes e o maior índice de emulsificação foi de 92% para óleo de coco em pH 8,0.

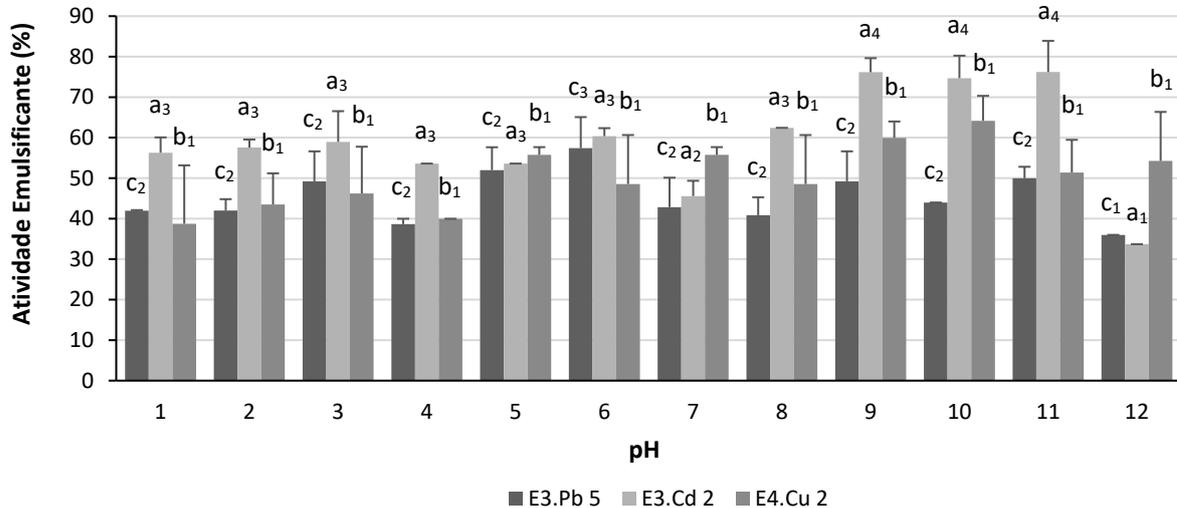
#### 5.4.1.3. Avaliação da influência do pH na atividade emulsificante

A substância polimérica extracelular produzida pelo isolado *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 mostrou maior atividade emulsificante em pH levemente ácidos na concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , com valores de 51,98 e 57,41% em pH 5,0 e 6,0, respectivamente. Em pH muito ácidos ou básicos, o índice de emulsificação oscilou e atingiu seu mínimo, 35,99%, em pH 12,0 (Figura 15).

O proteoglicano produzido por *Acinetobacter junii* SC14 demonstrou um resultado semelhante de seu padrão de atividade emulsificante, que foi medida por absorvância da emulsão. Os melhores resultados variaram entre 6,0 e 8,0, com queda nos pH 5,0 e 9,0 (Patil & Chopade, 2001).

Já a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2 apresentou um índice de emulsificação mais baixo em pH neutro, com um valor de 45,56%. Em pH ácidos, houve um leve aumento da atividade emulsificante, enquanto na faixa de pH básicos de 8,0 a 11,0, esse

aumento foi bastante significativo, atingindo um pico de 76,20% em pH 11,0 e decrescendo apenas em pH 12,0, em que o índice atingiu seu valor mais baixo, de 33,69% (Figura 15).



**Figura 15: Influência do pH na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.** Diferentes letras comparam isolados bacterianos e diferentes números mostram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Por fim, o biopolímero sintetizado por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 mostrou uma leve tendência de aumento de sua atividade emulsificante de acordo com o aumento do pH. Seus menores índices foram obtidos nos pH ácidos 1,0 e 4,0, com valores de 38,74 e 39,97%, respectivamente, enquanto os maiores valores, 59,95 e 64,17%, foram observados em pH 9,0 e 10,0 (Figura 15).

A maioria dos trabalhos sugere um aumento da atividade emulsificante em pH básicos. Os bioemulsificantes produzidos pelas linhagens de *Geobacillus pallidus* XS2 e XS3, isoladas de uma área contaminada com petróleo, apresentaram um padrão semelhante de variação da atividade emulsificante de acordo com pH, exibindo os índices mais altos, em torno de 60%, na faixa de pH entre 8,0 e 12,0. Entretanto, a queda na atividade emulsificante foi mais significativa em pH ácidos, caindo para cerca de 25% para *Geobacillus pallidus* XS2 e 35% para *Geobacillus pallidus* XS3, o que corresponde a uma redução de cerca de 58,33 e 30%, respectivamente (Zheng *et al.*, 2011).

A biomolécula composta por polissacarídeos, proteínas e lipídeos produzida por *Bacillus licheniformis* K125 também mostrou uma queda acentuada da atividade emulsificante em pH 3,0 de cerca de 77,27%. Os índices se mantiveram estáveis na faixa de 5,0 a 11,0 (Suthar *et al.*, 2008).

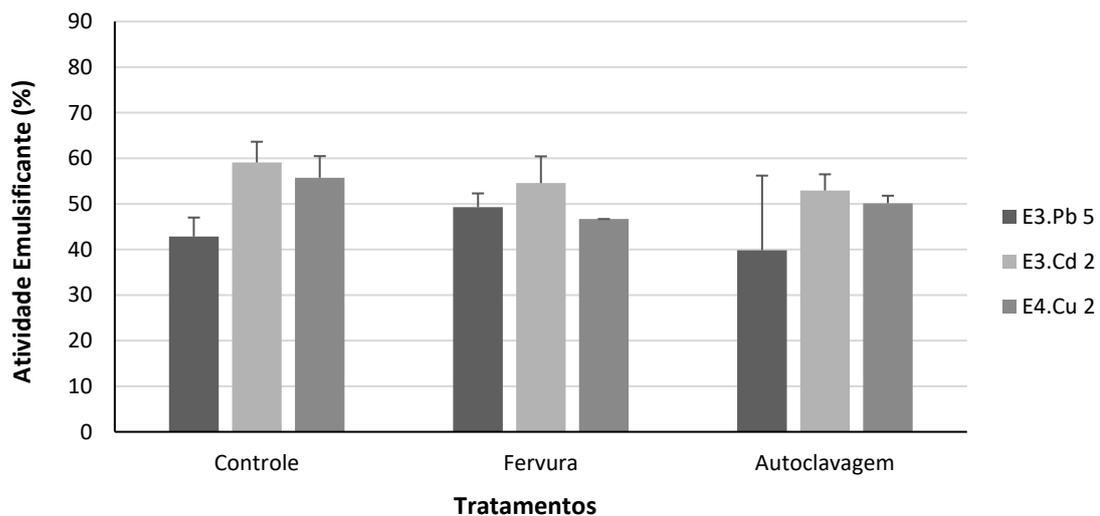
O bioemulsificante alasan apresenta um padrão de emulsificação semelhante com a variação do pH. Em pH ácidos, de 4,0 a 6,0, a atividade varia em torno de 40% da atividade emulsificante em pH 7,0. Já em pH básicos, de 8,0 a 9,0, os índices atingem seu máximo, com valores 20% maiores do que o controle. Mas em pH extremos, acima de 9,0, a atividade emulsificante volta a cair e também é 60% mais baixa que em pH neutro (Toren *et al.*, 2001).

O padrão de variação na atividade emulsificante em função do pH é variável e está relacionada à estrutura das moléculas. Alguns bioemulsificantes podem manter sua atividade estável, sem ser influenciada pela variação do pH, como demonstrado para o lipopeptídeo produzido por *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 (de Sousa & Bhosle, 2012). A capacidade de atingir altos índices de atividade emulsificante em extremos de pH ou em valores de pH específicos pode direcionar o uso de determinadas moléculas a situações em que a emulsificação deve ser realizada sob essas condições, como pode ocorrer em tratamentos de biorremediação em ambientes naturais ou ainda em indústrias alimentícias e de cosméticos.

#### 5.4.1.4. Avaliação da influência da temperatura na atividade emulsificante

Não houve alterações significativas entre os valores obtidos nos ensaios de atividade emulsificante após exposição a 100 °C por 60 min e autoclavagem a 121 °C por 15 min das soluções das substâncias poliméricas produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 (Figura 16). A estabilidade aos tratamentos térmicos aos quais foram submetidas foram indicadas por um p-valor no teste F igual a 0,59, maior que índice de significância de 0,05. (Figura 16).

Padrões semelhantes foram descritos para a solução do bioemulsificante produzido por *Bacillus licheniformis* K125, que manteve sua atividade mesmo após autoclavagem por 15 min (Suthar *et al.*, 2008). O lipopeptídeo produzido por *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 apresentou queda de cerca de 10% em sua atividade emulsificante quando exposto à temperatura de 100 °C (de Sousa & Bhosle, 2012). Reduções de 30 e 10% foram observadas também para as substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Geobacillus pallidus* XS2 e XS3, respectivamente, após incubação da solução da substância a 100 °C por 1 h (Zheng *et al.*, 2011). Já, o exopolissacarídeo EPS-s produzido por *Enterobacter* sp. A47 perdeu toda sua atividade emulsificante ao ser exposto à 100 °C, enquanto o EPS-g, produzido pelo mesmo isolado, manteve 65% da atividade emulsificante após o tratamento (Freitas *et al.*, 2013). O bioemulsificante alasan, por sua vez, teve um aumento de 30% em sua atividade emulsificante após tratamento a 100 °C (Toren *et al.*, 2001).



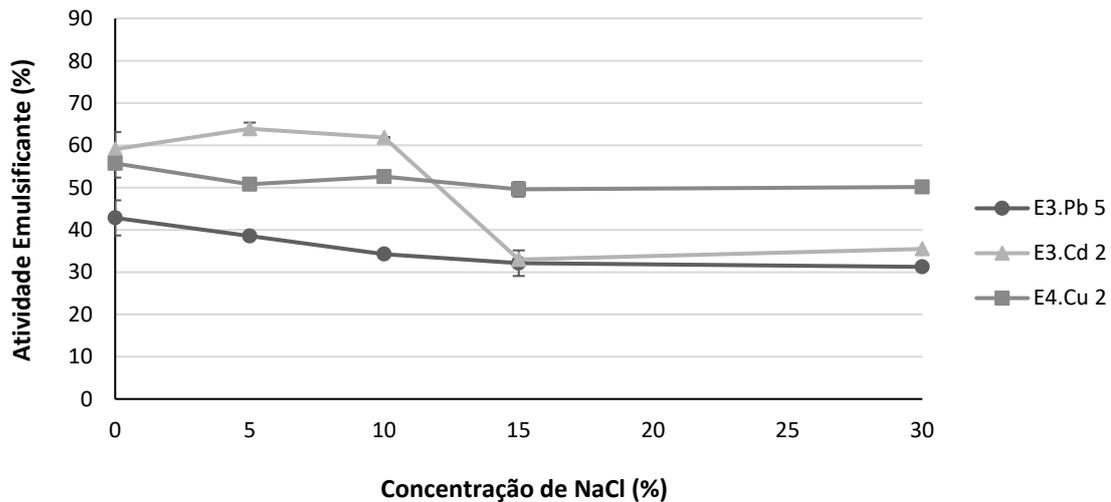
**Figura 16:** Influência da temperatura na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

A capacidade de manter os índices de emulsificação mesmo após um tratamento a altas temperaturas, incluindo o processo de autoclavagem, evidencia uma característica vantajosa das moléculas analisadas. Tal resistência propicia o uso dessas substâncias em processos industriais que sejam submetidos a essas condições, sobretudo mecanismos de esterilização, que são de fundamental importância nas indústrias alimentícia e de cosméticos.

#### 5.4.1.5. Avaliação da influência da salinidade na atividade emulsificante

Nos ensaios de influência de diferentes concentrações de cloreto de sódio na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2, apenas a molécula do último isolado se mostrou estável em diferentes salinidades (Figura 17).

O biopolímero do isolado *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 apresentou resultados significativamente semelhantes até a concentração de 15% do sal, em que sua atividade emulsificante sofre uma queda de 25%, atingindo seu mínimo na concentração de 30% de NaCl, com um valor de 31,26%. Resultados similares foram obtidos pelo lipopeptídeo produzido por *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10, que apresentou um decaimento de acordo com o acréscimo de diferentes concentrações de NaCl, reduzindo seu índice de 60 para 40%, na concentração de 25% do sal (de Sousa & Bhosle, 2012).



**Figura 17:** Influência da salinidade na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

Já a substância polimérica extracelular do isolado *Bacillus* sp. E3.Cd 2 foi a que apresentou maior sensibilidade aos efeitos da salinidade, com queda de 44,17% em sua atividade emulsificante na concentração de 15% de NaCl, a partir da qual não houve alterações significativas. Os lipopolissacarídeos produzidos por *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 em diferentes fontes de carbono também perderam cerca de 40% de sua atividade emulsificante com o acréscimo do sal em até 20% (Colin *et al.*, 2013). Já os bioemulsificantes produzidos por *Geobacillus pallidus* XS2 e XS3 tiveram queda mais acentuada de até 70% de sua atividade emulsificante na concentração de 30% (Zheng *et al.*, 2011).

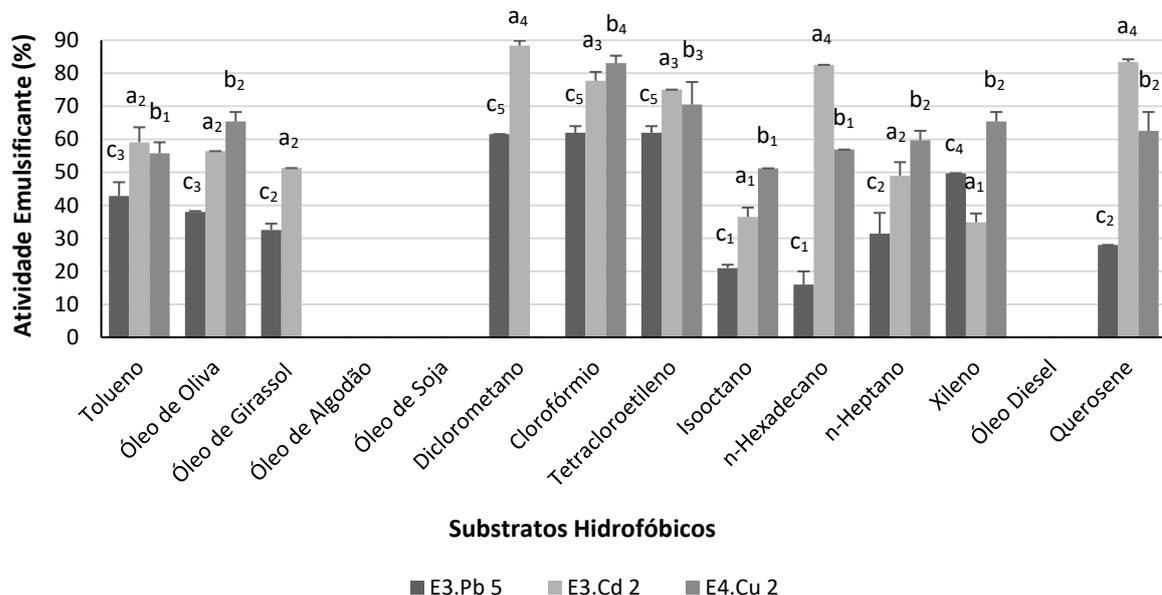
Por fim, não houve alterações significativas na atividade emulsificante da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 mesmo com o acréscimo de NaCl a concentrações de 30%, sugerindo uma estabilidade da molécula a altas quantidades do sal. Da mesma forma, a substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus licheniformis* K125 se manteve estável em concentrações até 15% de cloreto de sódio (Suthar *et al.*, 2008).

Os emulsificantes químicos que respondem pela maior parte da produção mundial usualmente apresentam em sua composição um componente polar que libera cargas quando dissociado, podendo ser catiônicos, aniônicos ou anfóteros. A presença dessas cargas pode ser influenciada pela dissolução de sais no meio, como o NaCl, que acabam prejudicando a atividade emulsificante do tensoativo. Dessa forma, compostos biológicos possuem maior estabilidade a altas concentrações de sais, uma vez que seus grupos polares, na maioria das vezes, são compostos por substâncias neutras como carboidratos ou peptídeos (Salager, 1999).

A estabilidade a altas concentrações de sais é muito importante na indústria e nos processos de biorremediação, visto que estes íons são amplamente utilizados e diversas emulsões devem ser formadas sob essas condições. Uma das aplicações dos tensoativos que exige a manutenção de sua atividade mesmo em elevada salinidade é a recuperação do petróleo (Dastgheib *et al.*, 2008).

#### 5.4.1.6. Avaliação da natureza da fase hidrofóbica na atividade emulsificante

Alguns emulsificantes possuem especificidade quanto ao substrato emulsificado. Para se conhecer o espectro de emulsificação das substâncias poliméricas extracelulares dos isolados *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus sp.* E3.Cd 2 e *Bacillus sp.* E4.Cu 2, uma emulsão foi formada substituindo-se a fase hidrofóbica de tolueno por hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos, organoclorados e óleos vegetais. Todas as biomoléculas apresentaram atividade emulsificante em todos os tipos de hidrocarbonetos testados (Figura 18).



**Figura 18:** Influência do substrato hidrofóbico na atividade emulsificante das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus sp.* E3.Cd 2 e *Bacillus sp.* E4.Cu 2. Diferentes letras comparam isolados bacterianos e diferentes números mostram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A substância polimérica extracelular produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 mostrou atividade emulsificante para os óleos vegetais de oliva e de girassol, com valores de 37,97 e 32,51%, ainda que com uma redução se comparada aos valores obtidos com tolueno

(42,84%). Seus maiores índices de emulsificação foram observados com os compostos clorados, como clorofórmio (61,98%), diclorometano (61,58%) e tetracloroetileno (61,98%), em que atingiu valores acima de 60%. A atividade emulsificante para xileno foi semelhante àquela observada para tolueno, ambos compostos monoaromáticos. Os índices referentes aos hidrocarbonetos isoctano, n-hexadecano, n-heptano e querosene sofreram uma redução e variaram de 15,99 a 31,41%.

Já a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2 apresentou um perfil muito semelhante àquela produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5. Índices de emulsificação de 56,40 e 51,27% foram obtidos, respectivamente, para os óleos de oliva e de girassol. Entretanto, as atividades emulsificantes mais expressivas também foram observadas para os compostos clorados, variando entre 75,04%, para o tetracloroetileno e 88,37%, para o diclorometano. Os índices do n-hexadecano e do querosene também foram altos, com valores de 82,54 e 83,39%, respectivamente. Já aqueles observados para os hidrocarbonetos isoctano, n-heptano e xileno variaram entre 34,84 e 49,00%.

Por fim, a substância polimérica extracelular de *Bacillus* sp. E4.Cu 2 apresentou atividade emulsificante significativa a uma menor gama de compostos. Dentre os óleos vegetais, apenas o óleo de oliva foi emulsificado a índices de 64,41%. Já entre os hidrocarbonetos clorados, apenas clorofórmio e tetracloroetileno foram emulsificados, ainda que com índices de 83,04 e 70,53%, respectivamente. Os outros hidrocarbonetos foram emulsificados com valores que variaram de 51,19%, para o isoctano, a 65,41%, para o xileno.

O espectro de compostos hidrofóbicos capazes de ser emulsificados pelas substâncias poliméricas extracelulares pode variar bastante de acordo com a estrutura do bioemulsificante. As biomoléculas produzidas pelos isolados *Geobacillus pallidus* XS2 e XS3 possuem índices de emulsificação variáveis, mas padrões semelhantes de atividade emulsificante. Para ambas, os maiores índices foram observados para xileno, n-hexano e tolueno, variando de 71 a 77%, enquanto a emulsificação de parafina líquida atingiu um valor em torno de 50% e o óleo bruto, 21% (Zheng *et al.*, 2011). Já o alasan possui uma especificidade maior por óleo bruto, atingindo uma maior atividade emulsificante com esse substrato, enquanto a emulsificação de n-heptano é menor (Toren *et al.*, 2001).

O óleo diesel e os óleos vegetais de algodão e de soja não foram emulsificados. O diesel é um óleo denso com propriedades específicas, mas é capaz de ser emulsificado por diversas biomoléculas, como, por exemplo, pelo lipopeptídeo produzido por *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 (de Sousa & Bhosle, 2012). Entretanto, em grande parte dos trabalhos, a atividade de bioemulsificantes é reduzida quando o óleo diesel é utilizado como

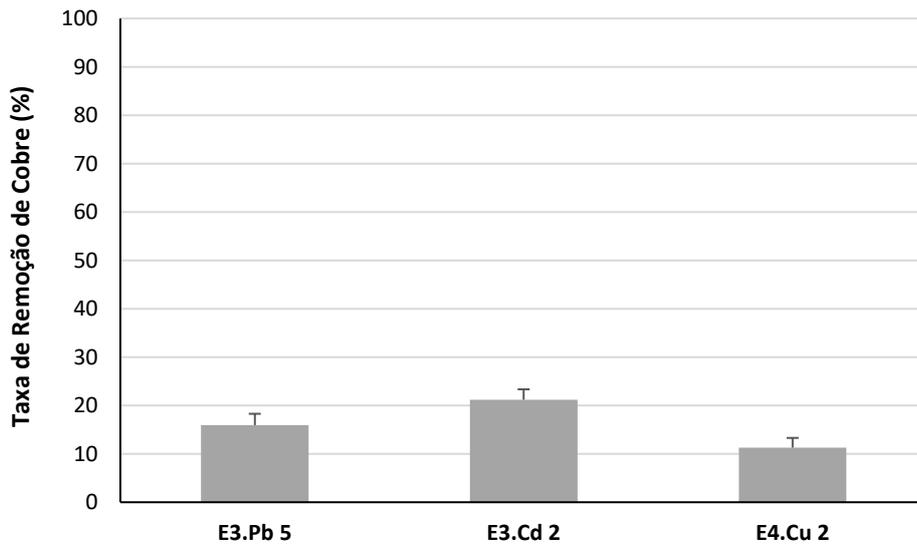
fase hidrofóbica. As maiores atividade emulsificantes do exopolissacarídeo produzido por *Salipiger mucosus* A3<sup>T</sup> variam entre 70 e 75% para óleos vegetais e hidrocarbonetos, já os índices atingidos na emulsificação de diesel caem para 37,5% (Llamas *et al.*, 2010). A atividade emulsificante alcançada para os bioemulsificantes produzidos por *Bacillus megaterium* RB-05 e *Bacillus pumilus* UW-02 para óleo diesel foram 54 e 57%. Apesar dos valores altos, os índices foram os menores se comparados com todos os outros substratos testados (Chowdhury *et al.*, 2011a; Chowdhury *et al.*, 2011b).

Óleos vegetais possuem uma composição diferente dos demais hidrocarbonetos, sendo compostos, sobretudo, por triglicerídeos. Algumas biomoléculas possuem alta capacidade de emulsificar tais compostos. Dentre elas, a glicolipoproteína microbactan, produzida por *Microbacterium* sp. MC<sub>3</sub>B-10 e com índices de emulsificação de 84% para óleo de girassol, 81% para óleo de milho e 76% para óleo de oliva (Camacho-Chab *et al.*, 2013). Por outro lado, outras apresentam uma atividade muito mais baixa para óleo vegetais se comparada a outros hidrocarbonetos de origem do petróleo. A linhagem halotermotolerante *Bacillus licheniformis* ACO1, isolada de reservatórios de petróleo no Irã, produz um proteoglicano capaz de emulsificar hidrocarbonetos a índices de 60 a 70%, entretanto, a atividade cai para menos de 10% quando utilizado o óleo de oliva (Dastgheib *et al.*, 2008).

#### 5.4.2. Ensaio de remoção de metal

Primeiramente, um ensaio foi realizado emulsificando tolueno e soluções a 10 mg mL<sup>-1</sup> das substâncias poliméricas extracelulares de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 a 10 mg mL<sup>-1</sup>. Às soluções, foram adicionados os íons Cu<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup> a concentrações de 100 e 0,1 ppm, respectivamente, através da diluição dos sais sulfato cúprico (CuSO<sub>4</sub>) e cloreto mercúrico (HgCl<sub>2</sub>). Após 24 h de repouso, uma alíquota da fase hidrofílica foi retirada para determinação da concentração dos metais pesados em solução.

As substâncias poliméricas extracelulares se mostraram pouco eficientes na remoção de cobre de solução sob as condições descritas, atingindo um máximo de 21,19% quando utilizada a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2 (Figura 19). Nesse ensaio, a relação chegou a 2,12 mg de cobre adsorvidos por g da substância polimérica extracelular, enquanto atingiu 1,59 e 1,13 mg do metal adsorvido por g das substâncias produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2, respectivamente.



**Figura 19:** Remoção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  de solução através da formação de emulsões simples utilizando as substâncias poliméricas extracelulares de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

Por outro lado, nos ensaios de remoção de mercúrio, a uma concentração inicial 1000 vezes menor, os valores de remoção atingiram 83,5% para a substância polimérica extracelular produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e 100% para a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 (Figura 20). Em contraste às altas taxas de remoção, 8,35 e 10,0  $\mu\text{g}$  do íons  $\text{Hg}^{2+}$  foram adsorvidos por g dos respectivos biopolímeros.

Zosim e colaboradores (1983) realizaram um experimento semelhante utilizando o bioemulsificante emulsan, produzido por *Acinetobacter venetianus* RAG1. Uma emulsão foi formada utilizando-se hexadecano como fase hidrofóbica, íons uranila ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) foram dissolvidos na camada aquosa e a emulsão foi formada por ação de oscilação sônica. Em pH 7,0, cerca de 10 mmol de íons uranila, equivalente a 2,38 g de urânio, foram adsorvidos por g do exopolissacarídeo. As razões são maiores que as obtidas nos ensaios com mercúrio, que alcançam um máximo de 0,05  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  por g da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 e 33,4  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  por g da biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2.

Por outro lado, quando analisamos a massa de mercúrio removido por volume da camada emulsificada, temos um máximo de 50  $\mu\text{g}$  de urânio  $\text{mL}^{-1}$  na concentração inicial de uranila de 35 ppm. O volume da camada emulsificada foi calculado multiplicando-se a atividade emulsificante, que expressa a altura da camada emulsificada pela altura da coluna da mistura, pelo volume total da mistura, de 2,5 mL. Nos ensaios de mercúrio, com uma concentração

inicial de 0,1 ppm, temos uma razão de 0,18  $\mu\text{g}$  de  $\text{Hg}^{2+}$   $\text{mL}^{-1}$ , considerando uma atividade emulsificante da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 de 55,74%. Já para o cobre, com uma concentração inicial de 100 ppm, a razão foi de 14,32  $\mu\text{g}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  / mL considerando um índice de emulsificação de 59,09% para a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2.

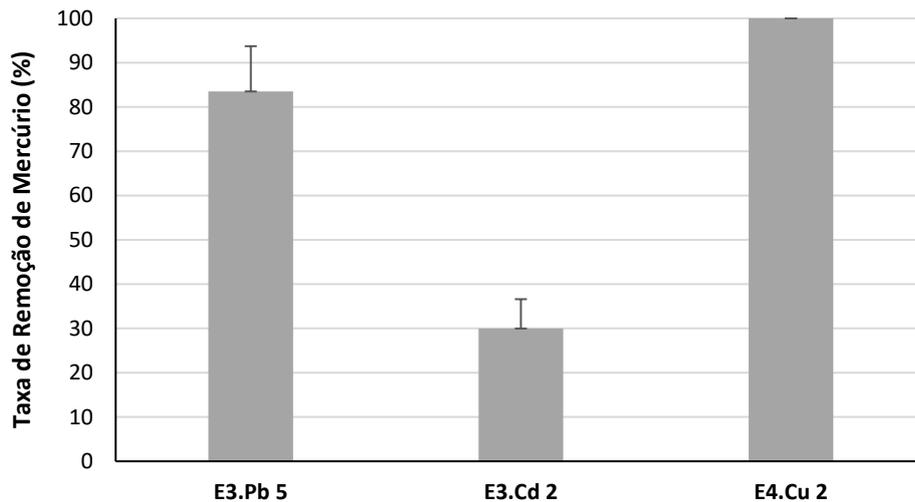


Figura 20: Remoção de íons  $\text{Hg}^{2+}$  de solução através da formação de emulsões simples utilizando as substâncias poliméricas extracelulares de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

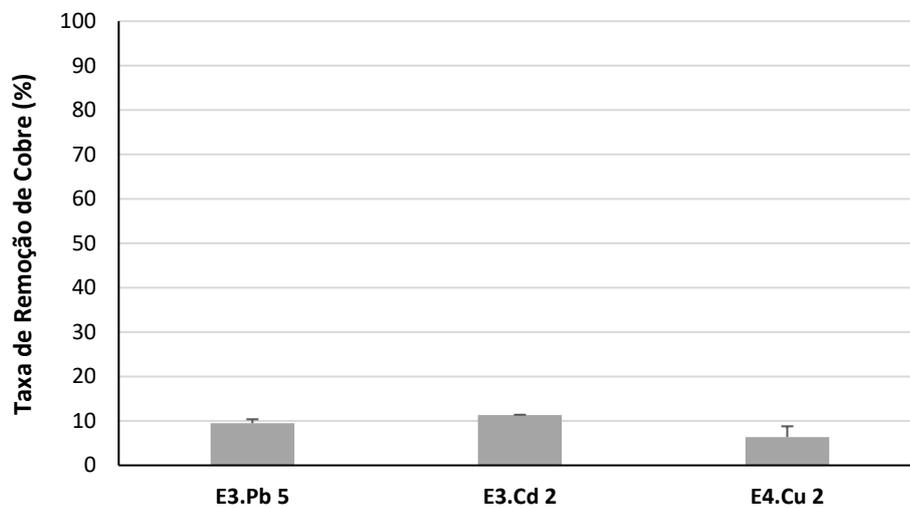
#### 5.4.2.1. Ensaio de remoção de metais utilizando a camada emulsificada

Os resultados dos ensaios de remoção de metais através da formação de emulsões, sobretudo de mercúrio em baixas concentrações, sugeriram uma possível adsorção dos cátions às substâncias poliméricas extracelulares. A capacidade de adsorção das biomoléculas pode ser maior quando estão intermediando a interface entre substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, devido a uma mudança na conformação que pode liberar grupos ligantes (Zosim *et al.*, 1983).

Assim, foi avaliada a capacidade de adsorver íons metálicos das micelas formadas durante a emulsificação de tolueno com as substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2. Nos ensaios, a camada emulsificada, foi aplicada a soluções de cobre e mercúrio e, após agitação e separação das fases por decantação, a concentração dos íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  foi determinada.

Mesmo na aplicação da camada emulsificada, as substâncias poliméricas extracelulares se mostraram pouco eficientes na remoção de cobre de solução, e o valor máximo de remoção

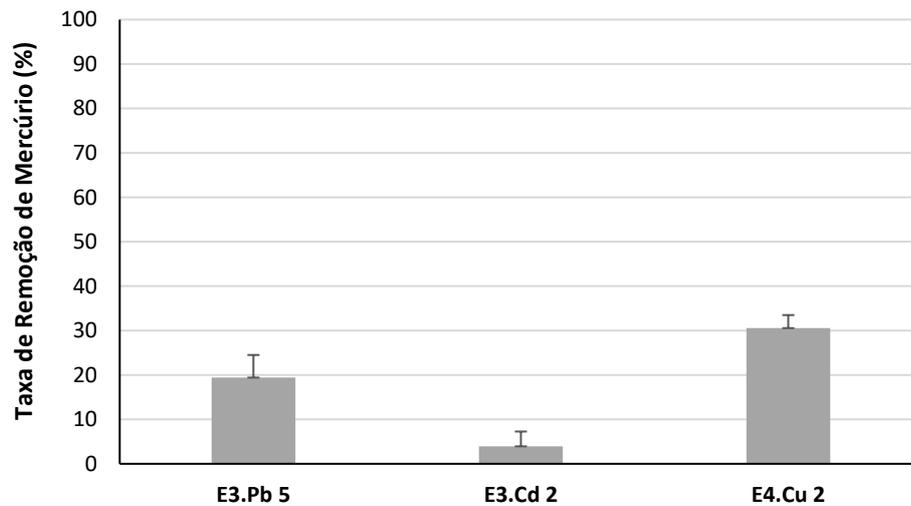
caiu para 11,34% também utilizando a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2 (Figura 21). Considerando a massa necessária dos biopolímeros para a formação da emulsão, o volume da camada emulsificada em cada caso e o volume de camada emulsificada aplicado em cada solução de  $\text{Cu}^{2+}$ , podemos calcular a quantidade de íons metálicos adsorvidos por cada grama da molécula utilizada. Para o isolado com maior taxa de remoção, *Bacillus* sp. E3.Cd 2, 3,35 mg de cobre foram adsorvidos por grama de sua substância polimérica extracelular. Já para as substâncias produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2, os níveis atingiram, respectivamente, 2,03 e 1,78 mg por grama das moléculas.



**Figura 21:** Remoção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  de solução através da aplicação da camada emulsificada formada com as substâncias polimérica extracelulares de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

Os valores não variaram muito se comparados aos obtidos com as emulsões simples. Entretanto, diversos fatores podem ser otimizados para que a adsorção à camada emulsificada seja aumentada, dentre eles o pH, as concentrações iniciais de metal e a razão entre a quantidade de camada emulsificada utilizadas e o volume da solução contendo os íons (Zosim *et al.*, 1983).

Nos ensaios de remoção de mercúrio, os valores de remoção também decresceram. A biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 ainda manteve as maiores taxas de remoção, que chegaram a 30,55% (Figura 22). Por outro lado, a quantidade de mercúrio adsorvido por grama dos biopolímeros atingiu seu máximo de  $8,51 \mu\text{g g}^{-1}$ , seguido por  $4,16 \mu\text{g}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  por g da substância polimérica extracelular produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e  $0,58 \mu\text{g}$  por g da produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2. Apesar de uma pequena queda nos valores, as taxas foram semelhantes às obtidas utilizando-se apenas as emulsões simples.



**Figura 22:** Remoção de íons  $\text{Hg}^{2+}$  de solução através da aplicação da camada emulsificada formada com as substâncias polimérica extracelulares de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

Zosim e colaboradores (1983) obtiveram taxas de remoção mais eficientes utilizando os *emulsanosóis* presentes na camada emulsificada. Com concentrações iniciais de  $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$  de íons uranila, o que equivale a cerca de 78,55 ppm de urânio, foram adsorvidos 5,55 mmol do cátion por g de emulsan, que corresponde a cerca de 1,32 g de urânio. A taxa máxima de adsorção do cobre chega a  $52,72 \text{ } \mu\text{mol}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  por g da biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2, enquanto a de mercúrio alcança  $0,04 \text{ } \mu\text{mol}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  por g da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

A capacidade de adsorção de cátions em micelas é um indicativo da utilização das substâncias poliméricas extracelulares como emulsificantes em membranas líquidas surfactantes, que se apresentam como uma tecnologia emergente na separação de metais de efluentes contaminados (Bach & Gutnick, 2005; Bechiri *et al.*, 2008). A natureza biológica das biomoléculas apresenta vantagens, por ser mais facilmente biodegradável, além de sua maior estabilidade, que pode ser utilizada para um processo preciso de recuperação dos metais extraídos e reutilização das substâncias anfipáticas. Novos testes podem ser realizados, visando a observar de forma mais ampla a atividade adsortiva da camada emulsificada formada com os biopolímeros produzidos por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 e otimizar sua eficiência na remoção de íons (Bach & Gutnick, 2005).

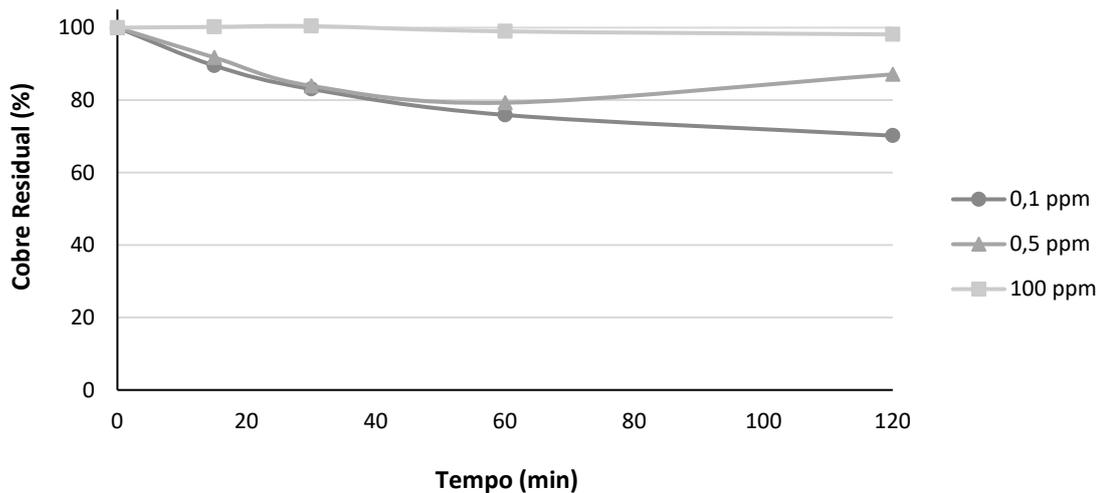
#### 5.4.2.2. Ensaio de bioadsorção de metais pesados às substâncias poliméricas extracelulares utilizando a técnica de equilíbrio por diálise

Por fim, foi avaliada a capacidade das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 de adsorver os metais cobre e mercúrio à estrutura de sua molécula. Os ensaios foram realizados através de membranas de diálise que permitiam que os cátions entrassem em contato com as biomoléculas e saíssem de solução devido à interação com seus grupos funcionais.

Nos tubos de diálise, foram adicionados 5 mL da solução a 10 mg mL<sup>-1</sup> de cada substância polimérica extracelular. Entretanto, o extrato bruto é composto por moléculas com diferentes massas moleculares e a diálise retém no tubo apenas os componentes de peso molecular maior que 3,5 kDa, perdendo parte de seus componentes de menor peso molecular. Os ensaios de purificação mostraram que após a liofilização do material dialisado, restaram, respectivamente, 17,0, 32,6 e 33,4% dos extratos brutos das biomoléculas de *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 e, assim, os cálculos da quantidade de íons adsorvidos por grama das substâncias poliméricas extracelulares foram realizados baseados na massa das moléculas retidas na membrana.

Os ensaios de remoção dos íons Cu<sup>2+</sup> na concentração de 100 ppm não apresentaram resultados positivos para as substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e *Bacillus* sp. E3.Cd 2. Como a eficiência de remoção de mercúrio em concentrações menores foi maior, para a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2, a adsorção ao cátion foi testada também com concentrações iniciais do metal a 0,1 e 0,5 ppm e também a título de comparação com os valores obtidos nos ensaios de remoção do mercúrio.

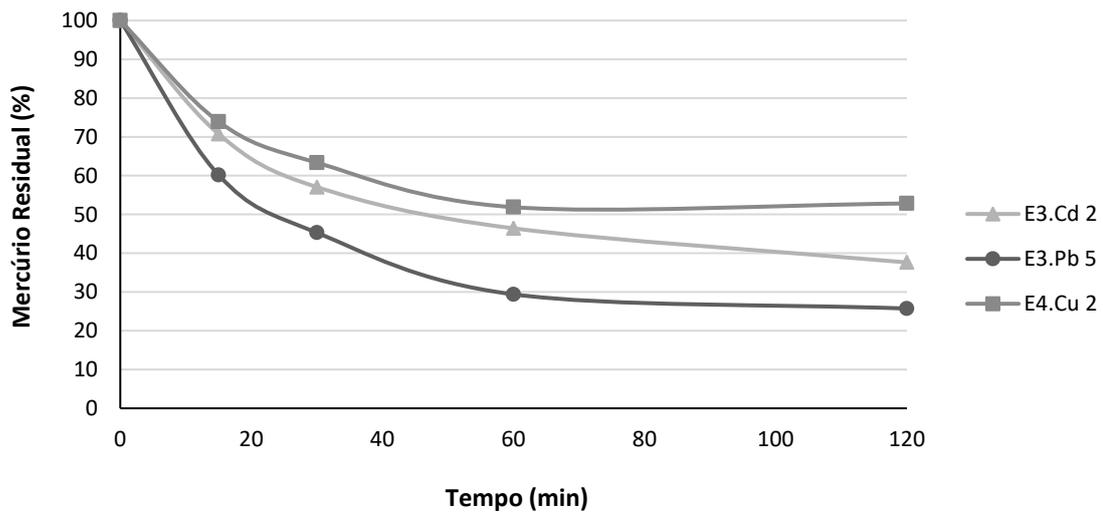
No ensaio, foi verificado que a eficiência de remoção de cobre em concentrações iniciais mais baixas também foi maior. Os índices atingiram 29,81% após 120 min na concentração inicial de 0,1 ppm, enquanto permaneceram em 1,87% na concentração inicial de 100 ppm (Figura 23). Apesar da menor taxa de remoção, os índices de adsorção atingiram 16,83 mg de Cu<sup>2+</sup> por g do biopolímero na concentração inicial de 100 ppm. Enquanto que, para a concentração inicial de 0,1 ppm, a razão alcançou 267,7 µg/g. Os valores obtidos para a concentração de 100 ppm foram maiores do que os obtidos nos ensaios utilizando emulsões simples e a camada emulsificada, sugerindo que o método de diálise seja mais eficiente na remoção dos metais pesados para a substância polimérica extracelular testada.



**Figura 23: Remoção de íons  $\text{Cu}^{2+}$  de solução em diferentes concentrações iniciais através da adsorção à substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2.**

O exopolissacarídeo biofloculante produzido por *Paenibacillus elgii* B69 foi testado por sua capacidade de adsorver íons de metais pesados em concentrações iniciais de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  e em volumes de 100 mL, onde foram adicionados 100 mg da biomolécula. Após 24 h de agitação, 59% dos íons  $\text{Co}^{2+}$  foram removidos, 60% dos íons  $\text{Pb}^{2+}$  e 72% dos íons  $\text{Al}^{3+}$ . O cobre foi adicionado a uma concentração de 127,1 ppm e 53% dos íons foram adsorvidos ao exopolissacarídeo, totalizando  $67,36 \text{ mg g}^{-1}$  (Li *et al.*, 2013). Já 5 mg do exopolissacarídeo produzido por *Paenibacillus jamilae* foram submetidos a diálise em 200 mL de uma solução a 6,35 ppm de cobre por 24 h. Os íons  $\text{Cu}^{2+}$  foram adsorvidos a uma relação de  $35 \text{ mg g}^{-1}$  da biomolécula (Morillo *et al.*, 2006).

Dentre as três substâncias poliméricas extracelulares testadas, aquela que apresentou maior eficiência na remoção do mercúrio de solução, quando utilizada uma concentração inicial de 0,1 ppm, foi a produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, atingindo índices de 74,27% de remoção. Em seguida, as biomoléculas produzidas por *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 adsorveram, respectivamente, 62,38 e 52,83% do metal (Figura 24). Após duas horas, as substâncias poliméricas extracelulares adsorveram, em ordem decrescente de eficiência, 1.310,6, 574,0 e 474,5  $\mu\text{g}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  por grama de suas moléculas. Os valores foram muito superiores àqueles obtidos nos ensaios utilizando emulsões simples e a camada emulsificada, mostrando uma maior eficiência do método de diálise na remoção de íons de metais pesados de solução.



**Figura 24:** Remoção de íons  $Hg^{2+}$  de solução a uma concentração inicial de 0,1 ppm através da adsorção às diferentes substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

Considerando os resultados obtidos nos experimentos anteriores, a diálise para remoção de mercúrio de solução foi realizada utilizando-se a substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 e variando as concentrações iniciais do metal.

Como sugerido pelos experimentos anteriores, um aumento na concentração de mercúrio da solução inicial reduz a eficiência com que este metal é removido pela substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 (Figura 25). Por outro lado, a quantidade de  $Hg^{2+}$  adsorvido por grama da biomolécula aumenta (Figura 26).

Dentre as concentrações iniciais utilizadas, na menor delas, de 0,05 ppm, 57,99% dos íons  $Hg^{2+}$  foram removidos de solução, enquanto na maior concentração, de 100 ppm, apenas 19,93% do metal foi adsorvido pela substância polimérica extracelular. Os resultados foram maiores do que os obtidos durante a adsorção de cobre pela mesma molécula nas mesmas concentrações, indicando uma maior afinidade dos grupos funcionais presentes na substância por  $Hg^{2+}$  se comparado ao  $Cu^{2+}$ .

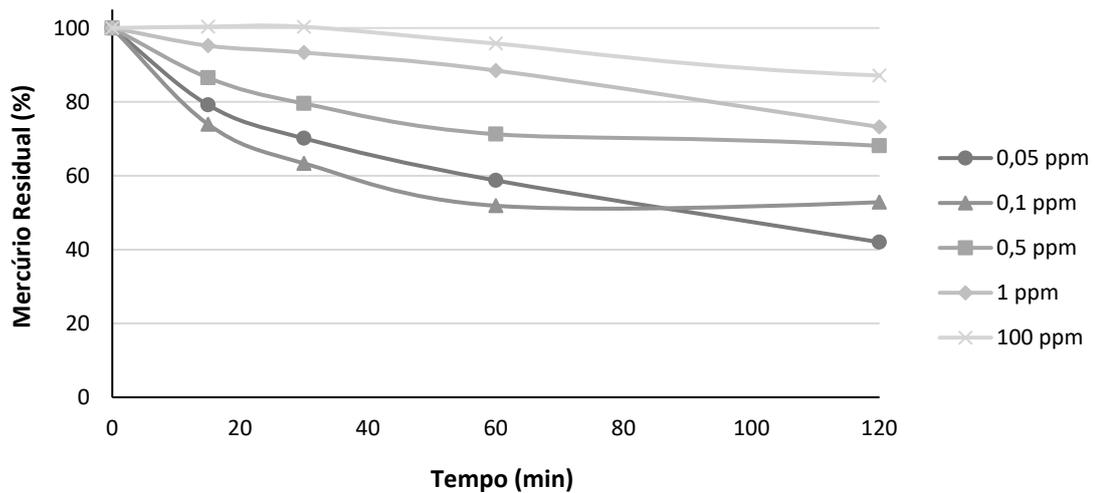


Figura 25: Remoção de íons  $Hg^{2+}$  de solução em diferentes concentrações iniciais através da adsorção à substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2.

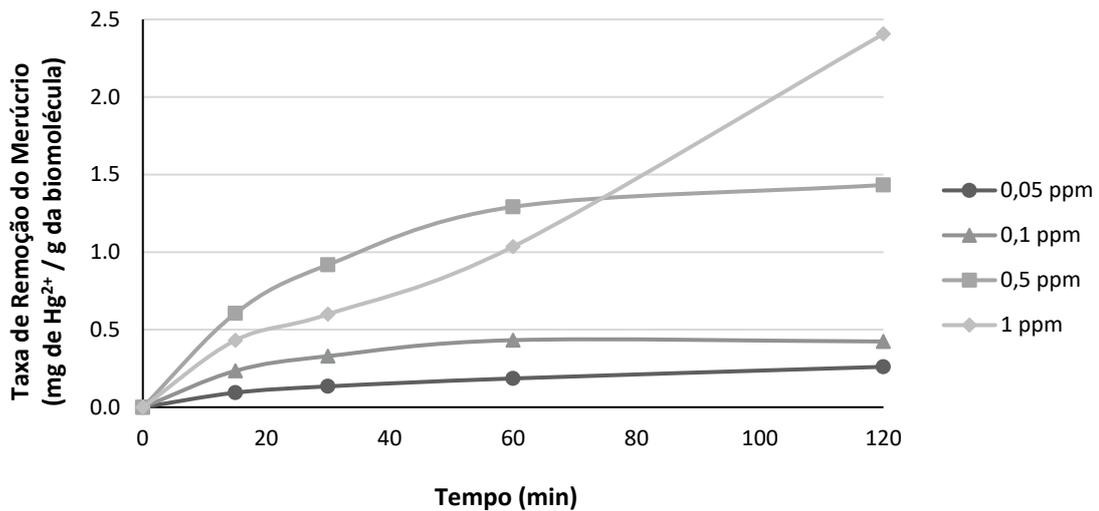


Figura 26: Quantidade de íons  $Hg^{2+}$  adsorvidos por grama da substância polimérica extracelular produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 ao longo do período experimental dos ensaios de remoção através da técnica de equilíbrio de diálise.

Inversamente à eficiência de remoção de íons, a quantidade de mercúrio adsorvido por grama da substância polimérica extracelular se eleva com o aumento da concentração inicial. A 0,05 ppm, as taxas chegam a  $260,4 \mu g g^{-1}$ , enquanto a 1 ppm, esses valores são de  $2,4 mg g^{-1}$ . Já a 100 ppm, apesar da baixa eficiência na remoção total de íons  $Hg^{2+}$ , os valores atingem  $38,58 mg g^{-1}$  da biomolécula (dados não mostrados no gráfico).

A distribuição dos íons metálicos entre a fase líquida e o biossorvente, no equilíbrio, pode ser prevista por isotermas. Dentre os modelos mais comuns, as isotermas de Langmuir e

Freundlich são as mais utilizadas para explicar os resultados obtidos nos processos de adsorção. Assim, os dados obtidos nos ensaios de remoção de mercúrio em diferentes concentrações foram trabalhados para se verificar o ajuste da sua distribuição a um dos modelos já estabelecidos.

A expressão linear do modelo de Langmuir é:

$$C_e/q_e = 1/q_m.K_L + C_e / q_m$$

em que  $C_e$  é a concentração do mercúrio no equilíbrio ( $g L^{-1}$ ),  $q_e$  é a quantidade adsorvida de mercúrio por grama da substância polimérica extracelular de *Bacillus* sp. E4.Cu 2 ( $g g^{-1}$ ),  $q_m$  é uma constante relacionada à capacidade máxima de adsorção ( $g g^{-1}$ ) e  $K_L$  é a constante de Langmuir relacionada à energia de adsorção ( $L g^{-1}$ ). Plotando-se o gráfico linear em que a razão  $C_e/q_e$  varia em função de  $C_e$ , pode-se inferir o valor de  $1/q_m.K_L$  como o coeficiente linear da equação da linha de tendência obtida e  $1/q_m$  como seu coeficiente angular.

Já a equação do modelo de Freundlich é representada por:

$$\ln q_e = \ln K_F + \ln C_e / n$$

em que  $K_F$  é a constante de Freundlich relacionada à capacidade de adsorção da substância polimérica extracelular de *Bacillus* sp. E4.Cu 2 ( $L g^{-1}$ )<sup>1/n</sup> e  $n$  é uma outra constante relacionada à intensidade dessa adsorção. Plotando-se o gráfico linear em que o valor de  $\ln q_e$  varia em função de  $\ln C_e$ , pode-se inferir o valor de  $\ln K_F$  como o coeficiente linear da equação da linha de tendência obtida e  $1/n$  como seu coeficiente angular.

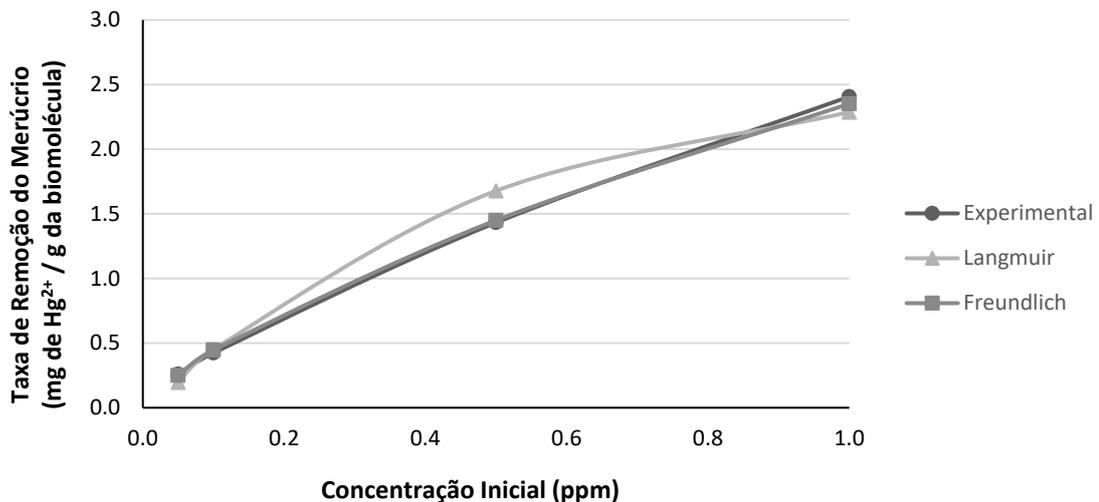
A linearização das equações de Langmuir e Freundlich fornecem regressões que mostram que os resultados obtidos se ajustam melhor ao modelo de Freundlich, com um  $R^2$  igual a 0,998 (Tabela 6).

**Tabela 6: Constantes das equações de Langmuir e Freundlich.**

Equação da Isoterma de Langmuir			Equação da Isoterma de Freundlich		
$q_m$ ( $\mu g g^{-1}$ )	$K_L$ ( $L mg^{-1}$ )	$R^2$	$K_F$ ( $L mg^{-1}$ ) <sup>1/n</sup>	$n$	$R^2$
3.341,13	2,96	0,929	224,58	1,58	0,998

O modelo de Langmuir pressupõe uma adsorção em sítios uniformes, com formação de uma monocamada sobre o adsorvente, atingindo um máximo quando a superfície é totalmente

coberta. Assim, a afinidade iônica independe da quantidade dos íons adsorvidos. Entretanto, os dados obtidos com a adsorção de mercúrio se assemelharam ao previsto pela equação de Freundlich (Figura 27), em que a energia de adsorção decresce à medida que a substância polimérica extracelular vai sendo coberta pelos íons  $\text{Hg}^{2+}$ . Nesse contexto, a superfície não é uniforme e a adsorção pode ocorrer em multicamadas (Guerra *et al.*, 2007).



**Figura 27:** Isotermas dos modelos de Langmuir e Freundlich e dos dados experimentais da taxa de remoção de mercúrio de acordo com a concentração inicial do metal utilizada.

Zhang e colaboradores (2013) analisaram a capacidade de adsorção de  $\text{Hg}^{2+}$  por substâncias poliméricas extracelulares extraídas de lodos ativados de um sistema de tratamento de esgoto de Taiwan. No sistema, 1,97 mg das biomoléculas foram utilizados em ensaios de diálise com 90 mL de uma solução a 30 ppm de mercúrio por 24 h. Após 2 h, um equilíbrio foi atingido e ao fim do experimento, as substâncias poliméricas extracelulares extraíram 81,4% do metal com um máximo de 452,8 mg do íon  $\text{Hg}^{2+}$  por grama das biomoléculas.

Por outro lado, o exopolissacarídeo produzido por um isolado marinho de *Enterobacter cloacae*, capaz de remover o cobre a níveis de 6,6 mg  $\text{g}^{-1}$  da substância, não foi capaz de adsorver mercúrio em quantidades significativas (Iyer *et al.*, 2005).

Por fim, Zamil e colaboradores (2008) analisaram o exobiopolímero produzido por *Pseudomonas fluorescens* BM07 e composto sobretudo por polipeptídeos e sua capacidade de adsorver íons  $\text{Hg}^{2+}$ . Os experimentos foram conduzidos adicionando-se uma quantidade de 100 mg da biomolécula a 300 mL de uma solução de  $\text{HgCl}_2$  com concentrações de 3 a 530 ppm de mercúrio e submetendo a solução a agitação por 2 h. A uma concentração inicial de 100 ppm, o exobiopolímero foi capaz de adsorver cerca de 100 mg do metal por grama da substância.

Entretanto, a distribuição dos dados obtidos seguiu o modelo de Langmuir, com um  $R^2$  de 0,998 e um  $q_m$  de 286,17  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Em contraponto, o ensaio de biossorção de mercúrio utilizando uma associação entre a substância polimérica extracelular produzida pela cianobactéria *Chroococcus* sp. e a goetita mostrou uma eficiência de remoção máxima de mercúrio de 73,7%. O modelo experimental entretanto, ajustou-se com um  $R^2$  de 0,996 ao modelo de Freundlich (Song *et al.*, 2013).

### 5.5. Caracterização bioquímica

As substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 foram purificadas através da diálise de seus extratos brutos em membranas de limite de peso molecular entre 3,5 e 5 kDa. Após os ensaios, as biomoléculas foram recuperadas através de liofilização e submetidas a uma caracterização bioquímica primária com testes bioquímicos para a determinação de carboidratos e proteínas e gravimétrico, para a determinação dos lipídeos.

A biomolécula produzida por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 mostrou uma composição sem a presença de proteínas e com 1,97% de carboidratos e sua porção lipídica foi predominante, assim como para os outros biopolímeros, respondendo por cerca de 97% de sua massa total. Já a substância polimérica extracelular de *Bacillus* sp. E3.Cd 2 apresentou 3,84% de proteínas e 1,74% de carboidratos em sua constituição e os lipídeos corresponderam a 88,3% de sua composição. Por fim, o polímero extracelular de *Bacillus* sp. E4.Cu 2 se mostrou composto por 1,67% de proteínas e 3,74% de carboidratos e sua porção lipídica foi estimada em 79%.

As moléculas analisadas apresentaram um percentual significativo dos lipídeos na sua estrutura final, respondendo pela maior parte de sua massa, mas mostrando também grupos de carboidratos e proteínas, ainda que em menor proporção. Os testes de seleção utilizados, com os corantes vermelho congo e calcoflúor, podem ter evidenciado a produção dessas substâncias poliméricas, mesmo sendo específicos para polissacarídeos, uma vez que há uma porção de carboidratos em todas as moléculas analisadas e os corantes evidenciam sobretudo ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, presente na maior parte dos açúcares (Herth & Schnepf, 1980). Apesar da maior parte das substâncias poliméricas extracelulares ser composta predominantemente por polissacarídeos, tal estrutura é muito variável e depende de uma série de fatores, como o micro-organismo produtor e as condições de cultivo, principalmente da fonte de carbono presente no meio (Souza & Garcia-Cruz, 2004).

O bioemulsificante produzido por *Ochrobactrum anthropi* AD2 apresentou uma composição de 72% de carboidratos e 18% de proteínas, entretanto, quando hidrocarbonetos eram adicionados à cultura, sua constituição variava, chegando a atingir 60% de carboidratos e 26% de proteínas na presença de n-octano (Calvo *et al.*, 2008). Já o bioemulsificante produzido por *Halomonas eurihalina* F2-7 mostrou uma estrutura com 37% de carboidratos e 7% de proteínas, apesar dos testes de detecção de lipídeos não terem sido realizados. A estrutura também apresentou mudanças com a utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono, chegando a 21% de carboidratos e 3% de proteínas num meio suplementado com hexano (Martinez-Checa *et al.*, 2007). Já a substância polimérica extracelular, também com atividade emulsificante, produzida por *Planococcus maitriensis* Anita I se mostrou composta por 12% de carboidratos e 24% de proteínas (Kumar *et al.*, 2007).

A predominância de uma porção lipídica na estrutura das substâncias poliméricas extracelulares produzidas por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 podem ter sido determinantes na atividade emulsificante dos polímeros, interagindo com a porção hidrofóbica e permitindo sua solubilização em água. Por outro lado, os grupos de carboidratos e proteínas podem ter favorecido a interação com metais mesmo que em menor proporção, e, por isso, permitiram a remoção dos íons cobre e mercúrio de solução. Zhang e colaboradores (2006) mostraram que até mesmo grupos lipídicos podem interagir com íons metálicos e adsorvê-los à estrutura de substâncias poliméricas extracelulares.

Uma melhor caracterização da estrutura das moléculas pode permitir a otimização de suas aplicações biotecnológicas na emulsificação de compostos hidrofóbicos, na adsorção de metais e até mesmo em uma aplicação que requer ambas as funções. A exploração e a caracterização de uma ampla diversidade de moléculas a partir de micro-organismos produtores é uma alternativa para o descobrimento de novas tecnologias em que a natureza biológica, biodegradável e renovável, dos compostos favorece seu emprego.

Por isso, a importância de isolar bactérias de um ecossistema com alta biodiversidade e ainda pouco explorado, como o da Floresta Amazônica, e de ambientes em que há uma pressão seletiva da atividade industrial, capaz de favorecer micro-organismos com adaptações que podem ser exploradas em novas tecnologias. As substâncias poliméricas extracelulares obtidas mostraram um potencial de ser utilizadas em ensaios de emulsificação de hidrocarbonetos e de remoção de metais pesados de solução, que podem ser aproveitados em processos industriais ou de biorremediação. Entretanto, novos estudos ainda devem ser conduzidos para otimizar essas propriedades e fazer com que as biomoléculas sejam uma alternativa comercialmente

viável e também para explorar melhor outras características ou subprodutos dos microorganismos isolados.

## 6. CONCLUSÕES

- Em todas as amostras coletadas na Mina do Sossego, foi verificada a presença de bactérias heterotróficas nos ensaios de NMP, com valores de densidade variando de três ordens de grandeza em E1 e E2 a oito ordens de grandeza em E4. Ainda que as coletas tenham sido realizadas em ambientes com condições adversas ao crescimento da maioria dos micro-organismos, a escolha dos locais se mostrou satisfatória, uma vez que pode evidenciar bactérias que compunham a rica e pouco explorada biodiversidade amazônica e que poderiam apresentar mecanismos de resistência para sobreviver sob os fatores de estresse.
- Em todas as amostras, foi verificada a presença de bactérias heterotróficas resistentes a chumbo, arsênio, cádmio, cobre e zinco, indicando a possibilidade de isolamento através da técnica do enriquecimento. Assim, foram isolados 77 morfotipos. A identificação dos morfotipos mostrou uma predominância do gênero *Bacillus* dentre os 17 gêneros encontrados em conformidade com diversos outros trabalhos que também verificaram a presença deste gênero em ambientes contaminados com metais pesados. Outros gêneros, tais como *Alcaligenes* e *Enterobacter*, também se destacaram.
- Dos 77 isolados, em 45 deles (58%) foi verificada a produção de exopolissacarídeos, indicadores da produção de substâncias poliméricas extracelulares. A elevada ocorrência de morfotipos produtores dessas biomoléculas pode estar relacionada à pressão seletiva exercida pelos metais pesados durante o enriquecimento.
- Dos 45 isolados produtores, apenas *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5 e *Bacillus* sp. E3.As 2 foram capazes de reduzir a tensão superficial do sobrenadante de suas culturas para valores abaixo de  $35 \text{ mN m}^{-1}$ . Por outro lado, 12 isolados apresentaram índices de emulsificação do tolueno maiores que 50%. A maior produção de substâncias com ação emulsificante se comparadas às surfactantes pode estar relacionada aos métodos de seleção, que favoreceram moléculas poliméricas, usualmente com maiores índices de emulsificação.

- Considerando, sobretudo, as propriedades tensoativas do sobrenadante das culturas, as substâncias poliméricas extracelulares dos isolados *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 foram precipitadas e utilizadas nos ensaios de caracterização de sua atividade tensoativa e de remoção de metais de solução.
- Apenas a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E3.Cd 2 foi capaz de reduzir a tensão superficial da água expressivamente, atingindo valores de  $48,54 \text{ mN m}^{-1}$  e sua concentração micelar crítica foi determinada em  $4,69 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os maiores valores de tensão superficial obtidos pelo extrato de sua molécula pode ser resultado da precipitação com etanol, que favorece a separação de substâncias com maior peso molecular.
- Durante a caracterização da atividade emulsificante, os biopolímeros produzidos por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 e *Bacillus* sp. E4.Cu 2 atingiram, respectivamente, índices máximos de 50,00, 66,70 e 67,05% nas concentrações de 20,0, 17,5, e  $20,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Tais índices são satisfatórios se comparados com as outras biomoléculas descritas na literatura. As substâncias poliméricas extracelulares analisadas se mostraram, assim, potencialmente utilizáveis em processos de biorremediação e em diversos setores industriais que requerem a emulsificação de compostos hidrofóbicos, uma vez que poderiam substituir tensoativos químicos com a vantagem de possuir maior compatibilidade ambiental e poder ser produzidas a partir de compostos orgânicos.
- Nos ensaios de estabilidade da atividade emulsificante em diferentes condições físico-químicas, o pH se mostrou determinante para a maioria das biomoléculas, com predominância de maiores índices em pH mais básicos. Este aumento de atividade em extremos de pH pode ser aproveitado em processos industriais que requeiram uma atividade emulsificante sob tais condições.
- A exposição das substâncias poliméricas extracelulares a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 60 min ou sua autoclavagem mostrou não influenciou os valores finais de atividade emulsificante. Tal característica é importante, pois permite que as moléculas sejam submetidas a tratamentos térmicos e ainda assim mantenham sua atividade, podendo ser aproveitadas

sobretudo na indústria de alimentos e cosméticos, que requerem a esterilização de diversos compostos.

- Já concentrações de 30% de NaCl provocaram uma redução da atividade emulsificante dos biopolímeros produzidos por *Actinomyces viscosus* E3.Pb 5, *Bacillus* sp. E3.Cd 2 de até 44,17%, enquanto o produzido por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 manteve sua atividade estável nas diferentes concentrações do sal. Apesar da redução verificada, a maior parte dos ensaios mostrou uma manutenção da atividade emulsificante ainda que com índices mais reduzidos, o que representa uma vantagem dos emulsificantes biológicos que usualmente mantêm suas propriedades em diferentes condições físico-químicas, diferentemente dos emulsificantes de origem do petróleo, usualmente comercializados. Dessa forma, as substâncias poliméricas extracelulares analisadas seriam capazes de emulsificar compostos hidrofóbicos mesmo quando aplicadas em ambientes salinos ou processos industriais com altas concentrações de sais.
- Todas as substâncias poliméricas extracelulares foram capazes de emulsificar outros compostos hidrofóbicos, dentre eles hidrocarbonetos alifáticos, cíclicos, organoclorados e óleos vegetais. Os maiores índices de emulsificação foram obtidos para os organoclorados, compostos de difícil remediação. Essa ampla gama de compostos capazes de ser emulsificados aumenta o espectro de utilização das substâncias poliméricas extracelulares testadas.
- Os ensaios de remoção de cobre e mercúrio de solução mostraram uma maior eficiência da técnica de equilíbrio de diálise em relação às emulsões simples e à utilização da camada emulsificada.
- Outros ensaios, conduzidos com a biomolécula produzida por *Bacillus* sp. E4.Cu 2 mostraram ainda, sob as condições analisadas, sua maior afinidade pelos íons mercúrio se comparada aos íons cobre. Concentrações menores do metal em solução diminuíram a quantidade de metal adsorvida por grama da biomolécula, entretanto, as taxas de remoção foram superiores. Tal propriedade indica que a utilização do biopolímero na remoção de metais em solução seria mais eficiente em ambientes contaminados com concentrações mais baixas de metais pesados.

- O mecanismo de adsorção dos metais à molécula mostrou seguir o modelo de Freundlich, em que a energia de adsorção decresce à medida que a substância polimérica extracelular vai sendo coberta pelos íons  $Hg^{2+}$  e é influenciada pela concentração do metal em solução.
- Já a caracterização bioquímica das três substâncias poliméricas analisadas mostrou uma maior porção de lipídeos, mas apresentou também a presença de grupos de carboidratos e proteínas, ainda que em menor quantidade. Tal composição pode ser responsável pelas altas atividades emulsificantes encontradas nas substâncias selecionadas.
- Os isolados se mostraram capazes de produzir biomoléculas com potencial de utilização na indústria e em processos de biorremediação que envolvam a emulsificação de compostos hidrofóbicos, a remoção de metais ou ambos os processos. Novas caracterizações devem ser feitas para otimizar os mecanismos de adsorção e adequá-los às condições de demanda, mas os resultados se destacam por serem poucos os registros de substâncias que apresentem todas as propriedades analisadas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPOR, O. B.; MUCHIE, M. Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems: Processes and applications. *International Journal of Physical Sciences*, v. 5, n. 12, p. 1807-1817, 2010.

ALI, N.; DASHTI, N.; AL-MAILEM, D.; ELIYAS, M.; RADWAN, S. Indigenous soil bacteria with the combined potential for hydrocarbon consumption and heavy metal resistance. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 19, n. 3, p. 812-820, 2012.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 114, p. 324-333, 2014.

AMIRABADI, S.; JAHANMIRI, A.; RAHIMPOUR, M. R.; NIA, B. R.; DARVISHI, P.; NIAZI, A. Investigation of *Paenibacillus alvei* ARN63 ability for biodemulsifier production: medium optimization to break heavy crude oil emulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 109, p. 244-252, 2013.

ANDERSSON, S.; DALHAMMAR, G.; LAND, C. J.; KUTTUVA RAJARAO, G. Characterization of extracellular polymeric substances from denitrifying organism *Comamonas denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 82, n. 3, p. 535-43, 2009.

ANDREAZZA, R.; PIENIZ, S.; OKEKE, B. C.; CAMARGO, F. A. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 66-74, 2011.

ANSARI, M. I.; MALIK, A. Seasonal variation of different microorganisms with nickel and cadmium in the industrial wastewater and agricultural soils. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 167, n. 1-4, p. 151-163, 2010.

BACH, H.; BERDICHEVSKY, Y.; GUTNICK, D. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 5, p. 2608-2615, 2003.

BACH, H.; GUTNICK, D. L. Engineering Bacterial Biopolymers for the Biosorption of Heavy Metals. In: YAREMA, K. J. (Editor). *Handbook of Carbohydrate Engineering*. Maryland: CRC Press, 2005, p. 507-534.

BAFANA, A.; CHAKRABARTI, T.; KRISHNAMURTHI, K. Mercuric reductase activity of multiple heavy metal-resistant *Lysinibacillus sphaericus* G1. *Journal of Basic Microbiology*, 2013.

BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K.; PATIL, M.; CHAKRABARTI, T. Heavy metal resistance in *Arthrobacter ramosus* strain G2 isolated from mercuric salt-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 177, n. 1-3, p. 481-486, 2010.

BAKER, M. G.; LALONDE, S. V.; KONHAUSER, K. O.; FOGHT, J. M. Role of extracellular polymeric substances in the surface chemical reactivity of *Hymenobacter aerophilus*, a psychrotolerant bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 1, p. 102-109, 2010.

BALDWIN, J. N.; STRICKLAND, R. H.; COX, M. F. Some properties of the beta-lactamase genes in *Staphylococcus epidermidis*. *Applied Microbiology*, v. 18, n. 4, p. 628-630, 1969.

BARKAY, T.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 6, p. 2697-2702, 1999.

BECHIRI, O.; ISMAIL, F.; ABBESSI, M.; EL HADI SAMAR, M. Stability of the emulsion (W/O): Application to the extraction of a Dawson type heteropolyanion complex in aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, v. 152, n. 3, p. 895-902, 2008.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T., JR. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiology Research*, v. 160, n. 3, p. 249-255, 2005.

BHATTACHARYA, A.; GUPTA, A. Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 20, n. 9, p. 6628-6637, 2013.

BLACKSMITH INSTITUTE; GREEN CROSS. The World's Worst Pollution Problems: Cleanup, Progress and Ongoing Challenges. Nova Iorque, 2013. Relatório. Disponível em: <http://www.worstpolluted.org/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, n. 2, p. 456-463, 2005.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, M. S. B. Substâncias Tensoativas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 8, p. 30-34, 1999.

BRIONES JR, A. M.; REICHARDT, W. Estimating microbial population counts by 'most probable number' using Microsoft Excel. *Journal of Microbiological Methods*, v. 35, n. 2, p. 157-161, 1999.

BROWER, J. B.; RYAN, R. L.; PAZIRANDEH, M. Comparison of Ion-Exchange Resins and Biosorbents for the Removal of Heavy Metals from Plating Factory Wastewater. *Environmental Science & Technology*, v. 31, n. 10, p. 2910-2914, 1997.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 45, n. 3, p. 198-207, 2000.

BUSSCHE, J. V.; SOARES, E. V. Lead induces oxidative stress and phenotypic markers of apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 2, p. 679-87, 2011.

CALVO, C.; MARTINEZ-CHECA, F.; TOLEDO, F. L.; PORCEL, J.; QUESADA, E. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 60, n. 3, p. 347-351, 2002.

CALVO, C.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GARCIA FANDINO, C.; LAGUNA, J.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 11, p. 1493-1501, 2008.

CAMACHO-CHAB, J.; GUÉZENNEC, J.; CHAN-BACAB, M.; RÍOS-LEAL, E.; SINQUIN, C.; MUÑIZ-SALAZAR, R.; DE LA ROSA-GARCÍA, S.; REYES-ESTEBANEZ, M.; ORTEGA-MORALES, B. Emulsifying Activity and Stability of a Non-Toxic Bioemulsifier Synthesized by *Microbacterium* sp. MC3B-10. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 9, p. 18959-18972, 2013.

CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. *Journal of Environmental Quality*, v. 32, n. 4, p. 1228-1233, 2003.

CAMERON, D. R.; COOPER, D. G.; NEUFELD, R. J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 6, p. 1420-1425, 1988.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; RAVAIOLI, S.; PIRINI, V.; CANGINI, I.; ARCIOLA, C. R. Exopolysaccharide production by *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with biofilm extracellular DNA. *International Journal of Artificial Organs*, v. 34, n. 9, p. 832-839, 2011.

CAPPELLO, S.; GENOVESE, M.; DELLA TORRE, C.; CRISARI, A.; HASSANSHAHIAN, M.; SANTISI, S.; CALOGERO, R.; YAKIMOV, M. M. Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS<sub>2003</sub>) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: a microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*, v. 64, n. 12, p. 2820-2828, 2012.

CAVALCA, L.; CORSINI, A.; BACHATE, S. P.; ANDREONI, V. Rhizosphere colonization and arsenic translocation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by arsenate reducing *Alcaligenes* sp. strain Dhal-L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 10, p. 1931-1940, 2013.

CÉBRON, A.; ARSENE-PLOETZE, F.; BAUDA, P.; BERTIN, P. N.; BILLARD, P.; CARAPITO, C.; DEVIN, S.; GOULHEN-CHOLLET, F.; POIREL, J.; LEYVAL, C. Rapid Impact of Phenanthrene and Arsenic on Bacterial Community Structure and Activities in Sand Batches. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 1, p. 129-144, 2014.

ÇELİK, A.; KARTAL, A. A.; AKDOĞAN, A.; KASKA, Y. Determining the heavy metal pollution in Denizli (Turkey) by using Robinio pseudo-acacia L. *Environment International*, v. 31, n. 1, p. 105-112, 2005.

CHANG, J. S.; LEE, J. H.; KIM, I. S. Bacterial aox genotype from arsenic contaminated mine to adjacent coastal sediment: evidences for potential biogeochemical arsenic oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, v. 193, p. 233-242, 2011.

CHAPADEIRO, E.; LOUREIRO, C. O.; OLIVEIRA, L. I.; OLIVEIRA, S. MORAIS, R.; LAZARIM, H. A. Estudo hidrogeológico preliminar da área de influência de depósito de estéril e de minério da Mina do Sossego. In: XIV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 2006. São Paulo.

CHATTERJEE, S.; SAU, G.; MUKHERJEE, S. Plant growth promotion by a hexavalent chromium reducing bacterial strain, *Cellulosimicrobium cellulans* KUCr3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 10, p. 1829-1836, 2009.

CHEN, J. H.; LION, L. W.; GHIORSE, W. C.; SHULER, M. L. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. *Water Research*, v. 29, n. 2, p. 421-430, 1995.

CHEN, S. C.; LIAO, C. M. Health risk assessment on human exposed to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution sources. *Science of The Total Environment*, v. 366, n. 1, p. 112-123, 2006.

CHEN, S.; ZOU, Y.; YAN, Z.; SHEN, W.; SHI, S.; ZHANG, X.; WANG, H. Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal. *Journal of Hazardous Materials*, v. 161, n. 2-3, p. 1355-1359, 2009.

CHIEN, C. C.; HAN, C. T. Tellurite resistance and reduction by a *Paenibacillus* sp. isolated from heavy metal-contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 28, n. 8, p. 1627-1632, 2009.

CHIEN, C. C.; HUANG, C. H.; LIN, Y. W. Characterization of a heavy metal translocating P-type ATPase gene from an environmental heavy metal resistance *Enterobacter* sp. isolate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, n. 6, p. 1837-1846, 2013.

CHOWDHURY, S. R.; MANNA, S.; SAHA, P.; BASAK, R. K.; SEN, R.; ROY, D.; ADHIKARI, B. Composition analysis and material characterization of an emulsifying extracellular polysaccharide (EPS) produced by *Bacillus megaterium* RB-05: a hydrodynamic sediment-attached isolate of freshwater origin. *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, n. 6, p. 1381-1393, 2011a.

CHOWDHURY, S. R.; BASAK, R. K.; SEN, R.; ADHIKARI, B. Characterization and emulsifying property of a carbohydrate polymer produced by *Bacillus pumilus* UW-02 isolated from waste water irrigated agricultural soil. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 48, n. 4, p. 705-712, 2011b.

COLIN, V. L.; CASTRO, M. F.; AMOROSO, M. J.; VILLEGAS, L. B. Production of bioemulsifiers by *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 and their potential application in remediation technologies for soils contaminated with hexavalent chromium. *Journal of Hazardous Materials*, v. 261, p. 577-583, 2013.

COLLARD, J. M.; CORBISIER, P.; DIELS, L.; DONG, Q.; JEANTHON, C.; MERGEAY, M.; TAGHAVI, S.; VAN DER LELIE, D.; WILMOTTE, A.; WUERTZ, S. Plasmids for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and applications. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 14, n. 4, p. 405-414, 1994.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two bacillus species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COOPER, D.G. Biosurfactants. *Microbiological Sciences*, v. 3, p. 145–149, 1986.

COUSO, R. O.; IELPI, L.; GARCIA, R. C.; DANKERT, M. A. Biosynthesis of polysaccharides in *Acetobacter xylinum*. Sequential synthesis of a heptasaccharide diphosphate prepol. *European Journal of Biochemistry*, v. 123, n. 3, p. 617-627, 1982.

CROSS, J. Nonionic Surfactants: Chemical Analysis. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 1987. 417 p. (Surfactant Science Series, v. 19)

DA COSTA, A. C. A.; LEITE, S. G. F. Metals biosorption by sodium alginate immobilized *Chlorella homosphaera* cells. *Biotechnology Letters*, v. 13, n. 8, p. 559-562, 1991.

DASTGHEIB, S. M. M.; AMOOZEGAR, M. A.; ELAHI, E.; ASAD, S.; BANAT, I. M. Bioemulsifier production by a halothermophilic *Bacillus* strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. *Biotechnology Letters*, v. 30, n. 2, p. 263-270, 2008.

DE PHILIPPIS, R.; COLICA, G.; MICHELETTI, E. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, n. 4, p. 697-708, 2011.

DE SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresource Technology*, v. 123, p. 256-262, 2012.

DE, J.; RAMAIAH, N.; VARDANYAN, L. Detoxification of toxic heavy metals by marine bacteria highly resistant to mercury. *Marine Biotechnology*, v. 10, p. 471-477, 2008.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DOGSA, I.; KRIECHBAUM, M.; STOPAR, D.; LAGGNER, P. Structure of bacterial extracellular polymeric substances at different pH values as determined by SAXS. *Biophysical Journal*, v. 89, n. 4, p. 2711-2720, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Analytical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUFFUS, J. H. "Heavy Metals" – A Meaningless Term?. *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

DUPONT, C. L.; GRASS, G.; RENSING, C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance-new insights and applications. *Metallomics*, v. 3, n. 11, p. 1109-1118, 2011.

EDDOUAOUA, K.; MNIF, S.; BADIS, A.; YOUNES, S. B.; CHERIF, S.; FERHAT, S.; MHIRI, N.; CHAMKHA, M.; SAYADI, S. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 408-418, 2012.

EDWARD, A.; MELCHIAS, G.; KUMAR, S. S. An Investigation on Organic solvents tolerance, Heavy metals and Antibiotics resistance of *Bacillus oleronius* from Petroleum contaminated soil. *Nature and Science*, v. 10, n. 10, p. 69-75, 2012.

EHRlich, H. L. Geomicrobiology. 3ª edição. Nova Iorque: Marcel Dekker Inc., 1996.

EHRlich, H. L. Microbes and metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 48, p. 687-692, 1997.

FARNLEITNER, A. H.; RYZINSKA-PAIER, G.; REISCHER, G. H.; BURTSCHER, M. M.; KNETSCH, S.; KIRSCHNER, A. K.; DIRNBOCK, T.; KUSCHNIG, G.; MACH, R. L.; SOMMER, R. *Escherichia coli* and enterococci are sensitive and reliable indicators for human, livestock and wildlife faecal pollution in alpine mountainous water resources. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 5, p. 1599-1608, 2010.

FEAM. Inventário de Áreas Contaminadas. Belo Horizonte, 2013a. Relatório. Disponível em: <http://www.feam.br/declaracoes-ambientais/gestao-de-areas-contaminadas/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

FEAM. Inventário de Áreas Impactadas pela Mineração do Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011. Relatório. Disponível em: <http://www.feam.br/declaracoes-ambientais/areas-impactadas-pela-mineracao/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

FEAM. Inventário de Resíduos Sólidos Industriais: Ano Base 2012. Belo Horizonte, 2013b. Relatório. Disponível em: <http://www.feam.br/declaracoes-ambientais/inventario-de-residuos-solidos-industriais/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

FLORA, S. J.; MITTAL, M.; MEHTA, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*, v. 128, n. 4, p. 501-23, 2008.

FOGHT, J. M.; GUTNICK, D. L.; WESTLAKE, D. W. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 36-42, 1989.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; RAIMONDI, C.; BESTETTI, G.; BANAT, I. M.; SMYTH, T. J.; PAPACCHINI, M.; CAVALLO, M.; FRACCHIA, L. Environmental fate, toxicity, characteristics and potential applications of novel bioemulsifiers produced by *Variovorax paradoxus* 7bCT5. *Bioresource Technology*, v. 108, p. 245-251, 2012.

FRANZETTI, A.; TAMBURINI, E.; BANAT, I. M. Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 672, p. 121-134, 2010.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.

FREITAS, D. B.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; REIS, M. P.; COSTA, P. S.; ASSIS, P. S.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. Molecular characterization of early colonizer bacteria from wastes in a steel plant. *Letters in Applied Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 241-249, 2008.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, v. 29, n. 8, p. 388-98, 2011.

FREITAS, F.; ALVES, V.; GOUVEIA, A.; PINHEIRO, C.; TORRES, C. V.; GRANDFILS, C.; REIS, M. M. Controlled Production of Exopolysaccharides from *Enterobacter* A47 as a Function of Carbon Source with Demonstration of Their Film and Emulsifying Abilities. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-17, 2013.

GADD, G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, v. 156, n. 3, p. 609-43, 2010.

GANESAN, M.; STEWART, E. J.; SZAFRANSKI, J.; SATORIUS, A. E.; YOUNGER, J. G.; SOLOMON, M. J. Molar mass, entanglement, and associations of the biofilm polysaccharide of *Staphylococcus epidermidis*. *Biomacromolecules*, v. 14, n. 5, p. 1474-1481, 2013.

GEDDIE, J. L.; SUTHERLAND, I. W. Uptake of metals by bacterial polysaccharides. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 74, n. 4, p. 467-472, 1993.

GEORGIU, G.; LIN, S. C.; SHARMA, M. M. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology (N Y)*, v. 10, n. 1, p. 60-55, 1992.

GIEDROC, D. P.; KEATING, K. M.; MARTIN, C. T.; WILLIAMS, K. R.; COLEMAN, J. E. Zinc metalloproteins involved in replication and transcription. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 28, n. 2–3, p. 155-169, 1986.

GILL, S. R.; FOUTS, D. E.; ARCHER, G. L.; MONGODIN, E. F.; DEBOY, R. T.; RAVEL, J.; PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DODSON, R. J.; DAUGHERTY, S. C.; MADUPU, R.; ANGIUOLI, S. V.; DURKIN, A. S.; HAFT, D. H.; VAMATHEVAN, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; LEE, C.; DIMITROV, G.; JIANG, L.; QIN, H.; WEIDMAN, J.; TRAN, K.; KANG, K.; HANCE, I. R.; NELSON, K. E.; FRASER, C. M. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 7, p. 2426-2438, 2005.

GLAESER, S. P.; ARUN, A. B.; REKHA, P. D.; PRABHU, S.; BUSSE, H. J.; KÄMPFER, P. *Bhargavaea ullalensis* sp. nov., isolated from coastal sand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2450-2456, 2013.

GUERRA, D. L.; AIROLDI, C.; LEMOS, V. P.; ANGÉLICA, R. S.; VIANA, R. R. Aplicação de Al-PILC na adsorção de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  utilizando modelos físico-químicos de adsorção. *Eclética Química*, v. 32, p. 51-60, 2007.

GUTIERREZ, T.; MORRIS, G.; GREEN, D. H. Yield and physicochemical properties of EPS from *Halomonas* sp. strain TG39 identifies a role for protein and anionic residues (sulfate and phosphate) in emulsification of n-hexadecane. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 1, p. 207-216, 2009.

HADDAD, N. I.; LIU, X.; YANG, S.; MU, B. Surfactin isoforms from *Bacillus subtilis* HSO121: separation and characterization. *Protein & Peptide Letters*, v. 15, n. 3, p. 265-269, 2008.

HAMADA, M.; TAMURA, T.; ISHIDA, Y.; SUZUKI, K. *Georgenia thermotolerans* sp. nov., an actinobacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 8, p. 1875-1879, 2009.

HAN, P. P.; SUN, Y.; WU, X. Y.; YUAN, Y. J.; DAI, Y. J.; JIA, S. R. Emulsifying, Flocculating, and Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by Cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013.

HARISH, R.; SAMUEL, J.; MISHRA, R.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Bio-reduction of Cr(VI) by exopolysaccharides (EPS) from indigenous bacterial species of Sukinda chromite mine, India. *Biodegradation*, v. 23, n. 4, p. 487-496, 2012.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; ROLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 173-182, 2006.

HERTH, W.; SCHNEPF, E. The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma*, v. 105, n. 1-2, p. 129-133, 1980.

HOLMES, A.; VINAYAK, A.; BENTON, C.; ESBENSHADE, A.; HEINSELMAN, C.; FRANKLAND, D.; KULKARNI, S.; KURTANICH, A.; CAGUIAT, J. Comparison of two multimetal resistant bacterial strains: *Enterobacter* sp. YSU and *Stenotrophomonas maltophilia* ORO2. *Current Microbiology*, v. 59, n. 5, p. 526-531, 2009.

HOSSAIN, S. T.; MALLICK, I.; MUKHERJEE, S. K. Cadmium toxicity in *Escherichia coli*: Cell morphology, Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 86, n. 0, p. 54-59, 2012.

HOU, W.; MA, Z.; SUN, L.; HAN, M.; LU, J.; LI, Z.; MOHAMAD, O. A.; WEI, G. Extracellular polymeric substances from copper-tolerance *Sinorhizobium meliloti* immobilize  $\text{Cu}^{2+}$ . *Journal of Hazardous Materials*, v. 261, p. 614-620, 2013.

HU, T.; GE, J. P.; XU, R. R.; YUE, S. L.; TAN, H.; ZHOU, X. D. On the relationship between exopolysaccharides and *Actinomyces viscosus* in biofilms. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v. 37, n. 2, p. 180-182, 2006.

HUA, X.; WU, Z.; ZHANG, H.; LU, D.; WANG, M.; LIU, Y.; LIU, Z. Degradation of hexadecane by *Enterobacter cloacae* strain TU that secretes an exopolysaccharide as a bioemulsifier. *Chemosphere*, v. 80, n. 8, p. 951-956, 2010.

HUANG, F.; DANG, Z.; GUO, C. L.; LU, G. N.; GU, R. R.; LIU, H. J.; ZHANG, H. Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 107, p. 11-18, 2013.

HUANG, J.; YUAN, L.; SUN, Z. Screening and identification of a strain with lipolytic activity against Jatropha oil and its catalytic capacity. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v. 51, n. 4, p. 488-494, 2011.

HUANG, K. H.; CHEN, B. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. Optimization of exopolysaccharide production and diesel oil emulsifying properties in root nodulating bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 1367-1373, 2012.

HUANG, W. M. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annual Review of Genetics*, v. 30, p. 79-107, 1996.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine *Enterobacter cloacae*. *Marine Pollution Bulletin*, v. 49, n. 11-12, p. 974-977, 2004.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin*, v. 50, n. 3, p. 340-343, 2005.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, n. 1-2, p. 220-222, 2006.

JANSSON, P. E.; LINDBERG, J.; WIMALASIRI, K. M.; DANKERT, M. A. Structural studies of acetan, an exopolysaccharide elaborated by *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Research*, v. 245, n. 2, p. 303-310, 1993.

JIAO, Y.; CODY, G. D.; HARDING, A. K.; WILMES, P.; SCHRENK, M.; WHEELER, K. E.; BANFIELD, J. F.; THELEN, M. P. Characterization of extracellular polymeric substances from acidophilic microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 9, p. 2916-2922, 2010.

JING, X. B.; HE, N.; ZHANG, Y.; CAO, Y. R.; XU, H. Isolation and characterization of heavy-metal-mobilizing bacteria from contaminated soils and their potential in promoting Pb, Cu, and Cd accumulation by *Coprinus comatus*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 58, n. 1, p. 45-53, 2012.

KÄMPFER, P.; ARUN, A. B.; BUSSE, H. J.; LANGER, S.; YOUNG, C. C.; CHEN, W. M.; SCHUMANN, P.; SYED, A. A.; REKHA, P. D. *Georgenia soli* sp. nov., isolated from iron-ore-contaminated soil in India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, n. 5, p. 1027-1030, 2010.

KÄMPFER, P.; LODDERS, N.; WARFOLOMEOW, I.; BUSSE, H. J. *Tessaracoccus lubricantis* sp. nov., isolated from a metalworking fluid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 6, p. 1545-1549, 2009.

KANMANI, P.; SUGANYA, K.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PATTUKUMAR, V.; PAARI, K. A.; ARUL, V. Synthesis and functional characterization of antibiofilm exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of fish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, n. 3, p. 1001-1015, 2013.

KAUR, S.; KAMLI, M. R.; ALI, A. Role of arsenic and its resistance in nature. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 57, n. 10, p. 769-774, 2011.

KAZY, S.; SAR, P.; SINGH, S. P.; SEN, A.; D'SOUZA, S. F. Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 18, n. 6, p. 583-588, 2002.

KHAN, N.; MISHRA, A.; CHAUHAN, P. S.; SHARMA, Y. K.; NAUTIYAL, C. S. *Paenibacillus lentimorbus* enhances growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium-amended soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 101, n. 2, p. 453-459, 2012.

KRÜSS. Surface Tension: CMC Measurement. Disponível em: <http://www.kruss.de/en/theory/measurements/surface-tension/cmc-measurement.html>. Acesso em: 28 de outubro de 2011.

KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 79, n. 6, p. 617-21, 2007.

KUZMA, M.; CLACK, B.; EDWARDS, J.; TYLINGO, R.; SAMASZKO, J.; MADAJ, J. Structure and properties of the exopolysaccharides produced by *Pseudomonas mutabilis* T6 and *P. mutabilis* ATCC 31014. *Carbohydrate Research*, v. 348, p. 84-90, 2012.

LA DUC, M. T.; SATOMI, M.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. gyrB as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, n. 3, p. 383-394, 2004.

LANGLEY, S.; BEVERIDGE, T. J. Metal binding by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is influenced by growth of the cells as a biofilm. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, n. 7, p. 616-622, 1999.

LAPLACE, J. M.; HARTKE, A.; GIARD, J. C.; AUFRAY, Y. Cloning, characterization and expression of an *Enterococcus faecalis* gene responsive to heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 6, p. 685-689, 2000.

LEIVERS, S.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; ROBINSON, G.; MARGOLLES, A.; RUAS-MADIEDO, P.; LAWS, A. P. Structure of the high molecular weight exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA-R1 and sequence analysis of its putative eps cluster. *Carbohydrate Research*, v. 346, n. 17, p. 2710-2717, 2011.

LENART, A.; WOLNY-KOLADKA, K. The effect of heavy metal concentration and soil pH on the abundance of selected microbial groups within ArcelorMittal Poland steelworks in Cracow. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 90, n. 1, p. 85-90, 2013.

LI, O.; LU, C.; LIU, A.; ZHU, L.; WANG, P.-M.; QIAN, C.-D.; JIANG, X.-H.; WU, X.-C. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. *Bioresource Technology*, v. 134, p. 87-93, 2013.

LIMA, T. M.; PROCOPIO, L. C.; BRANDAO, F. D.; CARVALHO, A. M.; TOTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Simultaneous phenanthrene and cadmium removal from contaminated soil by a ligand/biosurfactant solution. *Biodegradation*, v. 22, n. 5, p. 1007-1015, 2011.

LIU, H.; FANG, H. H. P. Characterization of Electrostatic Binding Sites of Extracellular Polymers by Linear Programming Analysis of Titration Data. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 80, n. 7, p. 806-811, 2002b.

LIU, H.; FANG, H. H. P. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*, v. 95, p. 249-256, 2002a.

LIU, H.; SONG, Y.; CHEN, F.; ZHENG, S.; WANG, G. *Lysinibacillus manganicus* sp. nov., isolated from manganese mining soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, n. 10, p. 3568-3573, 2013a.

LIU, J. F.; WU, G.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Structural characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain FIN2 isolated from oil reservoir water. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013b.

LIU, Y. Q.; LIU, Y.; TAY, J.-H. The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, n. 2, p. 143-148, 2004.

LLAMAS, I.; MATA, J. A.; TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M. C.; QUESADA, E.; BEJAR, V. Characterization of the exopolysaccharide produced by *Salipiger mucosus* A3, a halophilic species belonging to the Alphaproteobacteria, isolated on the Spanish Mediterranean seaboard. *Marine Drugs*, v. 8, n. 8, p. 2240-2251, 2010.

LLOYD, J. R. Bioremediation of metals; the application of microorganisms that make and break minerals. *Microbiology Today*, v. 29, p. 67-69, 2002.

LLOYD, J. R.; LOVLEY, D. R. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 248-53, 2001.

LOGAN, N. A.; LEBBE, L.; VERHELST, A.; GORIS, J.; FORSYTH, G.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; HEYNDRICKX, M.; DE VOS, P. *Bacillus shackletonii* sp. nov., from volcanic soil on Candlemas Island, South Sandwich archipelago. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 373-376, 2004.

LOZANO, L. C.; DUSSAN, J. Metal tolerance and larvicidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 8, p. 1383-1389, 2013.

MACK, D.; FISCHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 1, p. 175-183, 1996.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 58, n. 4, p. 428-34, 2002.

MANIYAR, J. P.; DOSHI, D. V.; BHUYAN, S. S.; MUJUMDAR, S. S. Bioemulsifier production by *Streptomyces* sp. S22 isolated from garden soil. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 49, n. 4, p. 293-297, 2011.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; DYMOCK, D.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; DE FRANCESCHI DE ANGELIS, D.; PIROLLO, M. P.; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 133-142, 2008.

MARKOWICZ, A.; PLOCINICZAK, T.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Response of Bacteria to Heavy Metals Measured as Changes in FAME Profiles. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 19, n. 5, p. 957-965, 2010.

MARTINEZ, J. L.; SANCHEZ, M. B.; MARTINEZ-SOLANO, L.; HERNANDEZ, A.; GARMENDIA, L.; FAJARDO, A.; ALVAREZ-ORTEGA, C. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 33, n. 2, p. 430-49, 2009.

MARTINEZ-CHECA, F.; TOLEDO, F. L.; EL MABROUKI, K.; QUESADA, E.; CALVO, C. Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 16, p. 3130-3135, 2007.

MARVASI, M.; VISSCHER, P. T.; CASILLAS MARTINEZ, L. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 313, n. 1, p. 1-9, 2010.

MATA, J. A.; BEJAR, V.; BRESSOLLIER, P.; TALLON, R.; URDACI, M. C.; QUESADA, E.; LLAMAS, I. Characterization of exopolysaccharides produced by three moderately halophilic bacteria belonging to the family Alteromonadaceae. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 2, p. 521-528, 2008.

MATYAR, F. Antibiotic and heavy metal resistance in bacteria isolated from the Eastern Mediterranean Sea coast. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 89, n. 3, p. 551-556, 2012.

MCDEVITT, C. A.; OGUNNIYI, A. D.; VALKOV, E.; LAWRENCE, M. C.; KOBE, B.; MCEWAN, A. G.; PATON, J. C. A Molecular Mechanism for Bacterial Susceptibility to Zinc. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 11, p. e1002357, 2011.

MCENTEE, J. D.; WOODROW, J. R.; QUIRK, A. V. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp.. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 515-520, 1986.

MERROUN, M.; HENNIG, C.; ROSSBERG, A.; REICH, R.; SELENSKA-POBELL, S. Characterization of U (VI)-*Acidithiobacillus ferrooxidans* complexes using EXAFS, transmission electron microscopy, and energy-dispersive X-ray analysis. *Radiochimica Acta*, v. 91, p. 583-591, 2003.

MOKADDEM, H.; SADAOU, Z.; BOUKHELATA, N.; AZOUAOU, N.; KACI, Y. Removal of Cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, n. 2-3, p. 1150-1155, 2009.

MONDRAGÓN, V. A.; LLAMAS-PEREZ, D. F.; GONZALEZ-GUZMAN, G. E.; MARQUEZ-GONZALEZ, A. R.; PADILLA-NORIEGA, R.; DURAN-AVELAR MDE, J.; FRANCO, B. Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 183, n. 1-4, p. 329-340, 2011.

MORILLO, J. A.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SANCHEZ, M. Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. *Current Microbiology*, v. 53, n. 3, p. 189-193, 2006.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Removal of Heavy Metals from Contaminated Soil and Sediments Using the Biosurfactant Surfactin. *Journal of Soil Contamination*, v. 8, n. 2, p. 231-254, 1999.

MYKYTCZUK, N. C. S.; TREVORS, J. T.; FERRONI, G. D.; LEDUC, L. G. Cytoplasmic membrane response to copper and nickel in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiological Research*, v. 166, n. 3, p. 186-206, 2011.

NAEEM, A.; BATOOL, R.; JAMIL, N. Cr(VI) reduction by *Cellulosimicrobium* sp. isolated from tannery effluent. *Turkish Journal of Biology*, v. 37, n. 3, p. 315-322, 2013.

NAGORSKA, K.; OSTROWSKI, A.; HINC, K.; HOLLAND, I. B.; OBUCHOWSKI, M. Importance of eps genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *Journal Applied Genetics*, v. 51, n. 3, p. 369-381, 2010.

NAIK, M. M.; PANDEY, A.; DUBEY, S. K. Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. *Biodegradation*, v. 23, n. 5, p. 775-783, 2012.

NAIK, U. C.; SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I. S. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* IST105 from electroplating effluent for detoxification of hexavalent chromium. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 19, n. 7, p. 3005-14, 2011.

NAVON-VENEZIA, S.; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 9, p. 3240-4, 1995.

NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological Reviews*, v. 60, n. 1, p. 151-166, 1996.

NI, B. J.; FANG, F.; XIE, W. M.; SUN, M.; SHENG, G. P.; LI, W. H.; YU, H. Q. Characterization of extracellular polymeric substances produced by mixed microorganisms in activated sludge with gel-permeating chromatography, excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy measurement and kinetic modeling. *Water Research*, v. 43, n. 5, p. 1350-1358, 2009.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 2-3, p. 313-339, 2003.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, n. 6, p. 730-50, 1999.

NISHIMURA, Y.; INO, T.; IIZUKA, H. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 38, n. 2, p. 209-211, 1988.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002.

O'NEILL B.; GROSSMAN, J.; TSAI, M. T.; GOMES, J. E.; LEHMANN, J.; PETERSON, J.; NEVES, E.; THIES, J. E. Bacterial Community Composition in Brazilian Anthrosols and Adjacent Soils Characterized Using Culturing and Molecular Identification. *Microbial Ecology*, v. 58, p. 23-35, 2009.

OCHOA-HERRERA, V.; LEON, G.; BANIHANI, Q.; FIELD, J. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Science of the Total Environment*, v. 412-413, p. 380-5, 2011.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. Public Health and Environment (PHE): Percentage of deaths and DALYs attributable to the environment, 2004 deaths. Disponível em: <http://www.who.int/gho/phe/en/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

OYETIBO, G. O.; ILORI, M. O.; ADEBUSOYE, S. A.; OBAYORI, O. S.; AMUND, O. O. Bacteria with dual resistance to elevated concentrations of heavy metals and antibiotics in Nigerian contaminated systems. *Environmental and Monitoring Assessment*, v. 168, n. 1-4, p. 305-314, 2010.

PAL, A.; PAUL, A. K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 49-64, 2008.

PANDEY, S.; GHOSH, P. K.; GHOSH, S.; DE, T. K.; MAITI, T. K. Role of heavy metal resistant *Ochrobactrum* sp. and *Bacillus* spp. strains in bioremediation of a rice cultivar and their PGPR like activities. *Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 11-17, 2013.

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, n. 1, p. 86-102, 2010.

PATIL, J. R.; CHOPADE, B. A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 2, p. 290-298, 2001.

PATON, A. M. The role of *Pseudomonas* in Plant Disease. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 23, n. 3, p. 526-532, 1960.

PEPI, M.; LOBIANCO, A.; RENZI, M.; PERRA, G.; BERNARDINI, E.; MARVASI, M.; GASPERINI, S.; VOLTERRANI, M.; FRANCHI, E.; HEIPIEPER, H. J.; FOCARDI, S. E. Two naphthalene degrading bacteria belonging to the genera *Paenibacillus* and *Pseudomonas*

isolated from a highly polluted lagoon perform different sensitivities to the organic and heavy metal contaminants. *Extremophiles*, v. 13, n. 5, p. 839-848, 2009.

PÉREZ, J. A. M.; GARCÍA-RIBERA, R.; QUESADA, T.; AGUILERA, M.; RAMOS-CORMENZANA, A.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 11, p. 2699-2704, 2008.

PIOLA, R. F.; JOHNSTON, E. L. Pollution reduces native diversity and increases invader dominance in marine hard-substrate communities. *Diversity and Distributions*, v. 14, n. 2, p. 329-342, 2008.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 151-156, 1989.

PODLESEK, Z.; HERZOG, B.; AMBROZIC, J. Inducible resistance to zinc ions in *Bacillus subtilis* 168. *FEMS Microbiology Letters*, v. 113, n. 2, p. 201-203, 1993.

PRADO-ACOSTA, M.; VALDMAN, E.; LEITE, S. G. F.; BATTAGLINI, F.; RUZAL, S. M. Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and their Exopolysaccharide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. 6-7, p. 1157-1163, 2005.

PROCOPIO, L.; DE CASSIA PEREIRA, E. S. M.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Transcriptional profiling of genes involved in n-hexadecane compounds assimilation in the hydrocarbon degrading *Dietzia cinnamea* P4 strain. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 633-641, 2013.

PRÜSS-ÜSTÜN, A.; CORVALÁN, C. Preventing disease through healthy environments: Towards an estimate of the environmental burden of disease. Geneva: Organização Mundial da Saúde, 2006. 105 p. Disponível em: <http://www.who.int/>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

QI, Y.; PATRA, G.; LIANG, X.; WILLIAMS, L. E.; ROSE, S.; REDKAR, R. J.; DELVECCHIO, V. G. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 8, p. 3720-3727, 2001.

QUINTELAS, C.; DA SILVA, V. B.; SILVA, B.; FIGUEIREDO, H.; TAVARES, T. Optimization of production of extracellular polymeric substances by *Arthrobacter viscosus* and their interaction with a 13X zeolite for the biosorption of Cr(VI). *Environmental Technology*, v. 32, n. 13-14, p. 1541-1549, 2011.

REMACLE, J.; VERCHEVAL, C. A zinc-binding protein in a metal-resistant strain, *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 875-877, 1991.

ROBINSON, J. B.; TUOVINEN, O. H. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiology Reviews*, v. 48, n. 2, p. 95-124, 1984.

RODRIGUES, J. L.; PELLIZARI, V. H.; MUELLER, R.; BAEK, K.; JESUS EDA, C.; PAULA, F. S.; MIRZA, B.; HAMAOU, G. S., JR.; TSAI, S. M.; FEIGL, B.; TIEDJE, J. M.; BOHANNAN, B. J.; NUSSLEIN, K. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CARVALHO, J. C. M. D.; LODI, A.; FINOCCHIO, E.; CONVERTI, A. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: Multi-metal systems. *Journal of Hazardous Materials*, v. 217-218, p. 246-255, 2012.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 3, p. 249-252, 2002.

RUANGSOMBOON, S.; CHIDTHAISONG, A.; BUNNAG, B.; INTHORN, D.; HARVEY, N. W. Lead (Pb<sup>2+</sup>) adsorption characteristics and sugar composition of capsular polysaccharides of cyanobacterium *Calothrix marchica*. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, v. 29, n. 2, p. 529-541, 2007.

RUGGERI, C.; FRANZETTI, A.; BESTETTI, G.; CAREDDA, P.; LA COLLA, P.; PINTUS, M.; SERGI, S.; TAMBURINI, E. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, n. 7, p. 936-942, 2009.

SALAGER, J. L. Surfactants: Types and Uses. Mérida: Laboratório FIRP – ULA, 1999. 49 p.  
SALEHIZADEH, H.; SHOJAOSADATI, S. A. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. *Water Research*, v. 37, n. 17, p. 4231-4235, 2003.

SÁNCHEZ-PEINADO, M.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; RODELAS, B.; GALERA, V.; POZO, C.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V. Effect of linear alkylbenzene sulfonates on the growth of aerobic heterotrophic cultivable bacteria isolated from an agricultural soil. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 6, p. 549-557, 2008.

SANTOS, R. P.; ARRUDA, T. T.; CARVALHO, C. B.; CARNEIRO, V. A.; BRAGA, L. Q.; TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V.; CAVADA, B. S.; HAVT, A.; DE OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; FREIRE, V. N. Correlation between *Enterococcus faecalis* biofilms development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. *Microscopy and Microanalyses*, v. 14, n. 2, p. 150-158, 2008.

SATOMI, M.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 56, n. 8, p. 1735-1740, 2006.

SCHELDEMAN, P.; RODRIGUEZ-DIAZ, M.; GORIS, J.; PIL, A.; DE CLERCK, E.; HERMAN, L.; DE VOS, P.; LOGAN, N. A.; HEYNDRIKX, M. *Bacillus farraginis* sp. nov., *Bacillus fortis* sp. nov. and *Bacillus fordii* sp. nov., isolated at dairy farms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, n. 4, p. 1355-1364, 2004.

SCHITO, A. M.; PIATTI, G.; STAUDER, M.; BISIO, A.; GIACOMELLI, E.; ROMUSSI, G.; PRUZZO, C. Effects of demethylfructuline A and fructuline A from *Salvia corrugata* Vahl. on biofilm production in vitro by multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n. 2, p. 129-134, 2011.

SCOTT, J. A.; PALMER, S. J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 33, n. 2, p. 221-225, 1990.

SCOTT, J. A.; SAGE, G. K.; PALMER, S. J. Metal immobilization by microbial capsular coatings. *Biorecovery*, v. 1, n. 1, p. 51-58, 1988.

SENCHENKOVA, S. N.; KNIREL, Y. A.; LIKHOSHERSTOV, L. M.; SHASHKOV, A. S.; SHIBAEV, V. N.; STARUKHINA, L. A.; DERYABIN, V. V. Structure of simusan, a new acidic exopolysaccharide from *Arthrobacter* sp.. *Carbohydrate Research*, v. 266, n. 1, p. 103-113, 1995.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 489-493, 2006.

SHARMA, B. R.; NARESH, L.; DHULDHOYA, N. C.; MERCHANT, S. U.; MERCHANT, U. C. Xanthan Gum - A Boon to Food Industry. *Food Promotion Chronicle*, v. 1, n. 5, p. 27-30, 2006.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 882-894, 2010.

SHOHAM, Y.; ROSENBERG, M.; ROSENBERG, E. Bacterial degradation of emulsan. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, n. 3, p. 573-579, 1983.

SHUHONG, Y.; MEIPING, Z.; HONG, Y.; HAN, W.; SHAN, X.; YAN, L.; JIHUI, W. Biosorption of Cu(2+), Pb(2+) and Cr(6+) by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydrate Polymers*, v. 101, p. 50-56, 2014.

SILVA-DIAS-FILHO, J. M.; JESUS-CHOQUE-FERNANDEZ, O.; FARO-DA-SILVA, S.; GUIMARÃES-CASSEB, E. Identificação de Fases e Texturas do ROM e Produtos de Beneficiamento da Minas de Sossego, Carajás - Implicações Metalúrgicas. In: IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, 2009. Belém.

SILVER, S. Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene*, v. 179, n. 1, p. 9-19, 1996.

SILVER, S.; PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology*, v. 50, p. 753-89, 1996.

SINGH, A. K.; CAMEOTRA, S. S. Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research International*, v. 20, n. 10, p. 7367-7376, 2013.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, n. 1, p. 99-121, 2007.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 319, n. 2, p. 291-297, 2004.

SINHA, A.; KHARE, S. K. Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation*, v. 23, n. 1, p. 25-34, 2012.

SKILLMAN, L. C.; SUTHERLAND, I. W.; JONES, M. V. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *Journal of Applied Microbiology*, v. 85, p. 13-18, 1998.

SOLIOZ, M. Bacterial Copper Transport. In: WINKELMANN, G. (Ed). *Microbial Transport Systems*. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. p. 361-376.

SONG, W.; PAN, X.; MU, S.; ZHANG, D.; YANG, X.; LEE, D.-J. Biosorption of Hg(II) onto goethite with extracellular polymeric substances. *Bioresource Technology*, 2013.

SOUZA, D. M. D.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

SRIRAM, M. I.; KALISHWARALAL, K.; DEEPAK, V.; GRACEROPAT, R.; SRISAKTHI, K.; GURUNATHAN, S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 85, n. 2, p. 174-181, 2011.

STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Nova Iorque: John Wiley Professio, 1991. 370 p.

STANDING, T. A.; DU PLESSIS, E.; DUVENAGE, S.; KORSTEN, L. Internalisation potential of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in lettuce seedlings and mature plants. *Journal of Water Health*, v. 11, n. 2, p. 210-223, 2013.

STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION ADMINISTRATION; THE WORLD BANK. Cost of Pollution in China: Economic Estimates of Physical Damages. Washington, 2007. Relatório. Disponível em: <http://www.worldbank.org/eapenvironment>. Acesso em: 28 de dezembro de 2013.

SU, W. T.; CHEN, W. J.; LIN, Y. F. Optimizing emulsan production of *A. venetianus* RAG-1 using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, n. 2, p. 271-279, 2009.

SUNDAR, K.; MUKHERJEE, A.; SADIQ, M.; CHANDRASEKARAN, N. Cr (III) bioremoval capacities of indigenous and adapted bacterial strains from Palar river basin. *Journal of Hazardous Materials*, v. 187, n. 1-3, p. 553-561, 2011.

SUTHAR, H.; HINGURAO, K.; DESAI, A.; NERURKAR, A. Evaluation of bioemulsifier mediated Microbial Enhanced Oil Recovery using sand pack column. *Journal of Microbiological Methods*, v. 75, n. 2, p. 225-230, 2008.

SUTHERLAND, I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, v. 147, n. 1, p. 3-9, 2001.

TEITZEL, G. M.; PARSEK, M. R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 4, p. 2313-2320, 2003.

TOLEDO, F. L.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; CALVO, C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 17, p. 8470-8475, 2008.

TOREN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 1102-1106, 2001.

TOW, L. A.; COWAN, D. A. Dissemination and survival of non-indigenous bacterial genomes in pristine Antarctic environments. *Extremophiles*, v. 9, n. 5, p. 385-389, 2005.

TRUYENS, S.; WEYENS, N.; CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J. Changes in the population of seed bacteria of transgenerationally Cd-exposed *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology (Stuttgart)*, v. 15, n. 6, p. 971-981, 2013.

UG, A.; CEYLAN, O. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp.. *Archives of Medical Research*, v. 34, n. 2, p. 130-136, 2003.

VALE S.A. Relatório de Produção 4T12. 2013. Disponível em: <<http://www.vale.com/brasil/PT/investors/annual-reports/>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2013.

VAN CALSTEREN, M. R.; PAU-ROBLOT, C.; BEGIN, A.; ROY, D. Structure determination of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains RW-9595M and R. *Biochemical Journal*, v. 363, n. 1, p. 7-17, 2002.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 24, n. 6, p. 604-620, 2006.

VAN HULLEBUSCH, E.; ZANDVOORT, M.; LENS, P. L. Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 9-33, 2003.

VIÑARTA, S. C.; FRANÇOIS, N. J.; DARAIO, M. E.; FIGUEROA, L. I.; FARINA, J. I. *Sclerotium rolfsii* scleroglucan: the promising behavior of a natural polysaccharide as a drug delivery vehicle, suspension stabilizer and emulsifier. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, n. 3, p. 314-323, 2007.

VIRAMONTES-RAMOS, S.; CRISTINA PORTILLO-RUIZ, M.; BALLINAS-CASARRUBIAS MDE, L.; TORRES-MUNOZ, J. V.; RIVERA-CHAVIRA, B. E.; NEVAREZ-MOORILLON, G. V. Selection of biosurfactan/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 3, p. 668-675, 2010.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 195-226, 2009.

WANG, J.; FENG, X.; ANDERSON, C. W. N.; XING, Y.; SHANG, L. Remediation of mercury contaminated sites – A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 221–222, n. 0, p. 1-18, 2012.

WANG, R.; KHAN, B. A.; CHEUNG, G. Y.; BACH, T. H.; JAMESON-LEE, M.; KONG, K. F.; QUECK, S. Y.; OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 1, p. 238-248, 2011.

WANG, W.; DENG, Z.; TAN, H.; CAO, L. Effects of Cd, Pb, Zn, Cu-resistant endophytic *Enterobacter* sr CBSB1 and *Rhodotorula* sp. CBSB79 on the growth and phytoextraction of *Brassica* plants in multimetal contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, v. 15, n. 5, p. 488-497, 2013.

WANG, Y. T.; SHEN, H. Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 159-163, 1995.

WEAST, R. C. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 64<sup>a</sup> edição. Boca Raton: CRC, 1984.

WINGENDER, J.; NEU, T. R.; FLEMMING, H. C. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function. 1a edição. Berlim: Springer, 1999. 232 p.

WONG, P. K.; KWOK, S. C. Accumulation of nickel ion (Ni<sup>2+</sup>) by immobilized cells of *Enterobacter* species. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 7, p. 629-634, 1992.

WOOD, J. M.; WANG, H. K. Microbial resistance to heavy metals. *Environmental Science and Technology*, v. 17, n. 12, p. 582A-90A, 1983.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, v. 2011, p. 20, 2011.

XUE, Z.; HESSLER, C. M.; PANMANEE, W.; HASSETT, D. J.; SEO, Y. *Pseudomonas aeruginosa* inactivation mechanism is affected by capsular extracellular polymeric substances reactivity with chlorine and monochloramine. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 83, n. 1, p. 101-111, 2013.

YADAV, K. K.; MANDAL, A. K.; CHAKRABORTY, R. Copper susceptibility in *Acinetobacter junii* BB1A is related to the production of extracellular polymeric substances. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 104, n. 2, p. 261-269, 2013.

YADAV, K. K.; MANDAL, A. K.; SEN, I. K.; CHAKRABORTI, S.; ISLAM, S. S.; CHAKRABORTY, R. Flocculating property of extracellular polymeric substances produced by a biofilm-forming bacterium *Acinetobacter junii* BB1A. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, n. 6, p. 1621-1634, 2012.

YAMANE, K.; NAMBU, T.; YAMANAKA, T.; ISHIHARA, K.; TATAMI, T.; MASHIMO, C.; WALKER, C. B.; LEUNG, K. P.; FUKUSHIMA, H. Pathogenicity of exopolysaccharide-producing *Actinomyces oris* isolated from an apical abscess lesion. *International Endodontic Journal*, v. 46, n. 2, p. 145-154, 2013.

YIM, J. H.; AHN, S. H.; KIM, S. J.; LEE, Y. K.; PARK, K. J.; LEE, H. K. Production of Novel Exopolysaccharide with Emulsifying Ability from Marine Microorganism, *Alteromonas* sp. Strain 00SS11568. *Key Engineering Materials*, v. 277-279, p. 155-161, 2005.

ZAIDI, A.; WANI, P. A.; KHAN, M. S. Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation. Nova Iorque: Springer, 2012. 248 p.

ZAJIC, J. E.; GUIGNARD, H.; GERSON, D. F. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 19, n. 9, p. 1303-1320, 1977.

ZAMIL, S. S.; CHOI, M. H.; SONG, J. H.; PARK, H.; XU, J.; CHI, K. W.; YOON, S. C. Enhanced biosorption of mercury(II) and cadmium(II) by cold-induced hydrophobic exobiopolymer secreted from the psychrotroph *Pseudomonas fluorescens* BM07. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 3, p. 531-544, 2008.

ZHANG, D.; LEE, D.-J.; PAN, X. Desorption of Hg(II) and Sb(V) on extracellular polymeric substances: Effects of pH, EDTA, Ca(II) and temperature shocks. *Bioresource Technology*, v. 128, p. 711-715, 2013.

ZHANG, D.; WANG, J.; PAN, X. Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v. 138, n. 3, p. 589-593, 2006.

ZHANG, J.; LEE, S.-H.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. Surface properties of emulsan-analogs. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 74, n. 8, p. 759-765, 1999.

ZHANG, Y. X.; WANG, J.; CHAI, T. Y.; ZHANG, Q.; LIU, J. G.; LI, X.; BAI, Z. Q.; SU, Z. J. Mechanism of heavy-metal tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* ZGKD2. *Huan Jing Ke Xue*, v. 33, n. 10, p. 3613-3619, 2012.

ZHENG, C.; HE, J.; WANG, Y.; WANG, M.; HUANG, Z. Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 19, p. 9155-9161, 2011.

ZOSIM, Z.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Uranium binding by emulsan and emulsanosols. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 7, p. 1725-1735, 1983.

## 8. APÊNDICES

Apêndice 1: Descrição morfológica das colônias e suas respectivas culturas de enriquecimento, densidade bacteriana (UFC mL<sup>-1</sup>) e resultado dos testes de produção de exopolissacarídeos em meio Vermelho Congo e Calcoflúor.

Enriquecimento	Morfotipo	Descrição	Morfologia	Densidade (UFC mL <sup>-1</sup> )	Produção de Exopolissacarídeos	
					Vermelho Congo	Calcoflúor
E1.Pb	1	bege, plana, translúcida, borda regular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	2,80.10 <sup>5</sup>	+	+
	<b>Total</b>			2,80.10 <sup>5</sup>		
E1.Zn	1	branca, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	bacilos longos Gram +	3,60.10 <sup>5</sup>	+	+
	<b>Total</b>			3,60.10 <sup>5</sup>		
E2.Pb	1	branca, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	cocobacilos Gram -	2,00.10 <sup>5</sup>	+	+
	2	branca, convexa, borda irregular translúcida, centro opaco	bacilos Gram +	2,06.10 <sup>7</sup>	+	+
	3	bege, plana, translúcida, borda regular, centro saliente	diplobacilos Gram -	2,05.10 <sup>7</sup>	+	+
	<b>Total</b>			4,13.10 <sup>7</sup>		
	4	laranja, plana, opaca, disforme, centro saliente, exsudado amarelo	bacilos Gram -	-	-	+
E2.As	1	bege, convexa, opaca, borda regular, centro alaranjado	bacilos Gram -	6,00.10 <sup>6</sup>	-	-
	<b>Total</b>			6,00.10 <sup>6</sup>		
	2	rósea, convexa, opaca, puntiforme	cocos Gram +	-	+	+
	3	branca, plana, opaca, borda regular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	-	-	+
	4	bege, plana, translúcida, borda regular, centro saliente alaranjando	bacilos Gram -	-	-	+
	5	branca, côncava, opaca, borda regular	estreptobacilos Gram +	-	-	+
E2.Cd	6	bege, plana, opaca, borda irregular	bacilos Gram -	-	-	-
	1	bege, convexa, opaca, borda regular	cocobacilos Gram +	2,99.10 <sup>6</sup>	+	-

	2	branca, plana, opaca, borda regular, textura na superfície	estreptobacilos Gram +	$2,00.10^4$	-	+
	<b>Total</b>			$3,01.10^6$		
	3	bege, convexa, opaca, borda regular, centro saliente	cocos Gram +	-	+	+
	4	branca, convexa, opaca, borda regular, centro saliente	cocos Gram +	-	+	-
<b>E2.Cu</b>	1	bege, plana, opaca, borda irregular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	$4,70.10^2$	+	+
	2	branca, plana, opaca, borda irregular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	$1,40.10^2$	-	+
	<b>Total</b>			$6,10.10^2$		
<b>E2.Zn</b>	1	bege, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	$1,01.10^7$	-	+
	<b>Total</b>			$1,01.10^7$		
	2	branca, plana, opaca, borda irregular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	-	-	+
<b>E3.Pb</b>	1	laranja, plana, opaca, borda regular, centro mais escuro	cocos Gram +	$2,88.10^7$	-	-
	2	amarelada, convexa, opaca, borda regular	cocos Gram +	$1,00.10^7$	+	+
	3	branca, convexa, translúcida, borda regular, centro saliente	cocobacilos Gram -	$3,00.10^5$	+	+
	4	branca, convexa, opaca, puntiforme	bacilos Gram -	$4,00.10^5$	+	-
	5	branca, côncava, opaca, puntiforme	bacilos Gram +	$4,00.10^5$	+	-
	6	bege, translúcida, puntiforme	bacilos Gram -	$4,00.10^5$	+	+
	<b>Total</b>			$1,01.10^7$		
	7	branca, côncava, opaca, borda regular,	bacilos longos Gram +	-	+	+
<b>E3.As</b>	1	bege, convexa, opaca, borda regular	diplococos Gram +	$6,43.10^7$	-	-
	2	bege, côncava, opaca, borda irregular, centro saliente	bacilos Gram +	$6,00.10^5$	+	+
	3	amarelada, convexa, opaca, borda regular	cocos Gram +	$1,00.10^5$	-	-
	4	bege, convexa, translúcida, borda regular, centro alaranjado	bacilos Gram -	$1,00.10^5$	-	-
	<b>Total</b>			$3,041.10^7$		

	5	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro alaranjado saliente	bacilos Gram +	-	-	-
	6	amarela, convexa, translúcida, borda irregular, centro saliente	cocos Gram +	-	-	+
	7	bege, convexa, translúcida, borda regular, centro saliente	bacilos Gram +	-	-	-
<b>E3.Cd</b>	1	bege, convexa, opaca, borda regular	bacilos Gram -	1,07.10 <sup>7</sup>	-	-
	<b>Total</b>			1,07.10 <sup>7</sup>		
	2	bege, plana, opaca, borda irregular	bacilos Gram +	-	+	-
<b>E3.Cu</b>	1	esverdeada, plana, translúcida, borda irregular, aparência molhada	bacilos Gram -	9,60.10 <sup>7</sup>	-	-
	<b>Total</b>			9,60.10 <sup>7</sup>		
<b>E3.Zn</b>	1	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro rosado	cocobacilos Gram -	1,43.10 <sup>8</sup>	-	-
	2	bege, convexa, translúcida, borda regular	cocobacilos Gram -	1,00.10 <sup>6</sup>	-	-
	3	bege, convexa, opaca, borda regular	cocobacilos Gram -	1,00.10 <sup>6</sup>	-	-
	<b>Total</b>			1,45.10 <sup>8</sup>		
	4	acastanhada, convexa, translúcida, borda irregular	bacilos Gram -	-	-	-
<b>E4.Pb</b>	1	branca, plana, opaca, borda irregular, centro amarelado	bacilos Gram +	1,50.10 <sup>7</sup>	-	-
	2	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro mais escuro	bacilos Gram +	3,00.10 <sup>7</sup>	+	+
	<b>Total</b>			4,50.10 <sup>7</sup>		
	3	branca, convexa, opaca, borda regular	bacilos Gram +	-	+	+
	4	amarelada, plana, opaca, borda irregular	bacilos Gram +	-	-	-
<b>E4.As</b>	1	bege, plana, translúcida, borda regular, centro saliente	bacilos Gram -	9,00.10 <sup>5</sup>	+	+
	2	bege, convexa, translúcida, borda regular	bacilos longos Gram +	8,80.10 <sup>6</sup>	+	-
	3	branca, convexa, opaca, borda irregular, aparência filamentosa	bacilos Gram +	5,80.10 <sup>6</sup>	-	-
	4	bege, plana, opaca, borda irregular	bacilos Gram +	9,00.10 <sup>5</sup>	-	-
	<b>Total</b>			1,64.10 <sup>7</sup>		

	5	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro alaranjado	bacilos Gram -	-	-	-
<b>E4.Cd</b>	1	bege, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	3,40.10 <sup>3</sup>	+	+
	2	branca, plana, translúcida, borda irregular, centro saliente	estreptobacilos Gram +	2,00.10 <sup>2</sup>	+	+
	<b>Total</b>			3,60.10 <sup>3</sup>		
	3	bege, convexa, translúcida, borda irregular, centro amarelo	cocos Gram +	-	+	+
	4	branca, convexa, opaca, borda irregular, centro amarelo	diplococos Gram +	-	+	+
		1	amarela, convexa, opaca, borda irregular	bacilos longos Gram -	1,66.10 <sup>4</sup>	+
<b>E4.Cu</b>	2	bege, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	bacilos Gram +	7,00.10 <sup>2</sup>	-	+
	<b>Total</b>			1,73.10 <sup>4</sup>		
	3	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro alaranjado	bacilos longos Gram -	-	-	-
	4	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro saliente	bacilos Gram -	-	+	+
<b>E4.Zn</b>	1	bege, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	bacilos Gram -	2,30.10 <sup>6</sup>	-	-
	2	branca, convexa, translúcida, borda irregular, centro alaranjado	bacilos Gram -	1,00.10 <sup>5</sup>	-	-
	<b>Total</b>			2,40.10 <sup>6</sup>		
	3	bege, plana, translúcida, borda regular, centro saliente	bacilos Gram -	-	+	+
<b>E5.Pb</b>	1	bege, convexa, translúcida, borda irregular, centro róseo	bacilos curtos Gram -	8,00.10 <sup>7</sup>	-	-
	2	branca, convexa, opaca, borda irregular	bacilos Gram -	1,00.10 <sup>7</sup>	-	-
	3	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro róseo	bacilos Gram -	2,00.10 <sup>6</sup>	-	-
	4	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro mais claro	bacilos Gram +	1,00.10 <sup>6</sup>	-	-
	5	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro mais escuro	bacilos Gram +	1,00.10 <sup>6</sup>	-	-
	<b>Total</b>			9,40.10 <sup>7</sup>		

<b>E5.As</b>	1	bege, convexa, opaca, borda irregular, centro alaranjado	bacilos Gram -	2,14.10 <sup>7</sup>	-	+
	<b>Total</b>			2,14.10 <sup>7</sup>		
	2	branca, convexa, opaca, puntiforme	cocos Gram +	-	+	+
<b>E5.Cd</b>	1	bege, convexa, translúcida, borda irregular, centro róseo	bacilos curtos Gram -	9,30.10 <sup>6</sup>	-	-
	2	branca, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	bacilos Gram +	1,00.10 <sup>5</sup>	+	+
	<b>Total</b>			9,40.10 <sup>6</sup>		
	3	rósea, côncava, translúcida, puntiforme	cocobacilos Gram -	-	-	-
<b>E5.Cu</b>	1	bege, convexa, opaca, borda regular	cocos Gram +	5,40.10 <sup>7</sup>	-	-
	<b>Total</b>			5,40.10 <sup>7</sup>		
	2	bege, convexa, opaca, borda regular, centro saliente	cocos Gram +	-	+	+
<b>E5.Zn</b>	1	bege, plana, opaca, borda irregular, centro rosado	bacilos Gram -	1,13.10 <sup>7</sup>	-	-
	2	branca, convexa, opaca, borda irregular, centro saliente	bacilos Gram +	1,00.10 <sup>5</sup>	+	+
	3	bege, convexa, opaca, borda regular	bacilos Gram -	2,00.10 <sup>5</sup>	+	-
	4	bege, plana, translúcida, borda irregular, centro saliente rosado	bacilos curtos Gram -	2,10.10 <sup>6</sup>	-	-
	<b>Total</b>			1,37.10 <sup>7</sup>		