

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RIZÓBIOS
COMO BIOEMULSIFICANTE E BIOSSORVENTE DE
COBRE E CROMO**

Cristiane Moretto

Bióloga

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RIZÓBIOS
COMO BIOEMULSIFICANTE E BIOSSORVENTE DE
COBRE E CROMO**

Cristiane Moretto

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientadora: Dra. Tereza Cristina Luque Castellane

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

2014

Moretto, Cristiane
M845p Potencial biotecnológico de rizóbios como bioemulsificante e
 biossorvente de cobre e cromo / Cristiane Moretto. – – Jaboticabal,
 2014
 xxii, 117 p. ; 28 cm

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
 Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos
 Coorientadora: Tereza Cristina Luque Castellane
 Banca examinadora: Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva,
Luciana Maria Saran, Tsai Siu Mui, Jackson A. Marcondes de Souza.
 Bibliografia

 1. Biossorção. 2. Emulsificação. 3. Metais Pesados. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 579.6:577.11

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RIZÓBIOS COMO BIOEMULSIFICANTE E BIOSORVENTE DE COBRE E CROMO

AUTORA: CRISTIANE MORETTO

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. TEREZA CRISTINA LUQUE CASTELLANE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDÔ LEMOS
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARIA DE LOURDES CORRADI CUSTODIO DA SILVA
Departamento de Física, Química e Biologia / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente

Profa. Dra. LUCIANA MARIA SARAN
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. TSAI SIU-MUI
Centro de Energia Nuclear Na Agricultura / Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP

Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 09 de junho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cristiane Moretto - nascida na cidade de Jaboticabal (SP), em 25 de setembro de 1979. Graduiu-se em Ciências Habilitação Plena em Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá, em Ribeirão Preto (SP), no ano de 2006. Estagiou no Laboratório de Fitopatologia da FCAV/UNESP Câmpus Jaboticabal (Departamento de Fitossanidade) de abril de 2002 à dezembro de 2005. Em 2009, concluiu o curso de Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio pelo Instituto Biológico. Durante esse período publicou artigos em revistas científicas e participou de eventos apresentando trabalhos na área de Controle Biológico de Plantas. Ingressou no ano de 2010 o curso de Doutorado em Microbiologia, área de concentração em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal. Desenvolvendo sua tese junto ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da UNESP/FCAV, atuando na área de Biotecnologia através da utilização dos microrganismos para recuperação de áreas contaminadas por óleos e metais pesados.

“É certo que não passo de um viajante, um peregrino nesta terra. Mas o Planeta Terra transcende, transgride o tempo e espaço, e esta morada sagrada não deve ser sacrificada pela ilusão de meus interesses.”

Autor Desconhecido

MEUS PAIS

MARIA APARECIDA e JOSÉ AVELINO – obrigada pela oportunidade de mais uma vez poder frequentar a escola da vida, pelo amor e todos os ensinamentos. Mãe, sempre estive ao meu lado, incentivando, demonstrando como ser forte e persistente na conquista de meus ideais e objetivos sem perder a ternura e doçura. Pai, homem sábio que foi, é e sempre será meu exemplo de ser humano. Meu ídolo, minha vida profissional é espelho do que me ensinou, dos princípios ambientais até a nunca crescer sobre os ombros de outra pessoa.

MINHAS TIAS

ALDA LÉA E ALDAIZA – minhas segundas mães, sempre torcendo, amparando e auxiliando meus pais em minha educação moral e profissional. Ao amor incondicional destas mulheres de fibra, lutadoras, minhas “eternas baixinhas”. Exemplos de honestidade, desapego, força, espiritualidade, abdicação de suas vidas em prol da vida do próximo.

MINHA IRMÃ

BEATRIZ – minha melhor amiga, sempre disposta a me ajudar, torcer, e orar por mim.

AO MEU MARIDO, AMIGO, COMPANHEIRO, AMOR DA MINHA VIDA

LUIZ OCTAVIO – amor para toda a vida, por você, procuro ser o que há de melhor. Somos feitos um pro outro, feitos pra durar, reconheci em você o “meu lar” no dia em que te conheci.

MEU FILHO, LUZ DA MINHA VIDA

OCTAVIO – obrigada por ter me ensinado o que é ser mãe, você é parte de mim, amor infinito, uma luz que não produz sombra.

Tudo o que sou e conquistei foi por vocês.

Dedico

A **DEUS** - energia cósmica que me guia, fortalece, que me faz sentir ligada ao universo, me tornando parte de algo maior.

A **Espiritualidade Maior** - pela presença constante em minha vida nos momentos de alegria às horas de provações. Quero que fique aqui registrada, minha enorme gratidão por terem me conduzido com sabedoria e ética por toda esta jornada.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Minha Orientadora **Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**, por ter me recebido de braços abertos em situações tão adversas. Pelo exemplo de pessoa dinâmica, que tem a inspiração e sabedoria de guiar as mentes à luz da ciência e acima de tudo com humildade. Agradeço imensamente a oportunidade, confiança e todo ensinamento que obtive neste período que convivemos.

À Minha Coorientadora **Dra. Tereza Cristina Luque Castellane** pela orientação, paciência, acolhimento e por me conduzir no projeto com tanta destreza, o que tornou possível a conclusão desta tese em tão pouco tempo. Agradeço a **Deus** por eu a ter conhecido, e peço a **Ele** que a abençoe sempre.

À **CAPES** - pela bolsa de Doutorado, que permitiu minha total dedicação a este trabalho.

Aos Professores **Dra. Maria de Lourdes Corradi Custodio da Silva, Dra. Luciana Maria Saran, Dra. Tsai Siu Mui, Dr. Jackson A. Marcondes de Souza**, pela participação na banca examinadora e preciosas sugestões.

Ao **Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro** - Por ter cedido o laboratório e pelo exemplo de dedicação e ética.

À **Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves** – pela amizade, acolhimento e sugestões importantes para a Tese.

Ao **Dr. João Carlos Campanharo** – o que tem de humilde, tem em mesma proporção o conhecimento, obrigada por sempre me auxiliar, aprendi muito convivendo com você.

A amizade da **Dra. Gilvânia Campo Silva**, foram momentos difíceis que passamos juntas, mas me fortaleci vendo esta mulher em situações tão adversas e superando tudo com tanta garra, obrigada por ter trazido de volta a vontade de filosofar.

À **Dra. Jeanedy Pazinato** pela amizade e por ter sido o instrumento para me reaproximar de Deus e da Espiritualidade.

Aos companheiros de laboratório **Laís, Bernado e Welington Omori** por toda colaboração e auxílio nas análises de sequenciamento, aprendi demais com você.

À todos os colegas de laboratório do LBMP por todos os momentos compartilhados, tanto de trabalho quanto os de descontração.

Aos técnicos **Plínio e Eliana** do Laboratório Central pelas leituras dos metais por espectroscopia de absorção atômica.

À todas as **professoras e funcionárias do Centro e Convivência Infantil (CCI) “Recanto dos Pequenininhos”** por terem cuidado com tanto carinho de meu filho. Esses anos de convivência e tudo o que ele aprendeu com vocês ele levará para o resto da vida.

Aos meus familiares **Richard Feres (cunhado) e Beatriz (irmã)** por terem me socorrido nos momentos que fiquei sem bolsa; **Ligia A. Chioda (sogra), Samuel Sanches (cunhado) e Maria de Lourdes (avó)** por terem cuidado do Octavio todas as vezes que precisei e por orarem por mim. **Maria de Lourdes (tia)** por sempre torcer por mim e pela prontidão em me ajudar.

Enfim, agradeço por todos que estiveram presente em minha vida nesta jornada, a todos que torceram e oraram por mim. Agradeço até mesmo os que colocaram pedras em meu caminho, pois são com estas pedras que estou trilhando minha vida profissional e moral.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE QUADROS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância dos Exopolissacarídeos Bacterianos.....	3
2.2 Rizóbios e a Produção de Exopolissacarídeos.....	5
2.3 Rendimento de EPS em Diferentes Fontes de Carbono e Nutrientes.....	7
2.4 Classificação e Propriedades Físico-Químicas de Polissacarídeos Extracelulares Aplicados como Bissurfactantes.....	9
2.5 Atividade de Emulsificação (E ₂₄).....	13
2.6 Biossurfactantes e Biorremediação de Hidrocarbonetos e Óleos.....	15
2.7 Mecanismos de Biossorção.....	17
2.8 Fatores que Afetam a Biossorção.....	19
2.9 Modelos de Equilíbrio de Biossorção.....	20
2.10 Bactérias como Biossorventes.....	22
3. REFERÊNCIAS.BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 2 – Efeito do íon cobre (bivalente) e cromo (hexavalente) na produção de exopolossacarídeos e células de rizóbios.....	39
RESUMO	39
ABSTRACT.....	41
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Isolados utilizados.....	44
2.2 Condições e meios de cultivo.....	44
2.3 Identificação dos Isolados	44
2.3.1 Extração de DNA genômico.....	44
2.3.2 Técnicas de manipulação do DNA	45

	Páginas
2.3.2.1.Quantificação em NanoDrop e eletroforese de DNA.....	45
2.3.2.2. Reação de 16S <i>rRNA</i> dos isolados.....	46
2.3.2.3. Sequenciamento dos produtos da PCR utilizando o equipamento capilar ABI 3700.....	47
2.3.2.4. Análise do sequenciamento e posição filogenética baseada no gene 16S <i>rRNA</i>	47
2.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	48
2.5 Efeito de Metais na produção de Biomassa e EPS.....	49
2.5.1 Produção de exopolissacarídeos.....	49
2.5.2 Obtenção de EPS produzido pelos isolados.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.1 Análise da sequência do gene 16S <i>rRNA</i>	50
3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	52
3.3 Efeito de Metais na produção de Biomassa e EPS.....	54
4. CONCLUSÃO.....	60
5. REFERÊNCIAS. BIBLIOGRÁFICAS.....	60
CAPÍTULO 3 – Biossorção de cobre (II) e cromo (VI) em soluções aquosas usando células não-vivas de isolados de rizóbios.....	66
RESUMO.....	66
ABSTRACT.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	70
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 Isolados utilizados.....	72
2.2 Condições e meios de cultivo.....	72
2.3 Preparação de Biossorvente Bacteriano e Solução Iônica de Cobre e Cromo.....	72
2.4 Remoção de Cobre e Cromo por EPS e células mortas de Rizóbios.....	73
2.4.1 Teste de Screening da capacidades de remoção de Cu^{2+} e Cr^{6+} entre os isolados.....	73
2.4.2 Efeito da concentração inicial dos íons metálicos e da dose do biossorvente.....	74
2.5 Isoterma de Biossorção	74

Páginas

2.6 Análise estatística.....	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 Screening da capacidades de remoção de Cu^{2+} e Cr^{6+} entre os isolados.....	75
3.2 Efeito da concentração inicial dos íons metálicos e da dose do bioissorvente na remoção de metais.....	76
3.3 Isoterma de Bioissorção.....	81
4. CONCLUSÃO.....	83
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
CAPÍTULO 4 – Aplicação dos exopolissacarídeos rizobianos como bioemulsificantes de óleos e hidrocarbonetos.....	88
RESUMO	88
ABSTRACT.....	90
1. INTRODUÇÃO.....	91
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1 Isolados utilizados.....	93
2.2 Condições e meios de cultivo.....	93
2.3 Produção de exopolissacarídeos.....	93
2.4 Obtenção de EPS produzido pelos isolados.....	94
2.5 Propriedades Reológicas do EPS.....	94
2.6 Determinação da composição em monossacarídeo do EPS dos microrganismos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	95
2.7 Atividade de Emulsificação (E_{24}).....	96
2.8 Análise estatística.....	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
3.1 Avaliação da Produção de EPS.....	97
3.2 Análise Reológica.....	99
3.3 Determinação da composição em monossacarídeo do EPS dos microrganismos.....	102
3.4. Atividade de Emulsificação (E_{24}).....	104
3.4.1. Estabilidade da Emulsão em diferentes óleos e hidrocarbonetos e concentrações dos EPSs.....	104
3.4.2. Efeito da variação do pH e salinidade nas taxas de emulsificação	108

Páginas

4. CONCLUSÕES.....	110
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
CAPÍTULO 5 – Considerações Finais.....	116

LISTA DE FIGURAS

Página

Capítulo 2

Figura 1. Análise classificatória das sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1.500 bp) dos isolados: SEMIA 4064 (●), LMG 6125(■), LMG11892(▲) e JAB6 (◆). Para a análise foi utilizado o método Neighbor-joining, com a matriz de substituição de nucleotídeos Jukes-Cantor e bootstrap com 1.000 réplicas. São mostrados apenas os valores de bootstrap $\geq 50\%$. A escala significa 0,1 de substituição de nucleotídeos por posição. A sequência do 16S rRNA de *H. oregonensis* (L04675.1) foi utilizado apenas como grupo externo.

51

Figura 2. Produção de células do isolado de rizóbio (SEMIA 4064) em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

55

Figura 3. Produção de células do isolado de rizóbio (LMG 6125) em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

56

Figura 4. Produção de células do isolado de rizóbio (LMG 11892) em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

56

Figura 5. Produção de células do isolado de rizóbio (JAB6) em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

57

Capítulo 3

Figura 1. Screening da ação das células mortas dos isolados de rizóbios (0,5 g L⁻¹) na remoção de Cu^{2+} ($C_0=100\text{mg L}^{-1}$), 28°C, 150 rpm após 30 minutos e 30 horas.

76

Página

Figura 2. Screening da ação das células mortas dos isolados de rizóbios ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) na remoção de Cr^{6+} ($C_0 = 100 \text{ mg L}^{-1}$), 28°C , 150 rpm após 30 minutos e 30 horas.

76

Figura 3. Eficiência de remoção de Cu^{2+} por células mortas do isolados LMG 6125 com varias concentrações iniciais de cobre bivalente $50 - 500 \text{ mg L}^{-1}$ com varias doses de bioissorvente ($0,5 - 2,5 \text{ g L}^{-1}$).

77

Figura 4. Capacidade de bioissorção de células mortas do isolado LMG 6125 em diferentes concentrações do bioissorvente ($0,5 - 2,5 \text{ g L}^{-1}$ sobre a concentrações iniciais de cobre bivalente ($50 - 500 \text{ mg L}^{-1}$).

78

Figura 5. Eficiência de remoção de Cr^{6+} por células mortas do isolados LMG 6125 com varias concentrações iniciais de cromo hexavalente ($50 - 500 \text{ mg L}^{-1}$) com várias doses de bioissorvente ($0,5 - 2,5 \text{ g L}^{-1}$).

80

Figura 6. Capacidade de bioissorção de células mortas do isolados LMG 6125 em diferentes concentrações do bioissorvente ($0,5-2,5 \text{ g L}^{-1}$ sobre a concentrações iniciais de cromo hexavalente ($50 - 500 \text{ mg L}^{-1}$).

81

Capítulo 4

Figura 1. Curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas de EPSs dos diferentes isolados de rizóbios, à 25°C .

100

Figura 2. Curvas da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas de EPSs dos diferentes isolados de rizóbios, a 25°C .

101

Página

Figura 3. Atividade Emulsificação dos EPSs produzidos pelos isolados de rizóbio, na concentração de 1 mg mL^{-1} em diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais.

105

Figura 4. Atividade Emulsificação dos EPSs produzidos pelos isolados de rizóbio, na concentração de 5 mg mL^{-1} em diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais.

106

Figura 5. Fotos de teste de emulsão (E_{24}), dos EPS em solução (5 mg mL^{-1}), na proporção de 2:3 de óleos vegetais (óleo de oliva, óleo de girassol e óleo de soja), pH 7, a 25°C , após 24 hora: (a) emulsão do EPS do isolado SEMIA 4064, (b) emulsão do isolado LMG6125, (c) emulsão do isolado LMG11892 e (d) emulsão do isolado JAB6.

106

Figura 6. Fotos de teste de emulsão (E_{24}), dos EPS em solução (5 mg mL^{-1}), na proporção de 2:3 de hidrocarbonetos (hexano, tolueno e óleo diesel), pH 7, a 25°C , após 24 hora: (a) emulsão do EPS do isolado SEMIA 4064, (b) emulsão do isolado LMG6125, (c) emulsão do isolado LMG11892 e (d) emulsão do isolado JAB6.

106

Figura 7. Efeito da salinidade (A) e pH (B) na atividade de emulsão de óleos diesel dos EPSs produzidos pelos isolados de rizóbio, na concentração de 1 mg mL^{-1} .

109

LISTA DE QUADROS

	Página
Capítulo 1	
Quadro 1. Propriedades físico-químicas, funcionais e principais áreas de aplicação de polissacarídeos microbianos	11

LISTA DE TABELAS

	Página
Capítulo 2	
Tabela 1. Efeito das diferentes concentrações de Cu^{2+} na toxicidade de células de rizóbios.	53
Tabela 2 – Efeito das diferentes concentrações de Cr^{6+} na toxicidade de células de rizóbios.	54
Tabela 3. Meios de cultura (PSY_{liq} -100mL) acrescidos de diferentes concentrações e combinações dos íons metálicos (Cu^{2+} e Cr^{6+}) e o efeito sobre a produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular dos isolados de rizóbios.	58
Capítulo 3	
Tabela 1. Parâmetros de Langmuir representando a isoterma de bio sorção de células mortas dos quatro isolados de rizóbios nos tempos de 30 minutos e 30 horas, em pH 5,0, concentração de 100 mg L^{-1} de cobre e 0,5 g L^{-1} de bio sorvente.	82
Tabela 2. Parâmetros de Langmuir representando a isoterma de bio sorção de células mortas dos quatro isolados de rizóbios nos tempos de 30 minutos e 30 horas, em pH 2,0, concentração de 100 mg L^{-1} de cromo e 0,5 g L^{-1} de bio sorvente.	83
Capítulo 4	
Tabela 1. Produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular no meio de cultura por isolados de rizóbios e eficiência relativa de produção de EPS.	98
Tabela 2. Valores do índice consistência e do índice de lei das potências medidos para cada uma das amostras.	102

Tabela 3. Composição do percentual dos monossacarídeos dos EPS produzidos pelos isolados.

103

Tabela 4. Estabilidade da Atividade Emulsificantes dos EPSs dos isolados de rizóbio com diferentes concentrações e a eficiência sobre diferentes tipos de hidrocarbonetos e óleos vegetais.

107

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICOS DE RIZÓBIOS COMO BIOEMULSIFICANTE E BIOSSORVENTE DE COBRE E CROMO

RESUMO

As estruturas e alguns compostos produzidos pelos microrganismos apresentam elevada quantidade de cargas como, por exemplo, parede celular e biopolímeros. Os exopolissacarídeos (EPSs) de bactérias pertencentes à ordem Rhizobiales apresentam biopolímeros que têm sido muito estudados. Os EPSs são moléculas que apresentam grupos polares, esta característica é capaz de reduzir a tensão interfacial de mistura água/óleo e óleo/água. A formação de emulsões é um fator importante para a biodegradação de óleos e hidrocarbonetos. As cargas presentes na parede celular das células bacterianas são de natureza predominantemente aniônica. Estas estruturas são capazes de interagir fortemente com cátions metálicos e desempenham um papel importante no sequestro ou imobilização de íons no ambiente. A aplicação dos isolados de rizóbios são interessantes ferramentas biotecnológicas no processo de biorremediação, por estes microrganismos não apresentarem toxicidade à saúde e ao meio ambiente. Dos isolados de rizóbios pertencentes ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, da FCAV/UNESP, foram selecionados quatro, que demonstraram elevada produção de goma '*in vitro*'. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico, de isolados de *Rhizobium* spp. (SEMIA 4064 e JAB6) e dois isolados de *Mesorhizobium* spp. (LMG 6125 e LMG 11892), como bioemulsificantes e bioissorventes. Para a identificação dos isolados foi sequenciada a região 16S rRNA (1500pb). Foram estudados a produção de EPS e aplicação desses biopolímeros como bioemulsificantes de óleos e hidrocarbonetos. Investigando a Reologia e a composição dos monossacarídeos dos EPSs. Estes isolados foram explorados quanto à sensibilidade de células vivas e o processo de remoção por células mortas dos íons cobre (Cu^{2+}) e cromo (Cr^{6+}). O sequenciamento demonstrou que os isolados LMG 6125 e LMG 11892 não eram condizentes com o gênero e espécies descritos anteriormente. De acordo com os dados obtidos pelo sequenciamento, estes dois isolados pertencem ao gênero *Sinorhizobium*. Os resultados demonstraram que dos isolados estudados, o JAB6 foi o maior produtor de EPS.

Todos os EPSs estudados, apresentaram altas porcentagens dos monossacarídeos, galactose e glicose, presentes nas moléculas políssacarídicas. O EPS produzido pelo isolado SEMIA 4064 foi o que apresentou maior viscosidade. O EPS deste mesmo isolado, na concentração 5 mg mL⁻¹, evidenciou maiores taxas de emulsificação para óleo diesel, tolueno, hexano, óleo de soja, óleos de girassol e óleos de oliva. A influência dos íons Cu²⁺ e Cr⁶⁺ sobre as células vivas dos isolados de *Rhizobium* spp. e *Sinorhizobium* spp. demonstraram ter efeito tanto no desenvolvimento celular quanto na produção de EPS. Todas amostras de células mortas, dos isolados, foram capazes de remover os íons Cu²⁺ e Cr⁶⁺, no entanto, as maiores taxas de remoção foram apresentadas pelo isolado LMG 6125.

Palavras-chave: bioemulsificante, exopolissacarídeo, biossorvente, *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium leguminosarum*, biorremediação

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL RHIZOBIA AS BIOEMULSIFIER AND BIOSORBENT OF COPPER AND CHROMIUM

SUMMARY

The structures and some compounds produced by microorganisms have a high amount of charges such as, for example, cell wall and biopolymers. The exopolysaccharides (EPSs) of bacteria belonging to the order Rhizobiales have biopolymers that have been widely studied. The EPSs are molecules that have polar groups, this feature they are can to reduce the interfacial tension of water/oil and oil/water. The formation of emulsions is important factor for the biodegradation of oils and hydrocarbons. The charges present in the cell wall on the bacterial cells are predominantly of anionic in nature. These structures are capable of interacting strongly with metal ions and play an important role in sequestering or immobilization of ions in the environment. The application of the populations of rhizobia are interesting biotechnological tools in bioremediation process, these organisms do not present toxicity to health and the environment. Rhizobial isolates belonging to the Laboratory of Biochemistry of Plants and Microorganisms, FCAV / UNESP, four were chosen that demonstrated high gum production *in vitro*. This work aimed to investigate the potential of biotechnology of the isolates of *Rhizobium* spp. (SEMIA 4064 and JAB6) and two strains of *Mesorhizobium* spp. (LMG 6125 and LMG 11892), as biosorbents and bioemulsifiers. For the identification of the isolates were done sequencing of the gene 16S rRNA (1500pb). The production and application of these EPSs were studied as bioemulsifiers of oils and hydrocarbons. Investigating the monosaccharides composition and rheology of the EPSs. These isolates were explored for sensitivity of live cells and the process of removal of dead cells by copper ions (Cu^{2+}) and chromium (Cr^{6+}). The sequencing showed that the isolates LMG 6125 and LMG 11892 were not consistent with the genus and species previously described. According to the data obtained by sequencing, these isolates belong to the genus *Sinorhizobium*. The results showed that the isolates studied, the JAB6 was the largest producer of EPS. All EPSs studied showed high percentages of monosaccharides, galactose and glucose in the polysaccharide molecules. The EPS produced by isolated SEMIA 4064 showed the highest viscosity. The EPS

this same isolate, concentration 5 mg mL^{-1} , showed higher rates of emulsification for diesel oil, toluene, hexane, soybean oil, sunflower oil and olive oil. The influence of Cu^{2+} and Cr^{6+} on the living cells of isolates of *Rhizobium* spp. and *Sinorhizobium* spp. demonstrated effect on both cell growth and in the production of EPS. All samples of dead cells, of the isolates, were able to remove Cu^{2+} and Cr^{6+} , however, the highest rates of removal were isolated presented by LMG 6125.

Keywords: bioemulsifier, exopolysaccharide, biosorbent, *Sinorhizobium* spp., *Rhizobium leguminosarum*, bioremediation.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

Derramamentos de hidrocarbonetos (petróleo), outros óleos e metais pesados utilizados na agricultura e indústrias, têm sido fonte significativa de poluição ambiental. A contaminação de águas com resíduos orgânicos, hidrocarbonetos, óleos e elevadas concentrações de metais pesados é interesse ambiental. Estes compostos são persistentes e capazes de se acumular nos ecossistemas, levando a sérios riscos ambientais e à saúde (AL-SALEH e OBUEKWE, 2005; SANDRIN et al., 2000; SHARMA et al., 2001). A presença de metais pesados pode inibir a microbiota envolvida na degradação de compostos orgânicos afetando as taxas de biodegradação. O nível de inibição depende da concentração, disponibilidade, estado de oxidação dos metais pesados e das comunidades microbianas presentes na área. Os metais pesados inibem os microrganismos, bloqueando grupos funcionais essenciais, interferindo na incorporação de íons metálicos fundamentais para moléculas biológicas, embora alguns microrganismos sejam resistentes a doses elevadas de alguns metais pesados (AMOR et al., 2001).

Como forma de remover, hidrocarbonetos, óleos e metais pesados *in situ*, processos convencionais, tais como, uso de surfactantes sintéticos, precipitação química; oxiredução; filtração; técnicas eletroquímicas e sofisticados processos de separação com membranas, são utilizados. Estes processos são geralmente onerosos, o que estimula a busca por métodos biotecnológicos alternativos, visando a redução dos custos e menores impactos ao ambiente (DA COSTA e DUTA, 2001). Um método alternativo para ambientes contaminados com estes tipos de resíduos é a utilização de biomassa viva ou morta, incluindo também produtos microbianos como as substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Estes podem ser aplicados como bioemulsificantes (CAMEOTRO e MAKAR, 2010; CHOWDHURY et al., 2011; HUANG et al., 2012; ZHENG et al., 2011) e biossorventes, respectivamente (MOHAMAD et al., 2012; RAAMAN et al., 2012; XIE et al., 2013). A utilização de biomassa não-viva é preferida por facilitar o processo de tratamento. Uma vez que, o tratamento de áreas contaminadas e resíduos pode apresentar

toxicidade aos microrganismos vivos, pela presença de elevadas concentrações de hidrocarbonetos e metais. (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011; SCHNEIDER et al., 1999).

Células microbianas e seus biopolímeros apresentam em suas estruturas moleculares uma abundância de grupos químicos carregados negativamente. Estes grupos disponíveis são responsáveis pela formação de micelas (emulsões), reduzindo a interface das misturas de líquidos imiscíveis (SOUZA MONTEIRO et al., 2012; WANG et al., 2011; ZHENG et al., 2011); além de formar complexos com íons metálicos por meio de interações eletrostáticas (HUANG et al., 2013; MOHAMAD et al., 2012; SUTHERLAND, 2001; XIE et al., 2013). Estes processos de emulsão e complexação são afetados por uma série de fatores, incluindo pH, temperatura e as cargas presentes nos bioemulsificantes e bioissorventes (HUANG et al., 2012; ZHENG et al., 2011). Diversos estudos têm sido realizados quanto à utilização de biopolímeros como exopolissacarídeo (EPS), lipopolissacarídeo (LPS), entre outros, na aplicação como bioemulsificantes. Entretanto, poucas pesquisas têm sido relatadas estudando a biomassa não viva como bioissorvente de íons metálicos. No entanto, é amplo o espectro de microrganismos em estudos com fungos filamentosos (KAUSHIK e MALIK, 2013), leveduras (HUANG e LIU, 2013) e bactérias (HUANG et al., 2012; MOHAMAD et al., 2012; XIE et al., 2013; ZHENG et al., 2012).

A busca por microrganismos com maior potencial de produção de EPSs, buscando moléculas bioestruturadas, com elevada presença de cargas e alta viscosidade, entre outras características necessárias. Ainda pouco se conhece da aplicação destes biopolímeros como emulsificantes e as interações destas moléculas com os diversos tipos de hidrocarbonetos e óleos, em diferentes condições de pH, salinidade e temperatura, entre outros fatores. Raros são os estudos relatando o uso de biomassa não viva como bioissorvente na remoção de diferentes metais pesados. É importante a pesquisa sobre as aplicações de EPS e células como biorremediadores efetivos, tanto como tenso ativos no processo de emulsificação de contaminantes como hidrocarbonetos e óleos, quanto na adsorção íons metálicos. Considerando-se que nenhum dos α e β -rizóbios mostraram-se patogênicos, até agora, este tipo de pesquisa é importante para avaliar o potencial de exopolissacarídeos de outras espécies

de *Rhizobium* para aplicação industrial como bioemulsificantes e como agentes bioissorvente.

CASTELLANE, (2004) e CAMPANHARO, (2006) utilizando espécies pertencentes às famílias Rhizobiaceae e Phyllobacteriaceae, que sintetizam grandes quantidades de polissacarídeos extracelulares diante dos resultados obtidos por estes autores foram selecionados quatro isolados para o desenvolvimento deste trabalho, *Rhizobium leguminosarum* (SEMIA 4064), *Mesorhizobium loti* (LMG 6125), *Mesorhizobium plurifarum* (LMG 11892) e *Rhizobium* sp. (JAB6). Os objetivos com o trabalho foram: estudar a produção da EPS dos quatro isolados, além de confirmar a identificação dos mesmo; avaliar a ação destes polímeros como bioemulsificantes de hidrocarbonetos e óleos e a aplicação de células mortas dos isolados como bioissorventes de cobre bivalente (Cu^{2+}) e cromo hexavalente (Cr^{6+}).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância dos exopolissacarídeos bacterianos

O termo exopolissacarídeo (EPS) é amplamente utilizado para nomear polímeros de carboidratos encontrados no exterior das células, sendo uma estrutura altamente diversificada, com propriedades físicas e composições químicas extremamente variadas (Sutherland, 2001). Diversos estudos demonstraram que nas bactérias gram-negativas os EPSs são sintetizados intracelularmente, utilizando açúcares difosfato nucleotídeos, que fornecem as formas ativadas de monossacarídeos, fornecendo à célula bacteriana um meio de interconversão dos vários monossacarídeos através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (Sutherland, 2001). Este processo é muito complexo, regulado tanto por níveis pós-traducional como transcricional, e dependente da atividade de um complexo de proteínas, ambos localizados nas membranas interna e externa, abrangendo o espaço periplasmático entre elas (MOREIRA et al., 2000; SHORUPSKA et al., 2006).

Dois são os principais tipos de EPSs encontrados na superfície exterior da membrana bacteriana: os EPSs liberados no meio e as β -glicanas cíclicas. As β -glicanas cíclicas geralmente são referidas como uma categoria separada, enquanto que os polímeros extracelulares livres (EPSs) são os de maior

interesse devido sua facilidade de obtenção (DONOT et al, 2012; FRAYSSE et al., 2003).

Os exopolissacarídeos de origem bacteriana têm diversas funções na natureza, além de que, sua produção também é influenciada por fatores nutricionais como quantidade de enxofre, nitrogênio e fosfato (PEIX et al., 2010). O EPS é importante para o rizóbio, uma vez que esta substância desempenha diferentes papéis durante os eventos de pré-infecção na rizosfera, podendo: (a) funcionar como molécula receptora do micro simbiote, fazendo uma interação célula/célula e desencadeando o processo de nodulação (KIRICHENKO et al., 2004); (b) induzir a formação de nódulos e micro colônias (BECKER e PÜHLER, 1998); (c) aumentar a adesão da bactéria, promovendo seu crescimento nos espaços intercelulares necessários tanto para a nodulação bem como organogenia da raiz (KOSENKO et al., 2001); (d) agir como sinal molecular durante o desenvolvimento do nódulo (KOSENKO et al., 2001); (e) impedindo as reações de defesa vegetal (CRESPO-RIVAS et al., 2009); (f) auxiliar na interação entre rizóbios e leguminosas (CRESPO-RIVAS et al., 2009); (g) proteger contra metais de íons tóxicos (DEVI e VIJAYENDRA, 2011). É sabido que devido à presença de monossacarídeos ácidos na composição da maioria dos EPSs rizobianos, mesmo em baixa concentração, o biopolímero torna o ambiente em que está sendo cultivado mais acidificado. Esta acidez faz com que o heteropolissacarídeo fique altamente aniônico e, assim, pode atuar como resina de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula (WHITFIELD, 1988).

Os microrganismos produtores de EPS vêm sendo estudados para utilização na tecnologia de biobarreiras para biorremediação *in situ* de áreas contaminadas. As barreiras biológicas, formadas pelas bactérias e os EPSs por elas produzidos, separam áreas adjacentes do ambiente subterrâneo, impedindo que uma camada contaminante se propague (KIM, 2004) e auxiliam na agregação e estabilidade do solo (ZEVENHUIZEN, 1997). Constituem ainda, uma importante classe de polímeros com elevado interesse biotecnológico, que apresentam propriedades únicas como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes e gelificantes (SUTHERLAND, 2001).

2.2. Rizóbios e a Produção de Exopolissacarídeos

Bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente produtoras de polissacarídeos extracelulares (EPSs) (BECKER e PÜHLER, 1998). Dentre estas, as alfaproteobactérias da ordem Rhizobiales, pertencentes às famílias Rhizobiaceae (gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Ensifer*) e Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*) sintetizam grandes quantidades de EPSs (BECKER e PÜHLER, 1998; CASTELLANE, 2007). A família Rhizobiaceae possui certamente o maior número de espécies descritas que produzem EPS, dentre os mais estudados estão algumas espécies pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, e *Agrobacterium* (HISAMATSU et al., 1980). No entanto, as informações sobre EPS produzidos por rizóbios ainda não está totalmente disponível, o que representa uma ampla gama de possibilidades inexploradas.

Rizóbios são bactérias gram-negativas de vida livre presentes no solo, capazes de formar interação simbiótica com plantas leguminosas, tendo como contribuição a fixação de nitrogênio. Este processo simbiótico requer sinalização química específica entre os parceiros simbióticos (COOPER, 2007). O hospedeiro libera flavonóides que atraem as rizobactérias que em resposta às moléculas liberadas pela planta as células bacterianas começam a expressar os genes *nod*, e assim, inicia-se a produção de fatores que estimulam formação de nódulos (GEURTS et al., 2005). Além dos flavonóides e fatores Nod que iniciam o programa simbiótico, os exopolissacarídeos (EPS), lipopolissacarídeos (LPS), polissacarídeos capsulares (KPS) e β -(1,2)-glucanas cíclicas tem papéis essenciais para a formação do cordão de infecção no desenvolvimento de nódulos (FRAYSSE et al., 2003).

A composição química de um número considerável de EPS rizobianos já foi determinada (BECKER e PÜHLER 1998; CASTELLANE e LEMOS, 2007; MONTEIRO et al., 2012; CASTELLANE et al., 2014). Na literatura há poucas informações sobre o processo de biossíntese dos diferentes tipos de EPS. Entretanto, os genes envolvidos no processo de biossíntese do EPS em rizóbio foram melhores estudados na espécie *Sinorhizobium meliloti*. Extensivos estudos genéticos nesta bactéria resultaram na identificação de diversos reguladores da síntese do EPS I e EPS II por ela produzidos, conhecendo-se

bem a biossíntese dos nucleotídeos de açúcar e montagem das unidades repetitivas (BECKER e PÜHLER, 1998; MOREIRA et al., 2000). Contudo, os passos finais da sua biossíntese do EPS ainda não estão bem definidos.

A produção de EPS por *S. meliloti* é simbioticamente importante, cujos biopolímeros, succinoglicano e EPS II, podem funcionar no processo de invasão do nódulo, embora seus papéis exatos ainda sejam desconhecidos (GLENN et al., 2007). O succinoglicano é um polímero formado por arranjos de octassacarídeos repetidos, constituídos de resíduos de uma unidades de galactose e sete unidades de glicose substituídos por grupos acetil, succinil e piruvil na proporção de 1:1:1 (REINHOLD et al., 1994). A presença de succinoglicano pode ser observada com a utilização do corante calcoflúor, que liga-se ao succinoglicano e sob luz UV, gerando fluorescência (LEIGH et al., 1985). Vários mutantes na biossíntese do succinoglicano foram isolados com base na sua incapacidade para fluorescer ou na alteração fenotípa fluorescente em meio suplementado com calcofluor (LONG et al., 1988). Este fato conduziu à descoberta de um grupo de genes posteriormente designado como *exo*, envolvido em processos, tais como a síntese e modificação das subunidades octassacarídeas, polimerização e transporte do exopolissacarídeo; existe também uma glicanase envolvida na despolimerização do polímero (LONG et al., 1988; YORK e WALKER, 1997). A análise do agrupamento de genes *exo*, bem como os intermediários lipídicos biossintéticos foram encontrados por acumularem-se em vários mutantes deficiente de succinoglicano, o que conduziu a um modelo para a biossíntese de succinoglicano (REUBER e WALKER, 1993). O primeiro resíduo de açúcar, galactose, é adicionado ao transportador lipídico, produto do gene *exoY*. Os sete resíduos restantes de glicose são posteriormente adicionados pela glicosiltransferases específicas e as modificações no octassacarídeo são incorporadas durante o processo de biossíntese. Por fim, a polimerização e transporte do polímero ocorrem (REUBER e WALKER, 1993).

Outras análises demonstraram que o succinoglicano é produzido em duas dimensões bem definidas com base na massa molecular. Uma fração do succinoglicano contém elevada massa molecular que consiste em mais de 2.000 subunidades de octassacarídeos (GONZÁLEZ et al., 1998). A segunda fração dos succinoglicano com baixa massa molecular consiste em

monômeros, dímeros, e trímeros de subunidades do polímero (GONZÁLEZ et al., 1998). As frações de baixa massa molecular do succinoglicano podem ser produzidas tanto por polimerização parcial ou despolimerização de produtos de elevada massa molecular, por ação de endoglicanases específicas (GONZÁLEZ et al., 1998). A polimerização direta do succinoglicano é mediada por produtos dos genes de *exoP*, *exoT*, e *exoQ* (GONZÁLEZ et al., 1998). A proteína ExoP está envolvidas na determinação do comprimento da cadeia do polímero (BECKER et al., 1995). A biossíntese das moléculas do succinoglicano constituídas pela fração de baixa massa molecular (dímero e trímero) são determinadas pelas proteínas ExoP e ExoT. As proteínas ExoP e ExoQ agem em conjunto para produzir a fração do succinoglicano com elevada massa molecular (GONZÁLEZ et al., 1998). A despolimerização do succinoglicano é mediada pela ação de duas endo-1,3-1,4- β -glicanases, ExoK e ExsH.

A produção de EPS é influenciada por diversos fatores como, por exemplo, a relação das fontes de carbono e nitrogênio (CAMPANHARO, 2006). Estes fatores também influenciam a estrutura e as propriedades reológicas do EPS (STAUDT et al., 2012). As propriedades reológicas e de localização periférica do EPS sugerem que são responsáveis pela proteção das bactérias contra o estresse ambiental (FRAYSSE et al., 2003), que contribui para as funções intrínsecas dos EPSs bacterianos (POTTS, 1994).

2.3. Rendimento de EPS em diferentes fontes de carbono e nutrientes

Rizóbios, são bactérias quimiorganotróficas que podem metabolizar vários tipos de matéria orgânica carbonácea além de várias fontes de nitrogênio (NOEL, 2009). A fim de comparar a melhor fonte de carbono para a produção de EPS e o crescimento bacteriano, foram usadas diferentes fontes orgânicas, inorgânicas e de vitaminas. A concentração de fosfato também influencia o tipo de EPS produzido, uma vez que foi demonstrado que concentrações altas de fosfato e baixas de nitrogênio e enxofre estimulam a biossíntese do EPSI, enquanto que a biossíntese do EPSII é estimulada por baixo nível de fosfato (JANCZAREK e SKORUPSKA, 2011).

A fonte orgânica, a concentração ideal para que ocorra o aumento da produção de EPS foi de 1,5% de sacarose, já o manitol foi o que induziu maior crescimento bacteriano. Vitaminas e o ácido nicotínico em uma concentração de 3 mg mL⁻¹ induziu a quantidade máxima de EPS (GHOSH et al., 2011). Staudt e colaboradores (2012) testaram seis diferentes fontes de carbono, a fim de comparar o rendimento e a composição do EPS de *Rhizobium tropici* cultivados nestes diferentes meios. As fontes foram arabinose, glicose, sacarose, manitol, frutose e glutamato, no entanto, o meio com frutose foi o que apresentou crescimento de célula bacteriano mais lento. O meio com glutamato permaneceu mais translúcido, indicando pouca produção de EPS quando comparada às outras fontes de carbono. Castellane (2007) também estudou a produção de EPS a partir de duas estirpes de *Rhizobium tropici* cultivadas com diferentes fontes de carbono em meio líquido definido para rizóbio. Em seu trabalho verificou que a alteração da fonte de carbono pode interferir tanto na produção, bem como na proporção dos monossacarídeos presentes na composição dos EPS produzidos. Neste trabalho foi observado que quase 90% do EPS produzido pela estirpe SEMIA 4077 foram formados durante a fase de crescimento estacionária, sendo que a outra estirpe, SEMIA 4080 teve produção abundante do polímero durante todo o tempo de cultivo, mostrando que a produção de EPS está relacionada ao crescimento bacteriano.

Existem evidências de que o desenvolvimento bacteriano e a produção de EPS sejam dois processos competitivos, uma vez que os precursores para a síntese de EPS são os mesmos usados para funções celulares primárias. Vias biossintéticas bacterianas incluem a absorção do substrato, via metabólica central e síntese de EPS. Dependendo do tipo de substrato, que pode ser absorvido pela célula através de um sistema de transporte passivo ou ativo, após ser catabolizado por fosforilação intracelular, ou pode ser transportado e oxidado através de uma via periplasmática oxidativa direta. A via periplasmática oxidativa existe apenas em certas bactérias, enquanto que a via fosforilativa intracelular é onipresente entre bactérias. Ambos sistemas têm sido relatados em várias estirpes produtoras de EPS, que pode funcionar simultaneamente, se houver disponibilidade do substrato. No citoplasma, o substrato é catabolizado através da glicólise e os metabólitos primários

formados são utilizados como precursores para a síntese de pequenas biomoléculas (por exemplo, aminoácidos ou monossacáridos). A síntese de polissacarídeos requer a biossíntese de precursores ativados que são monossacarídeos ricos em energia, principalmente açúcares nucleosídeo difosfato (NDP-açúcares), que são derivados de açúcares fosforilados. (FREITAS et al., 2011).

2.4. Classificação e Propriedades Físico-Químicas de Polissacarídeos Extracelulares Aplicados como Bissurfactantes

A caracterização dos EPS microbianos é importante na determinação da aplicabilidade desses biopolímeros. Entre as metodologias adotadas na caracterização dos EPS, a avaliação reológica destaca-se por fornecer informações a respeito da estrutura molecular e de possíveis aplicações biotecnológicas (KACI et al., 2005). A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sobre influência de tensões. Dentro deste contexto, a matéria pode estar no estado líquido, sólido ou gasoso (DAK et al., 2007). A reologia considera dois materiais como ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. No sólido elástico a propriedade de maior interesse é a elasticidade, ou seja, um material com forma definida quando deformado por uma força externa, dentro de certos limites, retornará à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. Já no líquido viscoso a propriedade de maior interesse é a viscosidade, que tem como característica não possuir forma definida, escoando irreversivelmente com a aplicação de uma força externa (BRETAS e D'ÁVILA, 2005).

Os líquidos pseudoplásticos apresentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação, que depende principalmente da orientação/alinhamento de moléculas ou partículas na direção do fluxo, superando o movimento Browniano de moléculas. Em taxas de deformação muito baixas, o movimento Browniano das moléculas as mantêm em uma ordem interna irregular, sem alteração significativa da estrutura tridimensional, apesar dos efeitos iniciais da orientação de cisalhamento. Deste modo, o líquido apresenta um comportamento semelhante ao dos líquidos Newtonianos, com a viscosidade independente da taxa de deformação. Quando o

cisalhamento excede o efeito aleatório do movimento Browniano, a viscosidade cai drasticamente pela indução do alinhamento das moléculas na direção do fluxo. Em taxas de deformação extremamente altas, a viscosidade se aproxima de um nível finito constante. Os fluídos pseudoplásticos, durante o escoamento, podem apresentar três regiões distintas de taxas de deformação: baixa, média e alta. Na região newtoniana ou de baixas taxas de deformação, a viscosidade aparente (η_0), chamada de viscosidade limitante à taxa de deformação zero, não varia com a taxa de deformação aplicada. Na região de taxas de deformação médias, a viscosidade aparente (η) diminui com o aumento da taxa de deformação (comportamento pseudoplástico) e, na região de altas taxas de deformação, a viscosidade aparente (η_∞) volta a ficar constante e é chamada de viscosidade limitante a taxas de deformação infinitas (TONELI et al., 2005).

Dentre os líquidos pseudoplásticos estão diversas substâncias de alta importância técnica e comercial, tais como soluções poliméricas, emulsões, suspensões ou dispersões (VRIESMANN, 2008). As substâncias com comportamento pseudoplásticos são apontadas como potenciais biossurfactantes. Ao contrário de surfactantes quimicamente sintetizados, que são classificados de acordo com o seu padrão de dissociação em água, os biossurfactantes são categorizados por sua composição química, massa molecular, propriedades físico-químicas e modo de ação e origem microbiana. Com base na massa molecular, são divididos em biossurfactantes de baixa massa molecular, incluindo glicolípidos, fosfolípidos e lipopéptidos e, biossurfactantes/bioemulsificantes de elevada massa molecular contendo polissacarídeos, proteínas anfipáticas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas destes biopolímeros. Os biossurfactantes de baixa massa molecular são eficientes na redução das tensões interfaciais e de superfície, enquanto biossurfactantes de alta massa molecular são mais eficazes na estabilização de emulsões de óleo/água (CALVO et al., 2009). O Quadro 1 apresenta a produção de biossurfactantes e seus produtores. Os biossurfactantes acumulam-se na interface entre dois fluídos imiscíveis, ou entre um líquido e um sólido. Ao reduzir a tensão superficial (ar-líquido) e interfacial (líquido-líquido) reduzem as forças de repulsão entre as duas fases

Quadro 1. Propriedades físico-químicas, funcionais e principais áreas de aplicação de polissacarídeos microbianos

EPS	Componentes	Cargas	Massa Molecular (Da)	Principais Propriedades	Principais Aplicações	Microorganismos	Referências
Xantana	Manose Glicose Ácido Glucurônico Acetato Piruvato	Aniônica	$(2,0 - 5,0) \times 10^6$	-Solúvel em água; -Alta viscosidade e baixas taxas de cisalhamento mesmo em baixas concentrações; -Estabilidade em ampla faixa de temperatura, pH e salinidade	- Alimentos - Indústria do petróleo - Indústria Farmacêutica - Cosméticos e produtos de cuidado pessoal - Agricultura	<i>Xanthomonas campestris</i>	REHM, 2009 ULLRICH, 2009
Alginate bacteriano	Ácido Glucurônico Ácido Manurônico Acetato	Aniônica	$(0,3 - 1,3) \times 10^6$	-Solúvel em água; -Capacidade gelificante; -Formação de película	Medicina cirúrgica: curativos, tratamento de feridas, Medicamentos de liberação controlada	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	REMMINGHORST e REHM, 2009 SABRA e ZENG 2001
Celulose bacteriana	Ácido Glucurônico Acetilglicosamina	Neutro	$\sim 10^6$	-Insolúvel em muito solvent -Alta cristalinidade -Elevada resistência à tração; moldabilidade	Biomédica: - Cicatrização de feridas, - Engenharia de tecidos - Vasos sanguíneos Audio: - Diafragmas de alto-falante	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	LIN et al., 2013 PETERSEN e GATENHOLM, 2011
Dextrano	Glicose	Neutro	$10^6 - 10^9$	-Não iônico -Boa estabilidade -Comportamento de fluido Newtoniano	- Alimentos - Indústria farmacêutica: expensor de volume de sangue - Meios cromatográficos	<i>Leuconostoc</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp <i>Lactobacillus</i> sp.	SARWAT et al., 2008
Curdiana	D-Glicose	Neutro	$5,0 \times 10^4 - 2,0 \times 10^6$	-Abilidades de formação de Gel; -Insolubilidade em água; -Comestíveis, não tóxicos -Atividade Biológica	- Encapsulamento e medicamentos de liberação controlada - Encapsulação de ingredientes alimentícios - Remoção de metais pesados	<i>Agrobacterium</i> sp.	KANG et al., 2009 McINTOSH et al., 2005
Ácido Hialurônico	Ácido Glucurônico Acetilglicosamina	Aniônica	$(1,0 - 2,0) \times 10^6$	-Atividade Biológica ; -Altamente Hidrofílico	Engenharia de tecidos, membrana timpânica, cicatrização de feridas, lentes oftálmicas	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	REHM, 2009

Succinoglicana	Glicose Acetato Succinato Piruvato 3-Hidroxibutirato	Aniônica	LMW < 5 x 10 ³ HMW > 1 x 10 ⁶	-Viscosidade pseudoplástica; -Estabilidade ácida	• Alimentos • Recuperação de óleo	<i>Rhizobium</i> sp. <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Agrobacterium</i>	GLENN et al., 2007
Levana	Frutose	Neutro	3,0 x 10 ⁶	-Baixa viscosidade -Alta solubilidade em água -Atividade biológica: atividade anti-tumoral e anti-inflamatório; -Força adesiva; -Capacidade de formação de película	• Alimentos (probiótico) • Alimentação • Medicamentos • Cosméticos • Indústria	<i>Zymomonas mobilis</i>	SENTHILKUMAR e GUNASEKARAN, 2005 OLIVEIRA et al., 2007
GalactoPol	Galactose Manose Glucose Ramnose Acetato Succinato Piruvato	Aniônica	(1,0-5,0) x 10 ⁶	-Afinamento de cisalhamento viscoso soluções meios aquosos -Formação de película -Capacidade emulsificante -Capacidade de floculação	• Alimentação humana e animal • Cosméticos • Farmacêutica • Medicina • Recuperação de óleo • Revestimento • Pacotes	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	ALVES et al., 2011 FREITAS et al., 2009
FucoPol	Fucose Galactose Glicose Acetato Succinato Piruvato	Aniônica	(2,0-10,0) x 10 ⁶	-Afinidade de cisalhamentos viscoso em soluções e meio aquoso -Formação de película -Capacidade emulsificante -Capacidade de Floculação -A atividade biológica devido ao teor de fucose	• Alimentação humana e animal • Cosméticos • Farmacêutica e medicina • Recuperação de óleo • Fonte de fucose e fuco-oligossacarídeos	<i>Enterobacter</i> sp	ALVES et al., 2010 FREITAS et al., 2011
Goma de Gelamo	Glicose Ramnose Ácido Glucurônico Acetato Glicerato	Aniônica	5,0 x 10 ⁵	-Hidrocoloide; -Estabilidade em ampla faixa de pH; -Capacidade de gelificação; -Gel termorreversível -Formação de película	• Alimentos • Ração • Farmacêutica • Pesquisa: agar substituto e electroforese em gel	<i>Sphingomonas aucimobilis</i>	FIALHO et al., 2008 YANG et al., 2010;

diferentes permitindo que as duas fases se misturem (SOBERÓN-CHÁVEZ et al., 2011).

2.5. Atividade de Emulsificação (E_{24})

Para a avaliação da atividade de emulsificação (E_{24}) é utilizado o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987), que estudaram o efeito do biosurfactantes produzidos por dois isolados de *Bacillus* spp. (IAF 343 e IAF346) na emulsificação de toluene e hexano. O E_{24} determina a camada de emulsificação após a mistura do composto hidrofóbico com biosurfactante, esta taxa é determinada por uma equação matemática.

Emulsão é um sistema heterogêneo que consiste em um líquido imiscível, completamente difuso em outro, na forma de gotículas. A formação de uma emulsão, portanto, requer energia para manter as gotículas dispersadas na fase continua. No entanto, esta reação é termodinamicamente desfavorável e, por esse motivo, o processo mostra estabilidade mínima, que pode ser aumentada pela adição de agentes tensoativos de superfície. Os emulsificantes em geral apresentam um segmento de sua molécula com propriedades hidrofílicas e outro segmento lipofílico, isto é, são compostos tensoativos anfifílicos, servindo por isso, para compatibilizar a mistura de água com óleos. Esta característica da molécula faz pontes entre esses componentes, formando emulsões; esses compostos também são conhecidos como surfactantes, tensoativos, hipotensores e emulsificantes. Alguns importantes agentes emulsificantes são os sabões, detergentes, goma arábica, saponinas, óleos sulfonados, lecitinas e proteínas, entre outros (HOFFMANN e REGER, 2014; JAMIESON, 1932).

Outra alternativa é o uso dos biosurfactantes, que são compostos tensoativos produzidos por muitos microrganismos incluindo arqueas, bactérias, leveduras e fungos. Estes compostos têm recebido crescente interesse nas últimas décadas pelas vantagens que possuem sobre os surfactantes químicos, tais como, biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, funcionalidade sob condições extremas de pH, salinidade e temperatura, estabilidade, entre outros (DESAI e BANAT,

1997; GEORGIU et al., 1990; *apud* CHANDANKERE et al., 2013). Portanto devido as propriedades de seletividade e de degradação, o biotensioativo é uma alternativa ao uso de surfactante sintético, sendo assim, mais adequados para o controle e recuperação de contaminações ambientais (DESAI e BANAT, 1997). Os EPSs podem servir como bioemulsificantes fazendo com que aumente a estabilidade da emulsão óleo-água tornando assim, a mistura termodinamicamente mais estável (BACH et al., 2003).

Estudos têm demonstrado a ação de EPSs produzidos por diversas bactérias gram-negativas utilizados como bioemulsificantes com potencial na degradação de hidrocarbonetos. Huang e colaboradores (2012) testaram a otimização da produção de EPS a partir de três estirpes isoladas de raízes *Rhizobium miluonense* (CC-B-L1), *Burkholderia seminalis* (CC-IDD2w) e *Ensifer adhaerens* (CC-GSB4) e, componentes de meio de cultura e o desempenho deste na emulsificação de óleo diesel. O estudo demonstrou que a produção de EPS pelas três estirpes foram de 212, 203 e 198 mg L⁻¹ respectivamente, em meio de extrato de levedura manitol (YEM); sendo o índice de emulsificação (E₂₄) respectivamente de 66, 64 e 60%. Após modificar as condições de cultura, houve um aumento do desempenho das estirpes 22, 21 e 16,7% na produção de EPS e o E₂₄ foi de 74, 71 e 65%, respectivamente. O E₂₄ tem demonstrado a importância dos bioemulsificantes na emulsificação deste compostos insolúveis de difícil degradação. Um exemplo disto, é o estudo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (J4) capaz de produzir eficazmente ramnolípídeo de diversas fontes de carbono. A estirpe J4 pode degradar óleos vegetal, bem como óleos minerais (querosene e diesel) para produzir biossurfactante. Assim, o biossurfactante tem o potencial para ser aplicado na biorremediação de poluentes petrolíferos. Ramnolípídeo produzido por *P. aeruginosa* (J4) tinha uma concentração micelar crítica de ca. 50 mg L⁻¹, exibindo uma excelente atividade de emulsificação de diesel e querosene (E₂₄ = 70 e 78%, respectivamente) (WEI et al., 2005).

Foi observado por Jain et al. (2012) que bioemulsificantes produzidos por *Klebsiella* sp. (RJ-03) emulsificaram óleos de semente de algodão, óleo de amendoim, óleo de jojoba e hidrocarbonetos como benzeno, tolueno, tetracloreto de carbono e diclorometano, revelando altos índices de E₂₄ entre o

intervalo de 100% a 62%. Sendo que os compostos emulsificados demonstraram ser dissolvidos facilmente em água e formar uma solução clara em ampla faixa de pH (2-12), bem como uma emulsão estável. Alguns emulsificantes comerciais, particularmente aqueles com componentes de ácidos graxos, não produzem uma solução clara e, portanto, há limitação em suas aplicações (GUTIERREZ et al., 2009). A presença de proteínas e diversos grupos funcionais presentes nos biossurfactantes fornecem hidrofobicidade tornando melhor a emulsificação dos hidrocarbonetos e óleos (GUTIERREZ et al., 2009; SUTHERLAND, 2001).

2.6. Biossurfactantes e Biorremediação de Hidrocarbonetos e Óleos

A extensa produção e utilização de hidrocarbonetos resultou em uma vasta contaminação ambiental por esses produtos químicos. Devido à sua toxicidade, há efeitos negativos persistentes sobre os organismos vivos. Portanto, os biossurfactantes são importantes para degradação destes compostos e conseqüentemente dos processos de autodepuração em locais poluídos. Os hidrocarbonetos e óleos, como os produtos químicos orgânicos hidrofóbicos, apresentam solubilidade limitada na água e tendem a dividir a matriz do solo. Esta partição pode ser contabilizada em torno de 90-95% ou mais da massa total de contaminantes. Como consequência, os contaminantes de hidrocarbonetos apresentam recuperação de moderada a fraca em tratamentos físico-químicos; a limitada biodisponibilidade aos microorganismos; e disponibilidade limitada de produtos químicos oxidantes e redutores quando aplicado *in situ* e/ou *ex situ*.

Um método promissor que pode melhorar a eficácia da biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos e óleos é a utilização de biossurfactantes, que apresentam dois mecanismos para acelerar este processo. Um mecanismo é através do aumento da biodisponibilidade do substrato (hidrocarbonetos e óleos) para os microorganismos. Outro mecanismo, ocorre quando o biossurfactante envolve a superfície da célula, aumentando a hidrofobicidade da superfície, permitindo que os substratos hidrofóbicos se associem mais facilmente com as células bacterianas (MULLIGAN e GIBBS, 2004). Ao reduzir as tensões superficiais e interfaciais, os biossurfactantes

aumentam as áreas da superfície dos compostos insolúveis que conduzem a um aumento da mobilidade e biodisponibilidade dos compostos. Em consequência deste fato, os biossurfactantes indiretamente melhoram a biodegradação e consequentemente a remoção de hidrocarbonetos e óleos. A adição de biossurfactantes pode auxiliar no aumento da biodegradação de hidrocarbonetos e óleos por mobilização, solubilização ou emulsificação (NGUYEN et al., 2008; RAHMAN et al., 2003; URUM e PEKDEMIR, 2004; NEIVAS et al., 2008).

O mecanismo de mobilização ocorre em concentrações abaixo da concentração micelar crítica (CMC) do biotensioativo. Nessas concentrações, os biossurfactantes reduzem a tensão superficial e interfacial entre os sistemas ar/água e solo/água. Devido à redução da força interfacial, o contato do biossurfactantes com os sistemas solo/óleo ou água/óleo, aumenta o ângulo de contato reduzindo a força capilar. Por sua vez, o processo de solubilização ocorre acima da CMC do biossurfactante, nessas concentrações as moléculas de biossurfactantes se associam formando micelas, aumentando drasticamente a solubilidade dos hidrocarbonetos e óleos. As extremidades hidrofóbicas das moléculas de biossurfactantes ligam-se em conjunto no interior da micela enquanto que as extremidades hidrófilas estão expostas à água no exterior. Consequentemente, o interior de uma micela cria um ambiente compatível para moléculas orgânicas hidrofóbicas. O processo de incorporação de tais moléculas em uma micela é conhecido como solubilização (URUM e PEKDEMIR, 2004). Emulsificação é um processo que forma um líquido, conhecido como emulsão, contendo gotículas muito pequenas de gordura ou óleo suspensas em um líquido, geralmente água. Os biossurfactantes de elevada massa molecular são agentes emulsionantes eficazes. Muitas vezes estas biomoléculas são aplicadas como aditivos para estimular o processo de biorremediação e remoção de substâncias como petróleo, hidrocarbonetos e óleos de ambientes contaminados (PACWA-PŁOCINICZAK ET AL., 2011)

A vantagem sobre o papel dos biossurfactantes com relação às interações entre os microrganismos e hidrocarbonetos e óleos é no conteúdo de modulação da hidrofobicidade da superfície celular. A alta hidrofobicidade celular não permite os microrganismos de contactar diretamente gotas de óleos

e hidrocarbonetos enquanto que, a baixa hidrofobicidade celular permite a adesão às micelas ou óleos emulsionados (FRANZETTI et al., 2010). A interação de microrganismos com hidrocarbonetos e óleos pode ocorrer por três mecanismos: acesso aos óleos solubilizados em água; contato direto das células com grandes gotas de óleo e contato com óleo pseudosolubilizado ou emulsionado. Durante as diferentes fases de crescimento dos microrganismos, os biossurfactantes podem alterar os modos de adesão aos óleos e hidrocarbonetos (FRANZETTI et al., 2010). Em estudo com *Gordonia* sp. (BS 29) cultivadas em hidrocarbonetos, as células ligadas aos biotensoativos glicolipídicos e bioemulsificantes extracelulares e, durante a fase de crescimento em hexadecano apresentaram mudanças quanto a hidrofobicidade de superfície (FRANZETTI et al., 2009; FRANZETTI et al., 2010).

O mecanismo de bioemulsificação de n-alcano por ramnolípideos de *Pseudomonas aeruginosa* envolvendo a internalização de hidrocarbonetos na célula para a degradação subsequente. A ação do biotensioativo disperso em microgotículas do hexadecano aumenta a disponibilidade do hidrocarboneto para as células bacterianas (CAMEOTRA e SINGH, 2009). Os estudos de microscopia eletrônica indicam que ocorre a absorção das gotas de hidrocarbonetos revestidos pelos biossurfactantes. A internalização em micelas de gotículas de biossurfactante e hidrocarbonetos ou óleos ocorre por um mecanismo similar à pinocitose ativa. (CAMEOTRA e SINGH, 2009). No entanto, mesmo havendo muitos trabalhos de muitos grupos de pesquisadores explicando o papel dos biossurfactantes na degradação de substratos imiscíveis em água, a maioria dos processos, ainda não são claros.

2.7. Mecanismos de Bioissorção

O processo de bioissorção envolve uma fase sólida (adsorvente ou bioissorvente; material biológico) e uma fase líquida (solvente, normalmente água) contendo uma espécie dissolvida para ser sorvida (sorbato, íons metálicos). Devido à maior afinidade do adsorvente ao sorbato, maior é atração e, a remoção pode ocorrer por diferentes mecanismos. O processo continua até que o equilíbrio seja estabelecido entre a quantidade de sorbato imobilizado e a porção remanescente na solução. O grau de afinidade do adsorvente com o

sorbato determina a sua distribuição entre as fases líquida e sólida (NILANJANA e KARTHIKA, 2008).

As principais vantagens da bioissorção em relação aos métodos convencionais de tratamento incluem o baixo custo, alta eficiência, minimização da produção de lodo químico e biológico, regeneração do bioissorvente e possibilidade recuperação de metais (KRATCHOVIL e VOLESKY, 1998). A utilização da bioissorção apresenta algumas desvantagens como por exemplo: saturação rápida dos sítios de interação que os íons metálicos estão ocupando; a dessorção do metal é necessária antes e após a utilização; melhorar o potencial de processos biológicos (engenharia genética de células) é limitado porque as células não são metabolizadas; e não há possibilidade de alterar biologicamente o estado de valências dos metais (AHLUWALIA e GOYAL, 2007).

O mecanismo de bioissorção de metais é um processo complicado. O estado da biomassa (vivas ou não vivas), os tipos de biomateriais, propriedades química da solução do metal, ambientes/condições ambientais, tais como pH, temperatura e outros fatores, influenciam o mecanismo de bioissorção dos metais. A bioissorção de metais por células vivas é mais corretamente denominada como bioacumulação (KADUKOVÁ e VIRCÍKOVÁ, 2005). No entanto, o termo bioissorção tem sido adotado em diversos trabalhos em estudos da aplicação de células vivas no processo de remoção de metais pesados (DU et al., 2012; YUAN et al., 2009; XIE et al., 2013). A bioissorção de metais por microrganismos ocorre em duas etapas: na bioissorção passiva, a ligação é imediata dos íons metálicos aos sítios de ligações presentes na células; e a bioissorção ativa ocorre lentamente, dependente do metabolismo da célula (apenas em células vivas). Na primeira etapa a bioissorção é passiva, independente do metabolismo, este tipo de bioissorção ocorre rapidamente por qualquer ou por combinações de mecanismos de ligação aos metais: complexação, troca iônica, adsorção física (por exemplo, eletrostática) ou microprecipitação inorgânica. A bioissorção passiva é um equilíbrio dinâmico de sistemas reversíveis adsorção-dessorção. Íons metálicos ligados na superfície pode ser eluídos por outros íons, agentes quelantes ou ácidos.

Na bioadsorção passiva, os íons metálicos são adsorvidos na superfície das células através das interações entre os metais e os grupos funcionais exibidos na superfície das células. Todos os íons metálicos antes de ganhar acesso à membrana celular e ao citoplasma da célula se deparam com a parede celular. A parede celular é constituída por uma variedade de polissacarídeos e proteínas e, conseqüentemente, oferece numerosos sítios ativos capazes de se ligarem aos íons de metais (MOHAMAD et al., 2012; RAAMAN et al., 2012, XIE et al., 2013). Diferenças na composição da parede celular entre os diferentes grupos de microrganismos, como exemplo, algas, bactérias, cianobactérias, fungos e outros, podem causar diferenças significativas no tipo e quantidade de íons metálicos que se ligam aos grupamentos químicos presentes nestas estruturas. As paredes celulares de bactérias são principalmente compostas por peptidoglicanos, que são constituídos por cadeias lineares de dissacarídeos (N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico unidos por β -(1,4) com cadeias peptídicas). Em *E. coli* (K12), o peptidoglicano encontrado para ser um potente aglutinante de metais testados e grupos carboxilato foram os principais componentes envolvidos em ligações com metais (HOYLE e BEVERIDGE, 1983). A bioadsorção do metal por células não-vivas é principalmente de modo passivo (WANG et al., 2000; VOLESKY, 1990). A passiva é uma adsorção física ou de permuta iônica na superfície celular, atingindo o equilíbrio de adsorção dentro de 30-40 minutos. Portanto, o modo passivo é independente de gasto de energia, principalmente por meio de grupos funcionais químicos do material, compreendendo, particularmente, a parede celular. (GOYAL et al., 2003). A segunda etapa, que ocorre apenas em células vivas é a bioacumulação ou bioadsorção ativa, em que os íons de metais penetram a membrana celular e entram no interior das células, é dependente do metabolismo relacionado ao transporte e deposição de íons metálicos (NILANJANA e KARTHIKA, 2008).

2.8. Fatores que Afetam a Bioadsorção

Os principais fatores que afetam processos de bioadsorção são (i) a concentração inicial de íons metálicos; (ii) temperatura; (iii) o pH, e (iv) concentração da biomassa em solução. O processo de bioadsorção não é

influenciado pela temperatura na faixa de 20° - 35°C (AKSU et al., 1992). No entanto, o pH parece ser o parâmetro mais importante no processo de bioadsorção, afetando a química da solução de metais, a atividade dos grupos funcionais e a competição da biomassa pelos íons metálicos (FRIIS e KEITH 1998). A concentração de biomassa na solução parece influenciar a adsorção específica; para valores mais baixos de concentração de biomassa demonstram interferência entre os sítios de ligação. Fourest e Roux (1992) invalidaram a hipótese de atribuir a responsabilidade da adsorção específica diminuir devido à falta de concentração do metal na solução. Assim, este fator tem de ser levado em consideração em qualquer aplicação da biomassa microbiana como bioadsorvente.

2.9. Modelos de Equilíbrio de Bioadsorção

Processos de equilíbrio de bioadsorção geralmente são realizados em Erlenmeyers com agitação em laboratórios. O processo de adsorção entre as fases sólida e líquida é um processo mais complexo do que a adsorção de gases. A extensão da bioadsorção depende da interação entre o bioadsorvente e cada um dos constituintes da solução. Uma série de modelos matemáticos (lineares e não-lineares) estão disponíveis na literatura que descrevem as isotermas de bioadsorção. A maioria amplamente utilizada descreve os modelos matemáticos isotérmicos de sorção (MICHALAK et al., 2013). Há diversos modelos matemáticos que descrevem diferentes curvas que representam as dependências das relações das concentrações na entrada e na saída a partir do momento do processo de bioadsorção.

Os testes preliminares de adsorção para sistemas sólido-líquido baseiam-se em dois tipos de investigações: a) testes de sorção de equilíbrio em lote e b) estudos de dinâmica de sorção de fluxo contínuo. O equilíbrio do processo de bioadsorção é frequentemente descrito pela montagem dos pontos experimentais, dados por diversos modelos, geralmente, usados para a representação do equilíbrio de adsorção isotérmica. Dois destes modelos de equilíbrio de adsorção isotérmica são amplamente aceitos e linearizados para sistemas com soluto único, que são as equações de Freundlich (1906) e Langmuir (1916).

Langmuir

$$q_e = \frac{q_{\max} C_{eq}}{K_L + C_{eq}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde q_e é a concentração em equilíbrio do metal adsorvido na biomassa (mg do metal g^{-1} de massa seca do bioissorvente); C_{eq} é a concentração em equilíbrio do metal residual na solução ($mg\ L^{-1}$); K_L é a constante relacionada a energia de adsorção ($mg\ L^{-1}$) e $q_{\max}$ corresponde a quantidade máxima do metal que pode ser adsorvida pelo bioissorvente. Neste ponto, todos os sítios ativos estão ocupados pelos íons e o bioissorvente não pode adsorver mais nenhum íon metálico mesmo aumentando a concentração da solução metálica. Por outro lado, o K_L é o coeficiente de dissociação do complexo soluto-adsorvente, representando a afinidade entre o soluto e o adsorvente, o que significa que um maior valor de K_L corresponde a uma maior afinidade, entre o bioissorvente e os íons metálicos. Este é um modelo teórico para o tipo de adsorção em monocamada.

O outro modelo caracteriza-se por ser uma equação empírica que não está limitado a uma capacidade finita de adsorção como o modelo de Langmuir. Portanto, é aplicável para concentrações baixas e médias de solutos.

Freudlich

$$q_e = K_F C_{eq}^{\frac{1}{n}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde K_F é uma constante relacionada à capacidade de adsorção e $1/n$ está relacionada a intensidades de adsorção.

Estes modelos podem ser aplicados em um determinado pH e utilizado para a modelagem do equilíbrio de bioissorção na presença de um metal. Recentemente, alguns bioissorventes surgiram como materiais sustentáveis, eficazes e de baixo custo. Estes incluem alguns bioissorventes, tais como resíduos agrícolas (bagaço de cana, palha de arroz e outro), fungos, algas, bactérias e leveduras (KRATCHOVIL e VOLESKY, 1998; LODI, 1998). Estudos usando bioissorventes têm demonstrado que tanto células microbianas vivas e mortas adsorvem íons metálicos e oferecem potencial alternativa aos adsorventes convencionais (KNORR, 1991). No entanto, as células vivas estão

sujeitas aos efeitos tóxicos dos metais pesados, resultando em morte celular. Além disso, as células vivas necessitam frequentemente da adição de nutrientes. Por estas razões, o uso de biomassa não viva e células mortas como bioissorventes de metais apresentam vantagens na remoção de íons metálicos. Além disso, as células mortas requerem menores cuidados e manutenção e são baratas (MOFA, 1995). Adicionalmente, a biomassa morta poderia ser facilmente regenerada e reutilizada.

2.10. Bactérias como Bioissorventes

Muitas pesquisas têm identificado uma série de espécies bacterianas potencialmente capazes de acumular metais em meio aquoso. Entre as bactérias, *Bacillus* sp. tem sido identificada com um elevado potencial de sequestrar íons metálicos e tem sido utilizada na preparação de bioissorvente comercial, há algumas décadas (BRIERLEY et al., 1986). Muitos trabalhos recentes têm relatado sobre a bioissorção de metais usando *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* sp., *Mesorhizobium amorphae*, *Rhizobium leguminosarum* (DU et al., 2012; MOHAMAD et al., 2012; RAAMAN et al., 2012; XIE et al., 2013; YUAN et al 2009). A aplicação de bactérias para a recuperação de metais pesados a partir de ambientes aquosos foi realizada por Seki et al. (1998), que estudaram a bioissorção de íons Cd^{2+} e Pb^{2+} por *Rhodobacter sphaeroides* e *Alcaligenes eutrophus* H16. Ilhan et al. (2004) relataram a remoção de íons residuais de Cr^{6+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} em águas industriais por *Staphylococcus saprophyticus*; os valores ótimos de pH para adsorção de Cr^{6+} , Pb^{2+} e Cu^{2+} foram 2,0; 4,5 e 3,5; respectivamente. *Pantoea* sp.(TEM 18) uma espécie de bactéria gram-negativa, foi isolada a partir do tratamento de águas residuais de uma indústria petroquímica, juntamente com outros microrganismos que exibiram maior tolerância ao Cu^{2+} . Os isolados de *Pantoea* sp (TEM18) foram testados no processo de bioissorção de Cr^{6+} , Cd^{2+} e Cu^{2+} pela biomassa bacteriana, além do efeito dos fatores ambientais (pH, concentração do metal, tempo, etc) (OZDEMIR et al., 2004).

As paredes celulares de bactérias gram-negativas são um pouco mais finas do que as da bactérias gram-positivas e também, não são fortemente reticuladas. Elas têm uma membrana exterior, que é composta por uma

camada externa de lipopolissacarídeo (LPS), fosfolípidos e proteínas (REMACLE, 1990). As capacidades de bioadsorção de bactérias gram-positivas e gram-negativas na remoção de Cd^{2+} apresenta diferenças. As glicoproteínas presentes no lado exterior das paredes celulares de bactérias gram-positivas sugere um maior potencial dos sítios de ligação para o Cd^{2+} do que os fosfolípidos e LPS. Portanto, a diferença observada na capacidade de bioadsorção de bactérias gram-positivas ser maior que bactérias gram-negativas está relacionada ao fato das primeiras apresentarem uma camada mais espessa de glicoproteínas (GOURDON et al., 1990).

Outro processo que pode influenciar na capacidade de bioadsorção de íons metálicos por ação das bactérias é a precipitação de minerais biogênicos por oxidação bacteriana, tais como sílica, óxidos de ferro (FORTIN e LANGLEY, 2005) e óxido de manganês (TEBO et al., 1997; 2004). A adsorção de íons metálicos em óxido de Mn biogênico produzido por *Brachy bacterium* sp. tem sido relatada (WANG et al., 2009). Óxidos de Mn biogênicos localizados nas superfícies celulares são capazes de oxidar uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, tais como substâncias húmicas, Cr (III), Fe (II) e As (III) e remover muitos metais pesados, tais como Cu (II), Co (II), Cd (VI), Zn (II), Ni (II) e Pb (II) (FRANCIS e TEBO, 2001; CROAL et al., 2004; KLEWICKI e MORGAN, 1999). Devido à maior área de superfície e a energia de ligação mais elevada por unidade de área, óxidos de Mn biogênicos têm uma maior capacidade para adsorção de cátions metálicos (NELSON et al., 2002).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLUWALIA, S.S.; GOYAL, D.; Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from waste water. **Bioresource and Technology**, v.98, p.2243-2257, 2007.

AKSU, Z.; SAG, Y.; KUTSAL, T. The biosorption of copper by *C. vulgaris* and *Z. ramigera*. **Environmental Technology**, v.13, p.579-586, 1992.

AL-SALEH, E.S.; OBUEKWE, C. Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v.56, p.1-7, 2005.

ALVES, V.D. FREITAS, F. TORRES, C.A.V.; CRUZ M.; MARQUES R.; GRANDFILS C., GONÇALVES M.P.; OLIVEIRA R.; REIS M.A.M. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p.758–764, 2010.

ALVES, V.D.; FERREIRA, A.R.; COSTA, N.; FREITAS, F.; REIS, M.A.M.; COELHO, I.M. Characterization of biodegradable films of a new microbial polysaccharide produced using glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1582–1590, 2011.

AMOR, L.; KENNES, C.; VEIGA, M.C. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. **Bioresource and Technology**, v.78, p.181-185, 2001.

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 Environmental Microbiology**, v.69, p.2608–2615, 2003.

BECKER, A.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. Low-molecular-weight succinoglycan is predominantly produced by *Rhizobium meliloti* strains carrying a mutated ExoP protein characterized by a periplasmic N-terminal domain and a missing C-terminal domain. **Molecular Microbiology**, v.16, p.191–203, 1995.

BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Eds.). **The Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 97-118, 1998.

BECKER, A.; RUBERG, S.; BAUMGARTH, B.; BERTRAM-DROGATZ, P. A.; QUESTER, I.; PÜHLER, A. Regulation of succinoglycan and galactoglucan

biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 4, p. 187–190, 2002.

BECKER, A.; RUBERG, S.; KUSTER, H.; ROXLAU, A.A.; KELLER, M.; IVASHINA, T.; CHENG, H. P.; WALKER, G. C.; PÜHLER, A. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.1375–1384, 1997.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005.

BRIERLEY, J.A.; BRIERLEY, C. L.; GOYAK, G. M.; AMTBIOCLAIMTM: A new wastewater treatment and metal recovery technology, in **Fundamental and applied biohydron metallurgy**, edited by LAWRENCE, R. W.; BRANION, R. M. R.; EBNER, H. G. (Elsevier, Amsterdam) p.291-300, 1986.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G.A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science Total Environmental**, v.407, p.3634–3640, 2009.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. **Pure and Applied Chemistry**, v.82, n.1, p.97–116, 2010.

CAMEOTRA, S.S.; SINGH, P. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. **Microbial Cell Factories**, v.8, p.1–7, 2009.

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono**. 2007. 74f. Dissertação. (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

CASTELLANE, T. C. L. **Composição dos exopolissacarídeos produzidos por diferentes estirpes padrões de rizóbio**. 2004. 95f Monografia (Graduação em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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

CHANDANKERE, R.; JUN, Y.; CHOI, M. M. F.; MASAKORALA, K.; CHAN, Y. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir, **Biochemical Engineering Journal**. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2013.02.018>

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 sedimentattached isolate of freshwater origin. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1381–1393, 2011.

COOPER, J.E. Early interactions between legumes and rhizobia: dis closing complexity in a molecular dialogue. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1355–1365, 2007.

CRESPO-RIVAS, J.C.; MARGARET,I.; HIDALGO, A.; BUENDÍA-CLAVERÍA, A.M.; OLLERO, F.J.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; MURDOCH, P.S.; RODRIGUEZ-CARVAJAL, M.A.; SORIA-DÍAZ, M.E.; REGUERA, M.; LLORET, J.; SUMPTON, D.P.; MOSELY, J.A.; THOMAS-OATES, J.E.; BRUSSEL, A.A.N.V.; GIL-SERRANO, A.; VINARDELL, J.M.; RUIZ-SAINZ, J.E., *Sinorhizobium fredii* HH103 cgs Mutants are unable to nodulate determinate and indeterminate nodule forming legume and overproduce an altered EPS. **The American Phytopathological Society**, v.22, n.5, p.575-588, 2009.

CROAL, L.R.; GRALNICK, J.A.; MALASARN, D.; NEWMAN, D.K. The genetics of geochemistry. **Annual Review of Genetics**, v.38, p.175–202, 2004.

DA COSTA, A.C.A.; DUTA, F.P. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal Microbiology**, v.32, p.1-5, 2001.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**, v.80, p.1011–1015, 2007.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.61, p.47-64, 1997.

DEVI, E.S.; VIJAYENDRA, S.V.N. **Studies on intra and extra cellular polymers of *Rhizobium meliloti***. Dissertation (Master of Science in Applied Microbiology). Periyar University, Salem, 2011.

DU, L-N.; WANG, B.; LI G.; WANG, SHENG.; CROWLEY, D. E.; ZHAO, Y-H. Biosorption of the metal-complex dye Acid Black 172 by live and heat-treated biomass of *Pseudomonas* sp. strain DY1: Kinetics and sorption mechanisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 205– 206, p. 47– 54, 2012.

FIALHO, A.M. et al. Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.79, p.889–900, 2008.

FORTIN, D.; LANGLEY, S. Formation and occurrence of biogenic ironrich minerals. **Earth Sciences Research**, v.72, p.1–19, 2005.

FOUREST, E.; ROUX, J. C. Heavy metal biosorption by fungal mycellial by-products: Mechanisms and influence of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.399-403, 1992.

FRANCIS, C.A.; TEBO, B.M. A multicopper oxidase genes from diverse Mn(II)-oxidizing and non-Mn(II)-oxidizing *Pseudomonas* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.4272–4278, 2001.

FRANZETTI, A.; CAREDDA, P.; RUGGERI, C.; COLLA LA, P.; TAMBURINI, E.; PAPACCHINI, M.; BESTETTI, G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. **Chemosphere**, v.75, p.801–807, 2009.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; SMYTH, T.J.; BANAT, I.M. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. **European Journal Lipid Science Technology**, v.112, p.617–627, 2010.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. **European Journal Biology Chemical**, v.270, p.1365–1380, 2003.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388-398, 2011. doi:10.1016/j.tibtech.2011.03.008

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behavior and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.549–556, 2009.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; TORRES, C.A.V.; CRUZ, M.; SOUSA, ISABEL.; MELO, M.J.; RAMOS, A.M.; REIS, M.A.M. Fucose-containing exopolysaccharide produced by the newly isolated *Enterobacter* strain A47 DSM 23139. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.159–165, 2011.

FREUNDLICH, H. M. F. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 57, p. 385–470, 1906.

FRIIS, M.; KEITH, M. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.320-325, 1998.

GEORGIU, G.; LIN, S.C.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Bioresource Technology**, v.10, p.60-65, 1990.

GEURTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signaling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p.346–352, 2005.

GHOSH, S.; GHOSH, P.; SAHA, P.; MAITI, T.K. The extracellular polysaccharide produced by *Rhizobium* sp. isolated from the root nodules of *Phaseolus mungo*. **Symbiosis**, v.53, n.2, p.75-81, 2011.

GLAZE BROOK, J.; WALKER, G.C. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. **Cell**, v.56, p.661–672, 1989.

GLENN, S.A.; GURICH, N.; FEENEY M.A.; GONZÁLEZ J. E. The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.7077–7088, 2007.

GONZÁLEZ, J.E.; SEMINO, C.E.; WANG, L.X.; CASTELLANO-TORRES, L.E.; WALKER, G.C. Biosynthetic control of molecular weight in the polymerization of the octasaccharide subunits of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, p.13477–13482, 1998.

GOURDON, R.; BHENDE, S.; RUS, E.; SOFER, S.S. Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge, **Biotechnology Letters**, v.12, p.839-842, 1990.

GOYAL N, J.S.C.; BANERJEE, U.C. Comparative studies on the adsorption of heavy metals. **Advances Environmental Research**, v.7, p.311-319, 2003.

GUTIERREZ, T., LEO, V. V., WALKER, G. M., & GREEN, D. H. Emulsifying properties of a glycoprotein extract produced by a marine *Flexibacter* species strain TG382. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p.53–57, 2009.

HOYLE, B.; BEVERIDGE, T. J. Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, p.749-752, 1983.

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 Microbiology Biotechnology**, v.28, p.1367–1373, 2012.

HUANG, W., LIU, Z-M. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v.105, p.113–119, 2013.

JAIN, R. M.; MODY, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth. **Carbohydrate Polymers**, v.89, p.1110– 1116, 2012.

JAMIESON, G. S. Vegetable fats and oils. New York: **The Chemical Catalog**. 444p., 1932.

JANCZAREK, M.; SKORUPSKA, A. Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharides production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n. 6, p. 4132-4155, 2011.

KACI, Y., HEYRAUD, A., BARAKAT, M., HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS producing *Rhizobium* strain from and soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, v.156, p.522-531, 2005.

KADUKOVÁ, J.; VIRCÍKOVÁ, E. Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. **Environment International**, v.31, p. 227–232, 2005.

KANG, S. A.; JANG, K.-H.; SEO, J.-W.; KIM, K. H.; KIM, Y. H.; RAIRAKHWADA, D.; SEO, M. Y.; LEE, J. O.; HA, S. D.; KIM, C. H.; RHEE, S.-

K. In: Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives; Rehm, B. H. M., Eds.; Caister Academic Press: UK,; Chapter 6, p 145, 2009.

KAUSHIK, P.; MALIK,A. Comparative performance evaluation of *Aspergillus lentulus* for dye removal through bioaccumulation and biosorption. **Environmental Science Pollution Research**, v.20, p.2882–2892, 2013.

KIM, G. Hydraulic conductivity change of bio-barrier formed in the subsurface by adverse conditions including freeze-thaw cycles. **Cold Regions Science and Thecnology**, v.38, p.153-164, 2004.

KIRICHENKO, E.V.; TITOVA, L.V.; YA-KOTS, S. The significance of exometabolites in the formation and operation of soybean-*Rhizobium* symbiosis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.5, p.490-493, 2004.

KLEWICKI, J.K.; MORGAN, J.J. Dissolution of b-MnOOH particles by ligands: pyrophosphate, ethylenediaminetetraacetate, and citrate. **Geochim Cosmochim Acta** v.63, p.3017–3024, 1999.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. **Food Technology**,v.45, p.114-122, 1991.

KOSENKO, L.V.; KHAILOVA, G.F.; KORELOV, V.E. Fiziology Biokhim. **Kul's Rast.**, v.33, n.4, p.347-354, 2001.

KRATCHOVIL, D.; VOLESKY, B. Advances in the biosorption of heavy metals. **Trends Biotechnology**., v.16, p.291-300, 1998.

LANGMUIR, I. **Journal of the American Chemical Society**, v.38, p. 2221–2295. 1916.

LEIGH, J. A.; SIGNER, E. R.; WALKER, G.C. Exopolysaccharidedeficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v.82, p.6231–6235, 1985.

LIN, W.-C.; LIEN, C.-C.; YEH, H.-J.; YU, C.-M.; HSU, S.-H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v.94, p. 603-611, 2013.

LODI, A.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Cadmium, zinc, copper, silver and chromium (III) removal from waste waters by *Sphaerotilus natans*. **Bioprocess Engineering**, v.19, p73-80, 1998.

LONG, S.; REED, J.W.; HIMAWAN, J.; WALKER, G.C. Genetic analysis of a cluster of genes required for synthesis of the calcofluor-binding exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.4239–4248, 1988.

MCINTOSH, M.; STONE, B.A.; STANISICH, V.A. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -Dglucans. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.68, p.163–173, 2005.

MENDRYGAL, K.E.; GONZÁLEZ, J.E. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.599–606, 2000.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. State of the Art for the Biosorption Process—a Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.170, p.1389–1416, 2013. DOI 10.1007/s12010-013-0269-0

MOFA, A. S. Plants proving their worth in toxic metal cleanup. **Science**, v.269, p. 302-305, 1995.

MOHAMAD, O.A.; HAO, X.; XIE, P.; HATAB S.; LIN Y.; WEI, G., Biosorption of Copper (II) from Aqueous Solution Using Non-Living *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123. **Microbes Environmental**, v.27, n.3, p.234–241, 2012.

MONTEIRO, N.K; ARANDA-SELVERIO, G.; EXPOSTI, D.T.D.; SILVA, M.L.C.; LEMOS, E.G.M.; CAMPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v.35, n.4, p.705-708, 2012.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Types, production and applications of biosurfactants. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v.1, p.31–55, 2004.

NELSON, Y. M.; LION, L. W.; SHULER, M. L.; GHIORSE, W. C. Effect of oxide formation mechanisms on lead adsorption by biogenic manganese (hydr)oxides, iron (hydr)oxides, and their mixtures. **Environmental Science Technology**, v.36, p.421–425, 2002.

NERURKAR, A. S.; HINGURAO, K. S.; SUTHAR, H. G.; Bioemulsifiers from marine microorganisms. **Journal of Science Industrial Research**, v. 68, p. 273-277, 2009.

NGUYEN, T.T.; YOUSSEF, N.H.; MCINERNEY, M.J.; SABATINI, D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. **Water Research**, v.42, p.1735–1743, 2008.

NIEVAS, M.L.; COMMENDATORE, M.G.; ESTEVAS, J.L.; BUCALÁ, V. Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. **Journal Hazardous Materials**, v.154, p. 96–104, 2008.

NILANJANA DAS, R. V.; KARTHIKA, P. Biosorption of heavy metals—An overview. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, p.159-169, 2008.

NOEL, K.D. Rhizobia. In: Schaechter M (ed) Encyclopedia of microbiology, 3rd edn. Academic Press, New York., p. 261–277, 2009.

OLIVEIRA, M.P. et al. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.177–183, 2007.

OZDEMIR, G.; CEYHAN, N.; OZTURK, T.; AKIRMAK, F.; COSAR, T. Biosorption of chromium (VI), cadmium (II) and copper (II) by *Pantoea* sp. TEM 18, **Chemical Engineering Journal**, v.102, p.249-253, 2004.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGE, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. In **Review: International Journal Molecular Science**, v.12, p.633-654, 2011.

PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E.; SILVA, L.R.; MATEOS, P.F. Key molecules involved in beneficial infection process in Rhizobia-Legume symbiosis. Microbes for legume improvement, **Springer Wien New York**, n.3, p.55-80, 2010.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterail cellulose-based material and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.91, p.1277-1286, 2011.

POTTS, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. **Microbiology Review**, v.58, p.755– 805, 1994.

RAAMAN, N., MAHENDRAN, B., JAGANATHAN C., SUKUMAR S., CHANDRASEKARAN V. Removal of chromium using *Rhizobium leguminosarum*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.28, p.627– 636, 2012.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. The potential of bacterial isolates for emulsification with range of hydrocarbons. **Acta Biotechnology**, v.4, p. 335– 345, 2003.

RAMOS, A.; BOELS, I.C.; DEVOS, W.M.; SANTOS. Relationship between glycolysis and exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.33-41, 2001.

REHM, B.H.A. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives, Caister Academic Press, Ed. 2009.

REINHOLD, B.B.; CHAN, S.Y.; REUBER, T.L.; MARRA, A.; WALKER, G.C.; REINHOLD, V. N. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1997–2002, 1994.

REMACLE, J. The cell wall and metal binding, in *Biosorption of heavy metals*, Ed. by VOLESKY, B. (CRC Press Boca Raton, Florida) p.83-92, 1990.

REMMINGHORST, U.; REHM, B. H. A. In Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives; Rehm, B. H. M., Eds.; Caister Academic Press: UK, Chapter 2, p 13, 2009.

REUBER, T.L.; WALKER, G.C. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. **Cell**, v.74, p.269–280, 1993.

SABRA, W.; ZENG, A.P.; DECKWER, W.D. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 315–325, 2001.

SANDRIN, T.R.; CHECH, A.M.; MAIER, R.M. A rhamonolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, n.10, p.4585-4588, 2000.

SARWAT, F.; QADER, S.A.U.; AMAN, A.; AHMED, N. Production and characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroids* CMG713. **International Journal of Biology Science.**, v.4, p.379–386, 2008.

SCHNEIDER, I.A.H.; SMITH, R.W.; RUBIO, J. Effect of mining chemicals on biosorption of Cu(II) by the non-living biomass of the microphyte *Potamogeton lucens*. **Mineralogy Engineering**, v.12, p.255–260, 1999.

SEKI, H.; SUZUKI, A.; MITSUE, S. L. Biosorption of heavy metal ions on *Rhodobacter sphaeroides* and *Alcaligenes eutrophus* H16, **Journal Colloid Interface Science**, v.197,p.185-190, 1998.

SENTHILKUMAR, V., GUNASEKARAN, P. Influence of fermentation conditions on levan production by *Zymomonas mobilis* CT2. **Indian Journal Biotechnology**, v.4, p.491–496, 2005.

SHARMA, P.K.; RAO, K.H.; FORSSBERG, K.S.E.; NATARAJAN, K.A. Surface chemical characterisation of *Paenibacillus polymyxa* before and after adaption to sulfide minerals. **International Journal Mineralogy Process**, v.62, p.3-25, 2001.

SKORUPSKA, A; JANCZAREK, M; MARCZAK, M; MAZUR, A; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v.5, p.1-19, 2006.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: a General Overview. In *Biosurfactants*; Soberón-Chávez, G., **Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany**, p. 1–11. 2011.

SOUZA MONTEIRO, A. DE., DOMINGUES V.S., SOUZA, M.V.D., LULA, I., GONÇALVES, D.B., SIQUEIRA, E.P. DE, DOS SANTOS, V.L. Bioconversion of biodiesel refinery waste in the bioemulsifier by *Trichosporon mycotoxinivorans* CLA2. **Biotechnology for Biofuels**, v.5, n.29, p.1–12, 2012.

STAUDT, A.K.; WOLFE, L.G.; SHROUT, J.D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v.194, p.197–206, 2012.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal, Barking**, v.11, p.663-674, 2001.

TEBO, B. M.; BARGAR, J. R.; CLEMENT, B. G.; DICK, G. J.; MURRAY, K. J.; PARKER, D.; VERITY, R.; WEBB, S. M. Biogenic manganese oxides:

properties and mechanisms of formation. **Annual Review Earth Planet Science**, v.32, p.287–328, 2004.

TEBO, B. M.; GHIORSE, W. C.; VAN WAASBERGEN, L. G.; SIERING, P. L.; CASPI, R. Bacterially-mediated mineral formation: insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. **Reviews in Mineralogy**, v.35, p.225–266, 1997.

TONELI, J. T.C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, p.181-204, 2005.

ULLRICH, M. Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends, Caister Academic Press. Ed. 2009.

URUM, K.; PEKDEMIR, T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. **Chemosphere**, v.57, p.1139–1150, 2004.

VOLESKY, B.; Biosorption and biosorbents, in **Biosorption of heavy metals**, edited by B Volesky (CRC Press, Boca Raton, Florida) p.3-5, 1990.

VRIESMANN, L. C., Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): structural characterization of a pectic fraction. **Carbohydrate Polymers**, p. 2-4, 2008.

WANG, J. L.; HAN, Y. J.; QIAN, Y. Progress in metal biosorption by microorganisms, **Microbiology**, v.27, p.449-452, 2000.

WANG, T., WANG, N., WANG, T., SUN, W., LI T. Preparation of submicron liposomes exhibiting efficient entrapment of drugs by freeze-drying water-in-oil emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.164, p.151–157, 2011.

WANG, W.; ZONGZE SHAO, Z.; LIU Y.; WANG G. Removal of multi-heavy metals using biogenic manganese oxides generated by a deep-sea sedimentary bacterium – *Brachybacterium* sp. strain Mn32. **Microbiology**, v.155, p. 1989–1996, 2009.

WEI, Y-H., CHOU, C.L., CHANG, J.S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v.27, p. 146–154, 2005.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal Microbiology**, v. 34, p. 415-420, 1988.

XIE, P.; HAO, X.; MOHAMAD, O.A.; LIANG, J.; WEI, G., Comparative Study of Chromium Biosorption by *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123 in Single and Binary Mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.570–587, 2013.

YANG, L., NICKERSON, M.T. AND PAULSON, A.T. Mechanical and physical properties of calcium-treated gellan films. **Food Research International**, v.43, p.1439-1443, 2010.

YORK, G.M.; WALKER, G.C. The *Rhizobium meliloti* *exoK* gene and *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. **Molecular Microbiology**, v.25, p.117–134, 1997.

YUAN, H-P ZHANG, J-H; LU, Z-M; MIN, H; WU, C. Studies on biosorption equilibrium and kinetics of Cd^{2+} by *Streptomyces* sp. K33 and HL-12. **Journal of Hazardous Materials**, v.164, p.423–431, 2009.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polymers**, v.33, p.139-144, 1997.

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

CAPÍTULO - 2 Efeito do íon cobre (bivalente) e cromo (hexavalente) na produção de exopolissacarídeos e células de rizóbios

RESUMO

A presença de elevados níveis de metais pesados tanto no solo como na água tem afetado a biodiversidade presente nestas áreas contaminadas, sendo as comunidades microbianas uma das mais afetadas. A toxicidade provocada pelos íons metálicos pode influenciar de diferentes maneiras as células bacterianas, até mesmo em comunidades microbianas estratificadas, na forma de biofilme. Muito estudo envolvendo a investigação sobre concentração mínima inibitória (CMI) e dose letal (DL_{50}), mas raros são os estudos da ação de metais pesados na produção de exopolissacarídeos (EPS). Diante disto, este trabalho estudou a ação dos íons Cu^{2+} e Cr^{6+} no crescimento celular e produção de EPS de quatro isolados de rizóbios. Estes isolados foram sequenciados e identificados em nível de espécie. Os dados produzidos neste trabalho, identificaram os isolados como sendo *Rhizobium* sp. (SEMIA 4064); *Sinorhizobium meliloti* (LMG 6125); *Sinorhizobium arboris* (LMG 11892) e *Rhizobium tropici* (JAB6). Com relação aos resultados da análise de CMI, os isolados SEMIA 4064, LMG 11892 e JAB6 apresentaram crescimento celular na concentração 2,4 mM do íon cobre e o isolado LMG 6125 a 1,6mM. O ensaio de CMI contendo cromo demonstrou que os isolados LMG 6125; LMG 11892 e JAB6 apresentaram colônias bacterianas na concentração de 0,5 mM de íons Cr^{6+} , já SEMIA 4064 só conseguiu se desenvolver na concentração de 0,1 mM deste metal. Os testes de produção de células demonstraram que em meios contendo os íons metálicos (Cu^{2+} e Cr^{6+}) solução de um único metal ou em mistura, o crescimento celular nestes meios, para todos os isolados, foram em média 10% (biomassa seca) do apresentado no meio controle. Isto é, apesar de demonstrar crescimento celular, houve uma redução de 90% de biomassa quando o meio de cultura continha os íons de metais pesados. A produção de EPS não foi inibida, para os isolados LMG 6125, LMG 11892 e JAB6, em meio (PSY) contendo 0,05 mM de cromo. Já o cobre inibiu a produção de EPS de todos os isolados.

Palavras-chaves: toxicidade, biomassa, metal pesado, biopolímero, bactérias nodulantes

CHAPTER 2 - Action of copper (bivalent) and chromium (hexavalent) under production exopolysaccharides and cells rhizobia

ABSTRACT

The presence of high levels of heavy metals in the soil e water affects biodiversity of contaminated areas. The microbial communities being the most affected. Toxic levels have influenced in different ways on the bacterial cells and even biofilms laminated with microbial communities. There is much research on the study of minimal inhibitory concentration (MIC), lethal dose (LD50), but few studies of the action of heavy metals in the production of exopolysaccharides (EPS). Thus, this work studied the action of Cu^{2+} and Cr^{6+} on cell growth and EPS production of four strains of rhizobia. These isolates were sequenced and identified to the species level. The data produced in this study, isolates identified as *Rhizobium* sp. (SEMIA 4064); *Sinorhizobium meliloti* (LMG 6125); *Sinorhizobium arboris* (LMG 11892) and *R. tropici* (JAB6). The results of the analysis of MIC, the SEMIA 4064, LMG 11892 and JAB6 isolates showed cell growth at a concentration of 2.4 mM copper ion and isolated LMG 6125 to 1.6 mM. The MIC assay containing chromium showed that isolates LMG 6125, LMG 11892 and JAB6 revealed bacterial colonies at a concentration of 0.5 mM Cr^{6+} ions, 4064 SEMIA only managed to grow at a concentration of 0.1 mM of the metal. Production tests of cells showed that media containing metal ions (Cu^{2+} and Cr^{6+}) solution of a single metal or mixed cell growth in these medium, for all isolates, was on average 10 % (dry mass) of the presented in control medium. This is despite the demonstrated cell growth was reduced by 90% when the biomass culture medium containing heavy metal. The EPS production was not inhibited for isolates LMG 6125, LMG 11892 and JAB6 in medium (PSY) containing 0.05 mM of chromium. The copper inhibited the production of EPS of all isolates.

Keywords : toxicity, biomass, heavy metal, exopolysaccharides, nodulating bacteria

1-INTRODUÇÃO

Os despejos de fontes antropogênicas contêm vários íons metálicos em elevadas concentrações. Cromo hexavalente e trivalente estão presentes em águas residuárias de curtumes, pois uma das aplicações deste metal é durante o beneficiamento do couro. O cobre bivalente está presente como fonte residual em inúmeros setores da agro-indústria mas a maior fonte poluidora é através da aplicação de insumos agrícolas. O lançamento de efluentes no corpo receptor hoje, deve cumprir padrões de lançamentos previstos pela Resolução CONAMA 357/2005. Todo efluente produzido deve ser tratado antes de lançado, atendendo a qualidade do rio, que será destinado. No entanto, devido aos lançamentos de fontes difusas, lançamentos clandestinos, falhas no processo de tratamento de águas residuárias e uma ineficiente fiscalização, muitos íons metálicos como também outros tipos de poluentes têm causado inúmeros danos ao meio ambiente.

Dentre os diversos danos causados pelos poluentes inorgânicos e orgânicos, a ação destes compostos sobre a microbiota é de suma relevância, por estes organismos serem a base para diversos nichos ecológicos. A toxicidade dos metais pesados à inúmeros isolados de bactérias tem sido extensivamente estudada. Diferentes abordagens têm sido usadas para estudar a toxicidade dos metais às bactérias, quer como isolados (BABICH e STOTZKY, 1977; KEELING e CATER, 1998; MADHAIYAN et al., 2007; TANGAROMSUK et al, 2002; TOES et al., 2008) ou culturas mistas (SAEKI et al., 2002; ZHANG et al., 2003), em solução, ou em comunidades no solo, na água (OLIVEIRA e PAMPULHA, 2006; RAJAPAKSHA et al, 2004). Para isso, diferentes meios de cultura bacteriológica, com uma ampla gama de concentrações de metais foram relatados quanto a tolerância de bactérias de diversos ambientes contaminados por metais pesados (AMOROSO et al., 2002; CHEN et al., 2006; DUXBURY e BICKNELL, 1983; EL-AZIZ et al., 1991; KIM et al., 2007; MALIK e JAISWAL, 2000; MARTENSSON e TORSTENSSON, 1996; MOHAMAD et al., 2012; PIOTROWSKA-SEGET et al, 2005; RENELLA et al., 2003; ROANE e PEPPER, 2000; SPROCATI et al., 2006; XIE et al., 2013; YILMAZ, 2003). O crescimento, em seguida, era determinado por

diferentes parâmetros, tais como turbidez, biomassa e atividade de enzimas para determinar a sensibilidade por diferentes critérios, como, EC_{50} (Concentração efetiva), MIC (Concentração Mínima Inibitória), DL_{50} (Dose Letal), etc (CLAUSEN, 2000; HASSEN et al., 1998.; SAEKI et al., 2002).

Outro aspecto é o efeito dos íons metálicos sobre a produção de EPS, que são produtos metabólicos que se acumulam sobre a superfície das células microbianas, fazendo com que as células se agreguem e proporcionando proteção por reduzir a exposição química, a estabilização da membrana as variações do ambiente externo, e servindo de fonte de carbono e energia em períodos de escassez (SLAVEYKOVA et al., 2010). Este mecanismo de proteção foi observada em comparações de células bacterianas embebidas em uma matriz de EPS e células desprovidas das mesmas. Tolerância celular parcialmente é devido à ligação e/ou reação dos componentes do EPS com os íons de metais pesados (HENRIQUES e LOVE, 2007). Os EPSs são matrizes de tipo gel formadas por polímeros heterogêneos, compostos por monossacarídeos. Os íons de metais pesados são incorporado por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Alguns trabalhos têm relatado que microrganismos estudados secretam EPS como forma de proteção às células ou a uma complexa estrutura microbiana, contra a toxicidade provocada pelas altas concentrações de metais pesados em ambientes contaminados (CUI e ZHANG 2012; JITTAWUTTIPOKA et al., 2013). No entanto, são raros os trabalhos estudando o efeito de concentrações elevadas dos íons metálicos na produção dos biopolímeros produzidos pelos microrganismos e mais especificamente as rizobactérias. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar a CMI dos íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} e o efeito destes íons sobre a produção de exopolissacarídeos de quatro isolados de rizóbios. O sequenciamento da região 16S rDNA também foi investigados para a identificação dos isolados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de

Jaboticabal. As técnicas utilizadas neste trabalho não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

2.1. Isolados utilizados

Quatro isolados pertencentes à ordem Rhizobiales que apresentaram produção de EPS, em análises prévias, foram utilizados neste trabalho. Dentre estes três já classificados em nível de espécie, foram obtidos do *Laboratorium voor Microbiologie – Universiteit Gent* (Bélgica), LMG 6125 (*Mesorhizobium loti*) e LMG 11892 (*Mesorhizobium plurifarum*) e um isolado obtido junto a *Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária* (FEPAGRO), Rio Grande da Sul, (Brasil) SEMIA 4064 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*). Exceto o isolado identificado como JAB6, que foi indentificado em nível de gênero, neste trabalho. Atualmente todos os isolados fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal.

2.2. Condições e meios de cultivo

Os isolados foram cultivados em meio líquido TY (5,0 g triptona, 3,0 g extrato de levedura; 0,46 g CaCl₂ por litro) à 28°C, com agitação de 150 rpm, durante 48 horas (BERINGER, 1974). Foi retirada uma alíquota de 800,0 µL deste meio de cultivo, e adicionada em 200,0 µL de glicerol. Em seguida, foi congelada rapidamente com nitrogênio líquido e estocada a -80°C, sendo este o estoque definitivo. Além desse estoque, as bactérias também foram mantidas a 4°C em tubos contendo meio TY sólido, sendo este o estoque de trabalho.

2.3. Identificação dos Isolados

2.3.1. Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das bactérias foi realizada segundo o método modificado de MARMUR (1961). Este método foi adotado neste

trabalho devido ter sofrido adaptações para micro tubo tipo “eppendorf”. As células foram cultivadas em meio líquido TY à 28°C, com agitação de 150 rpm por 32 h, a suspensão celular foi centrifugada a $12.000 \times g$ durante 30 min a 4°C, descartando o sobrenadante. O sedimento foi lavado duas vezes com 1000 μL de solução salina (NaCl 0,85%) para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de cultivo. O pellet foi ressuspensionado em 400 μL de solução salina (NaCl 0,85%). Em seguida foram adicionados 40 μL de lisozima (20 mg mL^{-1}), 10 μL de RNase (10 mg mL^{-1}) e 88 μL de SDS 10%, para lise da parede celular e da membrana plasmática e a degradação de RNA. Após, 158 μL de acetato de sódio 3 M foi adicionado, seguido pela extração com 650 μL da mistura de 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. A precipitação do DNA ocorreu adicionando-se posteriormente dois volumes de etanol absoluto (4°C) às amostras. As amostras foram centrifugadas a $15.600 \times g$ por 30 min. a 4°C, e em seguida lavadas com 1000 μL etanol 70%. O DNA obtido foi seco em temperatura ambiente e dissolvido em 200 μL de água ultra-pura estéril por filtração e por autoclavagem (121°C por 15 min).

2.3.2. Técnicas de manipulação do DNA

2.3.2.1. Quantificação em NanoDrop e eletroforese de DNA

O DNA genômico e o fragmento de DNA de interesse devidamente cortado com as enzimas adequadas foram quantificados tanto através de visualização após eletroforese em gel de agarose, bem como pelo auxílio do aparelho NanoDrop ND-1000 (Uniscience). As soluções trabalho de DNA foram diluídas para a concentração final de 50 ng de DNA genômico. Os estoques de DNA permaneceram a -20°C. Para eletroforese foram utilizados géis de agarose (0,7 a 1%) acrescidos em brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). A eletroforese do DNA genômico foi realizada em uma cuba horizontal modelo HORIZON 11-14 contendo tampão TEB 1x [Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3]. As amostras foram diluídas em FsdS (Tris-HCl 65 mmol L^{-1} pH 8,0; EDTA $1,75 \text{ mmol L}^{-1}$, Ficoll® 10%, SDS 1%, azul de

bromofenol 0,02%) e foram aplicadas no gel. A voltagem e o tempo de corrida variaram conforme a amostra que foi analisada ou purificada.

O marcador de tamanho molecular utilizado para servir como referência de migração eletroforética para cálculo dos tamanhos dos fragmentos foi o 1 kb DNA “Ladder” (Fermentas). A revelação do gel foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um aparelho foto-documentador (Bio Rad – Gel Doc 1000), através do “software” Quantity OneR (Bio RadTM, Hercules, CA, USA).

2.3.2.2. Reação de 16S *rRNA* dos isolados

Os DNAs genômicos extraídos dos isolados descritos no item 2.1. tiveram os fragmentos da região 16S *rRNA* amplificados, por técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a identificação do gênero a que pertencem. A reação de amplificação foi realizada para o volume final de 20,0 μL , contendo 2,0 μL do Tampão 10X; 0,6 μL de MgCl_2 50 mM; 0,4 μL de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs) 10 mM; 0,5 μL da enzima Taq Polimerase; 1,0 μL de cada primer universal PA e PC5B a 5 pmol μL^{-1} , 5,0 μL de DNA de cada isolado a 10,0 ng μL^{-1} e 9,5 μL de água Milli-Q ultra pura filtrada e autoclavada. O programa do termociclador modelo PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.) contém 7 ciclos, sendo o primeiro na temperatura de 94°C por 5 minutos, o segundo na temperatura de 94°C por 30 segundos, o terceiro na temperatura de 56°C por 40 segundos, o quarto na temperatura de 72°C por 1 minuto e 30 segundos repetindo os ciclos de 2 ao 4 por 35 vezes, o quinto ciclo na temperatura de 72°C por 7 minutos e o sexto ciclo na temperatura de 4°C por 24 horas. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v), contendo brometo de etídio e tampão de corrida TEB 1X em voltagem constante de 90 V por 1 hora e 30 minutos. O produto de PCR foi purificado utilizando-se do Kit GENECLANR (Bio 101).

As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas, utilizando cada *primer* de forma independente com 80 ng de DNA, 1,0 μL de dye (DYEnamic ET, Amersham Biosciences), Tampão 2,5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl_2), 1,0 μL dos *primers* PA e PC5B (5 pmoles) e 1,0 μL dos

primers internos (3 pmoles): 362f (região 339-362) (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'), 786f (região 746-786) (5'-AAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') e (1203f região 1179-1203) (5'-AGGTGGGGATGACGTCA-3'). Para os *primers* internos, foi utilizado o seguinte programa: desnaturação a 95°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, pareamento a 50°C por 4 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos e, manutenção a 4°C (MENNA et al., 2006).

2.3.2.3 Sequenciamento dos produtos da PCR utilizando o equipamento capilar ABI 3700

Após a reação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento do produto de PCR em microplaca. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g por 45 minutos a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e a placa foi deixada por 5 minutos em temperatura ambiente, invertida em papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70%, e a microplaca foi centrifugada a 3.220 x. g por 10 minutos, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante, e a placa foi invertida novamente sobre papel absorvente para uma breve centrifugação da placa (spin). As amostras foram secas em fluxo laminar por 30 minutos.

2.3.2.4. Análise do sequenciamento e posição filogenética baseada no gene 16S rRNA

Para se verificar a qualidade das sequências geradas, foi utilizado o programa "Sequencing Analysis 3.4", gerando os eletroforogramas que foram submetidos a análise pelo programa "Phred/Phrap/Consed" (GORDON et al., 1998). A seleção das sequências adequadas foi realizada utilizando os programas do pacote Phred/Phrap/Consed, o qual analisa a qualidade das sequências, visualizando graficamente, gerando arquivos no formato "fasta", em que o nível de exigência foi de 200 bases com qualidade Phred maior ou igual a 20 (EWING et al., 1998), auxiliado pelo programa "Contgen.pl".

Preliminarmente, as sequências foram submetidas a consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank através do programa BLAST “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997), em uma “workstation” SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), pelo “site” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/blast>).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas pelo programa “CLUSTALX V.4.0.” (LARKIN et al., 2007) com base no gene 16S rRNA. Além disso, para esta comparação foi realizada a busca de sequências depositadas no GenBank, com o propósito de agrupar as bactérias nos respectivos gêneros. Para matriz de distância foi utilizando o método de construção da árvore *neighbor-joining* (SAITOU & NEI, 1987) e o algoritmo “Jukes-Cantor” (JUKES & CANTOR, 1969), respectivamente processado pelo programa de análise genética de evolução molecular MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007).

2.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Visando conhecer a toxicidade dos metais cobre (Cu^{2+}) e cromo (Cr^{6+}) para os isolados de rizóbios foram realizados testes para verificar a concentração mínima inibitória destes metais. Para isto, foram preparadas soluções estoque de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ na concentração de 1,0 M. As soluções estoques foram preparadas com água deionizada e esterilizada em autoclave a 121°C e 1 atm, durante 15 min. Os isolados foram incubados em 50 mL de meio líquido TY à 28°C e $150 \times \text{g}$ até o platô da fase log. Alíquotas das culturas correspondentes a 10% (v/v) foram transferidas para os tubos de vidro sigmaware (Sigma CAT N° 5916), contendo 5,0 mL do meio líquido TY adicionados dos metais pesados (Cu^{2+} e Cr^{6+}), separadamente, em uma faixa de concentrações de 0,05 - 10,0 mM. Estas concentrações foram adotadas tendo como base dados da literatura (MOHAMAD et al., 2012; XIE et al., 2013). Após o cultivo dos isolados em meio líquido, alíquota de 100 μL foi transferida para placas de Petri contendo meio sólido TY com a respectiva concentração do metal. A CMI foi observada quando os isolados não conseguiram crescer em placas mesmo depois de 10 dias de incubação.

2.5. Efeito de Metais na produção de Biomassa e EPS

Os isolados foram cultivados em meio líquido PSY (CAMPANHARO, 2006) acrescidos com diferentes concentrações e em misturas dos íons metálicos cobre (Cu^{2+}) e cromo (Cr^{6+}). As concentrações dos metais foram determinadas de acordo com os resultados obtidos no item 2.4. As condições de cultivos e composições de cada meio descritos para a execução deste ensaio estão no item 2.5.1. Após o término do tempo de cultivo foram realizadas as avaliações da quantificação da biomassa celular, pH; produção e quantificação dos EPSs (item 2.5.2).

2.5.1. Produção de exopolissacarídeos

Cultura de 24 horas foi inoculada em frascos tipo “erlenmeyer”, com capacidade para 125,0 mL, contendo 50,0 mL de meio líquido PGY (1,4 g K_2HPO_4 ; 1,0 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10,0 g glicerol; 3,0 g extrato de levedura por litro; pH 6,8) (CAMPANHARO, 2006) e, incubado em agitador orbital 150 rpm, 28°C por 24 horas, ou seja, até a obtenção de uma suspensão com leitura de densidade óptica (DO_{600}) igual a 4,6. Alíquotas das culturas correspondentes a 10% (v/v) foram transferidas para frascos tipo “erlenmeyer” de 300,0 mL contendo 100,0 mL do meio líquido PSY (1,2 g K_2HPO_4 ; 0,8 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30,0 g sacarose; 1,0 g extrato de levedura por litro; pH 6,8) (CAMPANHARO, 2006) e incubadas novamente pelo tempo determinado, a 150 rpm e uma temperatura de 28°C. Para este ensaio dos efeitos dos íons metálicos no crescimento celular e na produção de EPS, foram testados de acordo com as concentrações predefinidas pelo teste de CMI (item 2.4). Os tratamentos deste ensaio foram: (i) meio PSY (controle); (ii) PSY + Cr^{6+} 0,05mM; (iii) PSY + Cu^{2+} 0,35mM; (iv) PSY + Cr^{6+} 0,7mM; (v) PSY + Cr^{6+} 0,05mM + Cu^{2+} 0,35mM; (vi) PSY + Cr^{6+} 0,05mM + Cu^{2+} 0,7mM. Todos os quatro isolados foram cultivados nos respectivos meios em duplicata. Os cultivos foram em dois tempos: 72 e 144 horas. Após o término do tempo de cultivo, a cultura foi submetida à centrifugação ($10.000 \times g$, a 4°C, por 50 minutos), separando as células do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado

para aferir o pH e, para a recuperação do EPS, conforme descrito no item 2.5.2..

As células recuperadas (biomassa celular) foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%), novamente centrifugadas ($10.000 \times g$, a 4°C , por 15 minutos), e secas em estufa a 50°C até obtermos massa constante, para que a biomassa celular fosse avaliada por gravimetria. Este ensaio experimental foi feito em duplicata.

2.5.2. Obtenção de EPS produzido pelos isolados

O sobrenadante coletado, conforme descrito anteriormente (item 2.5.1.) foi utilizado para a extração de EPS. O EPS foi precipitado adicionando-se 3 volumes de álcool etílico 96% resfriado e recuperado utilizando um bastão de vidro. O EPS de cada amostra foi transferido para béquers com peso conhecido. O material foi seco em temperatura ambiente e a massa foi aferida até permanecer constante. O produto obtido seco foi conduzido a balança de precisão para a verificação da quantidade obtida de EPS. O volume do frasco foi anteriormente medido antes da precipitação do EPS, em seguida, foi realizada a conversão para g L^{-1} (grama de EPS por litro de meio de cultura). A eficiência relativa na produção de EPS foi avaliada pela relação entre o total de EPS e a biomassa celular.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise da sequência do gene 16S rRNA

As análises do gene 16S rRNA foram realizadas para identificar o isolado JAB 6 que não havia sido identificado e confirmar as identificações dos isolados SEMIA4064, LMG6125 e LMG11892. As análises de sequenciamento dos 1500 pb da região 16S rRNA dos isolados LMG 6125 e LMG 11892, não apresentaram similaridades às espécies que foram anteriormente identificados *Mesorhizobium loti* e *Mesorhizobium plurifarum* respectivamente, sequenciados por Lajudie et al. (1998). A análise da matriz de distância foi executada e o dendrograma obtido pelo método neighbor-joining é mostrado na Figura 1.

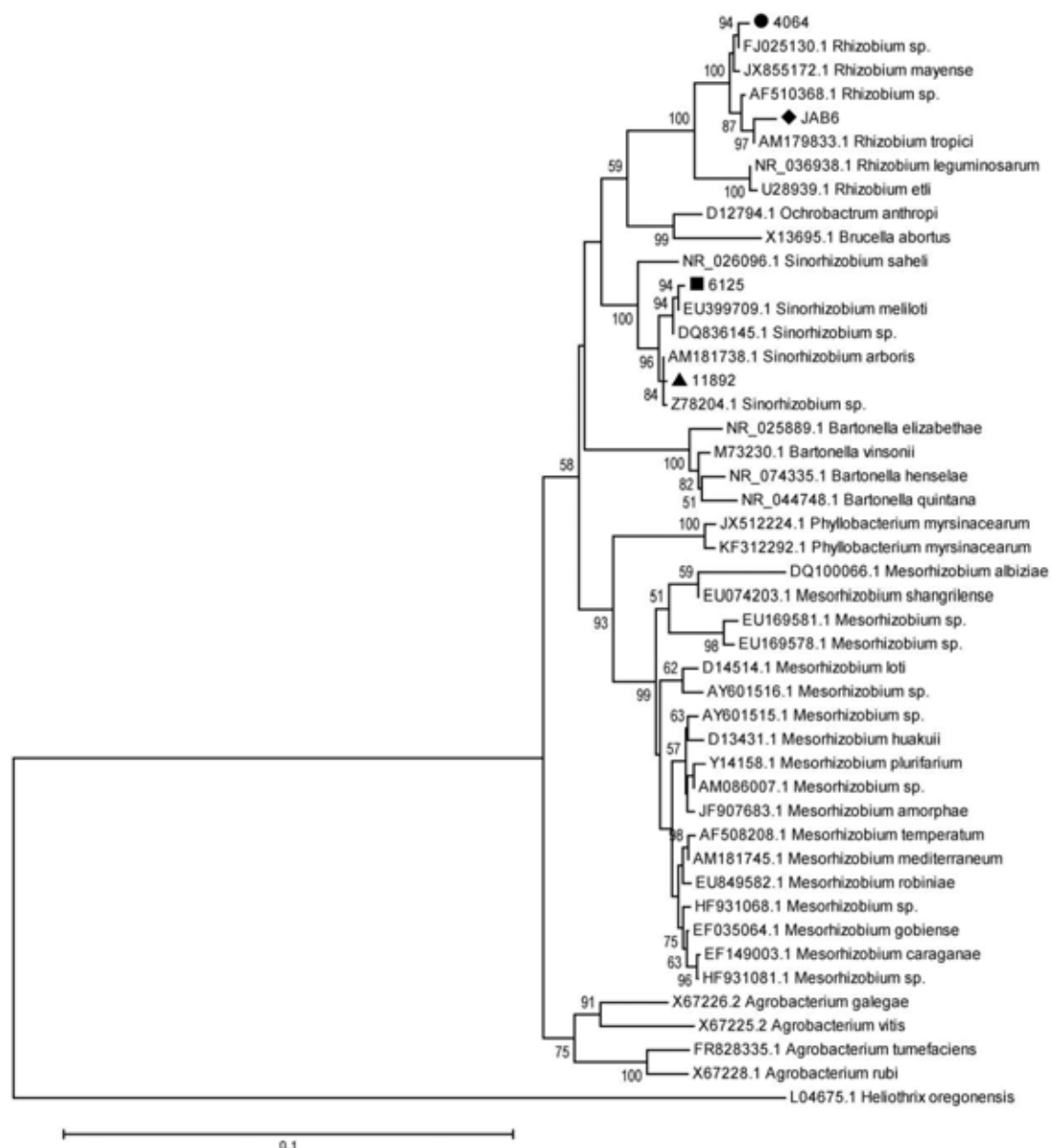


Figura 1. Análise classificatória das sequências do gene 16S rRNA (aproximadamente 1.500 bp) dos isolados: SEMIA 4064 (●), LMG 6125(■), LMG11892(▲) e JAB6 (◆). Para a análise foi utilizado o método Neighbor-joining, com a matriz de substituição de nucleotídeos Jukes-Cantor e bootstrap com 1.000 réplicas. São mostrados apenas os valores de bootstrap $\geq 50\%$. A escala significa 0,1 de substituição de nucleotídeos por posição. A sequência do 16S rRNA de *H. oregonensis* (L04675.1) foi utilizado apenas como grupo externo.

A figura demonstra que os isolados LMG 6125 e LMG 11892 ocupam uma posição separada no dendrograma com outros isolados de *Mesorhizobium*. No entanto, nossas análises de sequenciamento determinaram que estes isolados apresentaram 99% de similaridades com o gênero *Sinorhizobium*.

No trabalho original em que LMG 6125 foi sequenciado os autores ao apresentar os resultados relatam que este isolado apresentou 99,3% de similaridade com outro isolado de *M. loti* (ATCC 33669), em contrapartida, também apresentou maior semelhança com *M. ciceri*, UPMCa7 (99,7% de similaridade) e relativamente perto de IAM 135M (*M. loti*), em um conjunto separadamente. Os autores relatam que níveis relativamente baixos de sequência de 16S rDNA similaridade (97,6-97,7 %), com tensão IAM 13588 sugerem que a identidade do tipo de IAM é estirpe questionável (LAJUDIE et al., 1998). O isolados LMG 6125, sequenciado neste trabalho apresentou 99% similaridades com *Sinorhizobim meliloti* comparando-o com o isolados EU399709.1, com bootstrap de 94%. A similaridade do isolado LMG 11892 foi de 99% entre as sequências com de *S. arbori* (AM181738.1) e *S. sp* (Z78204.1), e bootstrap de 84%. SEMIA 4064 apresentou similaridade com o isolado FJ025130.1 (*Rhizobium sp.*) e JAB6 com o isolado AM179833.1 (*R. tropici*) com 99% de similaridades para ambos e 94 e 97% de bootstrap respectivamente. Os valores de bootstrap demonstra que estes agrupamentos são estatisticamente significativos. Apesar das análises presentes neste estudo demonstrarem que os isolados LMG 6125 e LMG 11892 pertencerem à gêneros e espécies diferente que o determinado em o descrito no primeiro sequenciamento destes isolados, mais estudos são necessários.

3.2. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os resultados demonstraram que os isolados de rizóbio apresentam graus distintos de sensibilidade, quando cultivados em meio TY em diferentes concentrações de cobre e cromo (Tabela 1 e 2). Os isolados SEMIA 4064, LMG 11892 e JAB6 apresentaram crescimento celular até da concentração de 2,4 mM de Cu^{2+} , já o isolado LMG6125 demonstrou ser sensível à esta concentração, crescendo até da concentração de 1,6 mM de Cu^{2+} . O mesmo foi observado por Mohamad et al. (2012), em isolado de *M. amorphae* (CCNWGS0123) que apresentou crescimento celular em meio TY suplementado com 2,2 mM de Cu^{2+} , mostrando elevada resistência ao metal.

Tabela 1 – Efeito das diferentes concentrações de Cu^{2+} na toxicidade de células de rizóbios.

Concentração de Cobre	Isolados			
	4064	6125	11892	JAB6
0,7 mM	+	+	+	+
1,6 mM	+	+	+	+
2,4 mM	+	-	+	+
5,0 mM	-	-	-	-
10,0 mM	-	-	-	-

(+) presença de colônias de células bacterianas
(-) ausência de colônias de células bacterianas

Quando o meio TY foi suplementado com Cr^{6+} os isolados mostraram maior sensibilidade a este metal. Os isolados LMG 6125, LMG 11892 e JAB6 apresentaram crescimento celular até a concentração de 0,5 mM de Cr^{6+} , no entanto, o isolado SEMIA 4064 demonstrou elevada sensibilidade ao cromo apresentando crescimento celular até de 0,1 mM de Cr^{6+} . O isolado de *M. amorphae* (CCNWGS0123) estudado por Xie et al. (2013) apresenta maior resistência as concentrações de cromo hexavalente, demonstrando crescimento na concentração de 1,6 mM de Cr^{6+} . Contudo, os autores utilizaram um microrganismo que apresenta um gene *chrA* que é exportador do cromo presente no interior da célula. Esta característica é um fator que determina resistência, indicando a elevada capacidade da bactéria ao cromo.

Rathnayake et al. (2013) questionam estudo de CMI como forma de avaliar os níveis de íons metálicos na toxicidade dos microrganismos. Estes pesquisadores alegam que os meios de cultura bacteriológica que foram usados continham componentes orgânicos indefinidos, tais como caldo nutriente, peptona, triptona, extrato de levedura e extrato de carne. Outra questão que os autores levantam são as elevadas quantidades de carbono (glicose, gluconato, manitol, etc). O uso dos meios de cultura acima mencionados, em testes de CMI, DL_{50} e outros, resultam em altos níveis de tolerância aos íons metálicos pelas bactérias (MEGHARAJ et al., 2003). As condições presentes nos meios de cultura não refletem a real condição que os microrganismo estão expostos em ambientes contaminados.

Tabela 2 – Efeito das diferentes concentrações de Cr^{6+} na toxicidade de células de rizóbios.

Concentração de Cromo	Isolados			
	4064	6125	11892	JAB6
0,05 mM	+	+	+	+
0,1 mM	+	+	+	+
0,2 mM	-	+	+	+
0,3 mM	-	+	+	+
0,4 mM	-	+	+	+
0,5 mM	-	+	+	+
0,6 mM	-	-	-	-
0,7 mM	-	-	-	-
1,6 mM	-	-	-	-
2,4 mM	-	-	-	-
5,0 mM	-	-	-	-
10,0 mM	-	-	-	-

(+) presença de colônias de células bacterianas

(-) ausência de colônias de células bacterianas

Um outro importante componente do meio de cultura são os tampões de pH. Em meios de cultura, tampões de pH estão presentes em maiores concentrações do que os outros componentes do meio. O fosfato é o tampão mais comum usado em meios microbiológicos. A adição de fosfato em meio de cultura contendo metais pesados pode causar a precipitação dos íons metálicos, como fosfatos insolúveis, reduzindo assim a biodisponibilidade e toxicidade (RATHNAYAKE et al., 2013).

3.3. Efeito de Metais na produção de Biomassa e EPS

Os isolados de rizóbios apresentaram comportamentos distintos quando em meio PSY acrescidos dos íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , em várias concentrações e em mistura (Tabela 3). O isolado SEMIA 4064 apresentou crescimento celular em todos os meios contendo os íons metálicos mas, a quantidade de células presentes nestes meios são equivalentes a 10% do total das células em meio PSY sem a presença dos íons metálicos (Figura 2). A quantidade de células (massa seca) transferida do pré-inóculo para os meios referentes aos tratamentos deste ensaio foi $0,11\text{g L}^{-1}$, com isso demonstramos que houve um pequeno aumento no número de células. A produção de EPS só foi identificada no meio PSY com cromo 0,05mM mais cobre 0,35 mM, em 6

dias de incubação (Tabela 3). Apesar da produção de EPS ser 55% da produzida por este mesmo isolado em meio PSY isento de íons metálicos, este dado é muito significativo em relação a quantidade de células. Com isso, podemos concluir que a concentração de células não é o único fator determinante para a produção de EPS. Alguns autores relatam que a produção de EPS pode ser estimulada em ambientes contaminados com metais pesados (CUI e ZHANG 2012; JITTAWUTTIPOKA et al., 2013).

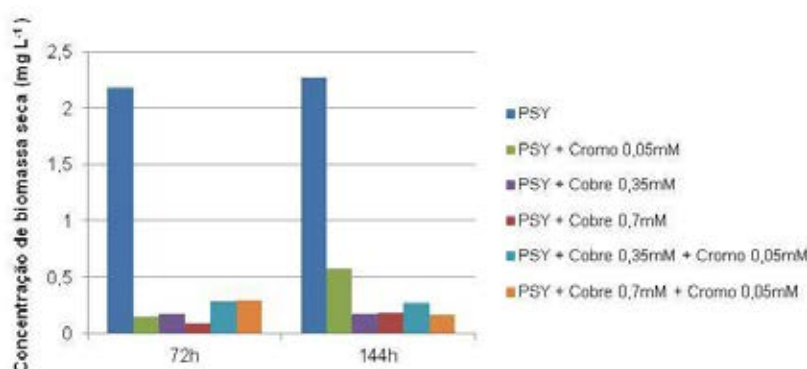


Figura 2. Produção de células do isolado de rizóbio SEMIA 4064, em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

O crescimento celular de LMG 6125 demonstrou ser o menor dentre os isolados, mas este fato já é notado pela quantidade de biomassa celular presente no pré-inóculo ($0,04 \text{ g L}^{-1}$). O Meio PSY + cromo $0,05 \text{ mM}$ demonstrou crescimento celular da bactéria similar ao controle (PSY), apresentando produção significativa de EPS, após 3 e 6 dias. Este fato demonstra que a bactéria não precisou de um tempo para se adaptar e esta concentração de cromo ($0,05 \text{ mM}$) pode não afetar as células. Os demais tratamentos apresentaram baixas taxas de crescimentos de células, chegando até a 5% da condição controle (Figura 3).

O isolado LMG 11892 em todos os meios contendo os íons metálicos, apresentou quantidade de células presentes nestes meios equivalente a 10% do total das células em meio controle PSY, exceto o meio PSY + cromo $0,05 \text{ mM}$ (Figura 4).

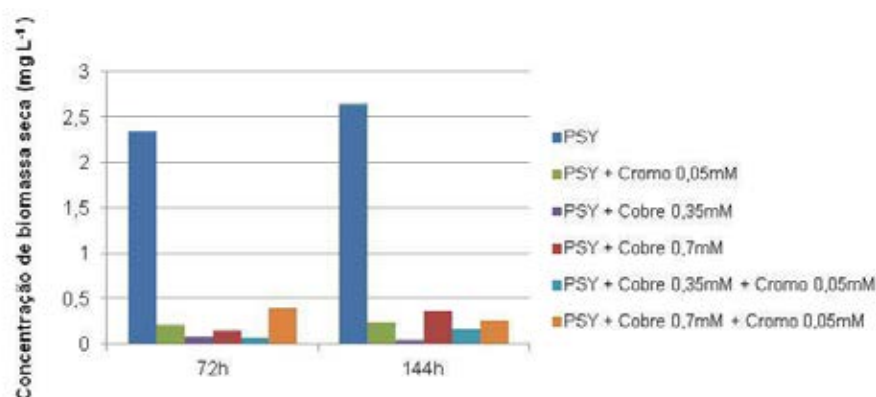


Figura 3. Produção de células do isolado de rizóbio LMG 6125 em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

A quantidade de células (massa seca) transferida do pré-inóculo para os meios referentes aos tratamentos deste ensaio foi $0,06 \text{ g L}^{-1}$. A produção de EPS foi identificada apenas no meio PSY com cromo $0,05 \text{ mM}$ em ambos os períodos de incubação, demonstrando que a presença deste metal nesta concentração não afeta este isolado de bactéria.

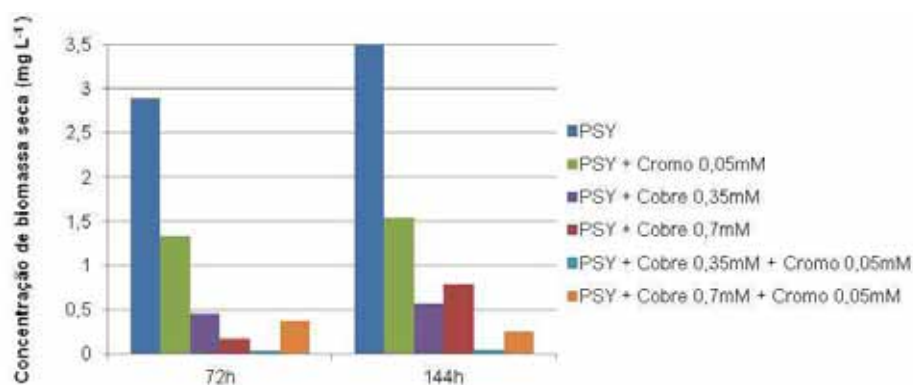


Figura 4. Produção de células do isolado de rizóbio LMG 11892 em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

O isolado JAB6 apresentou um comportamento bem distinto dos demais analisado neste ensaio (Tabela 3 e Figura 5). Produziu exopolissacarídeos no meio PSY + cromo $0,05 \text{ mM}$, em ambos os períodos de incubação testados, com rendimento de 53 e 71%, em relação ao meio controle (PSY). No entanto,

houve um aumento de células de 358% (3 dias) e 57% (6 dias) na presença deste meio, quando comparado ao meio PSY sem a presença do metal. Especulamos que as células deste isolado de rizóbio, em resposta à presença do cromo, sentiu-se ameaçada desencadeando um aumento de síntese celular nos primeiros três dias. Após este período, a biomassa celular pode ter sofrido lise e reutilizada como fonte de carbono para a produção de exopolissacarídeos, como forma de proteger as células à possíveis aumentos na concentração do íon metálico. Os isolados LMG 6125, LMG 11892 e JAB6 mais especificamente, mostraram que o cobre de alguma forma inibe a produção de EPS.

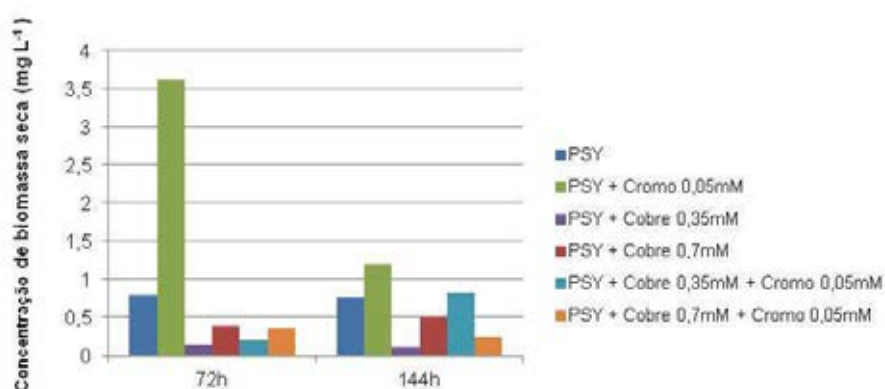


Figura 5. Produção de células do isolado de rizóbio JAB6 em diferentes meios adicionados íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , após 72 e 144 horas de incubação (28°C, 150 rpm).

O crescimento de *R. leguminosarum* não foi inibido até a concentração de 0,5 mM de cromo. As concentrações acima de 0,5 mM provou ser inibidora do crescimento *R. leguminosarum* tanto para o íon Cr (III) quanto Cr (VI) (RAAMAN et al., 2012). Os efeitos dos íons metálicos podem variar entre os organismos, de acordo com as estirpes, a fase de crescimento (vegetativa e reprodutiva), tamanho do organismo e formas, entre outros aspectos (GADD e MOWLL 1985; SABIE e GADD 1990).

O crescimento celular de bactérias diminui em elevadas concentrações de Cr (III) e (VI). Raman e Sambandan (1998) relataram que concentrações elevadas destes íons reduz o teor de proteína durante o desenvolvimento de fungos micorrízicos. A biomassa diminui com o aumento da concentração de cromo em fungos *Laccaria laccata* e *Suillus bovinus* (RAMAN et al., 2002).

Tabela 3. Meios de cultura (PSY₁₀₀-100mL) acrescidos de diferentes concentrações e combinações dos íons metálicos (Cu²⁺ e Cr⁶⁺) e o efeito sobre a produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular dos isolados de rizóbios.

ISOLADOS	PSY + METAIS	EPS		Biomassa		Eficiência Relativa		pH	
		72 h	144 h	72 h	144 h	72 h	144 h	72 h	144 h
		g L ⁻¹		g L ⁻¹		(EPS/Biomassa)			
SEMIA 4064	PSY	3,01	3,48	2,18	2,57	1,85	1,53	6,98	6,83
	Cr ⁶⁺ (0,05mM)	-	-	0,24	0,26	-	-	6,98	6,71
	Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,21	0,28	-	-	7,44	7,43
	Cu ²⁺ (0,7mM)	-	-	0,11	0,26	-	-	6,68	6,71
	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,35mM)	-	1,91	0,28	0,27	-	7,01	7,04	7,18
LMG 6125	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,70mM)	-	-	0,22	0,17	-	-	6,64	7,04
	PSY	2,51	2,75	2,34	2,64	1,08	1,04	7,03	6,53
	Cr ⁶⁺ (0,05mM)	1,69	2,50	2,05	2,82	0,82	0,88	6,40	6,50
	Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,80	0,56	-	-	7,23	7,03
	Cu ²⁺ (0,7mM)	-	-	0,18	0,84	-	-	6,72	6,70
LMG11892	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,07	0,15	-	-	7,32	7,5
	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,70mM)	-	-	0,12	0,25	-	-	6,61	6,91
	PSY	1,50	2,86	2,89	3,88	0,52	0,73	7,03	6,39
	Cr ⁶⁺ (0,05mM)	1,16	2,29	2,83	3,71	0,41	0,62	6,56	6,60
	Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,45	0,57	-	-	7,52	7,40
JAB6	Cu ²⁺ (0,7mM)	-	-	0,71	0,84	-	-	6,60	6,67
	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,41	0,42	-	-	7,44	7,75
	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,70mM)	-	-	0,37	0,25	-	-	6,58	7,05
	PSY	5,34	6,63	0,79	0,76	6,93	8,73	7,01	6,74
	Cr ⁶⁺ (0,05mM)	2,88	4,77	3,62	1,20	0,80	3,98	6,53	6,63
JAB6	Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,50	0,91	-	-	7,49	7,31
	Cu ²⁺ (0,7mM)	-	-	0,51	0,85	-	-	6,68	6,68
	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,35mM)	-	-	0,20	0,82	-	-	7,65	7,86
	Cr ⁶⁺ (0,05mM) + Cu ²⁺ (0,70mM)	-	-	0,34	0,24	-	-	6,70	7,00
	PSY	-	-	-	-	-	-	-	-

- não houve produção de exopolissacarídeos (EPS).

Elevadas concentrações de íons cromo afetam adversamente o crescimento celular de microrganismos, interferindo na síntese dos ácido nucleicos (OGAWA et al., 1989). O desenvolvimento celular foi favorecido quando houve a diminuição do cromo, em doses menos tóxicas presentes no meio de cultura. A adição de cromo novamente levou a uma diminuição na viabilidade celular e o crescimento de células foi retardado dependendo da quantidade de cromo adicionado. Isto pode ser devido à toxicidade de cromo no crescimento microbiano na concentração mais elevada (KHAN, 2001).

Em estudo de três espécies de *Bacillus* spp. os autores relataram que os isolados apresentavam comportamentos diferentes uns dos outros quanto aos níveis de toxicidade de Cd e Cu (RATHNAYAKE et al., 2013). No entanto, os autores supoem que a diferença significativa nos padrões de crescimento e nos níveis de tolerância à cádmio e cobre são devido às diferenças nas composições entre os quatro meios testados. Em pesquisas de laboratório é necessária uma melhor compreensão de como os metais pesados se comportam no meio de cultura utilizado e, como este meio esta representando as reais condições ambientais. Estes fatos são importantes para uma melhor compreensão da interação de microrganismos com metais tóxicos (RATHNAYAKE et al., 2013).

Há pouquíssimos estudos na literatura, em relação a ação dos metais pesados sobre a produção de EPS. Uma pesquisa usando as estirpes de cogumelos *Cordyceps medicinais* e *C. militaris* verificou que a produção de EPS alcançou maiores níveis em meio contendo Mg^{2+} e Mn^{2+} . Já os meios contendo Ca^{2+} e K^+ não aumentaram significativamente a produção exopolissacárideos (CUI et al., 2010). No entanto, não foi encontrado nenhum trabalho relatando a redução ou a não produção de EPS pelos microrganismos, quando adicionado íons metálicos ao meios de cultura que foram cultivados. Diante disto, por não conseguimos trabalhos publicados semelhantes ao nosso, não há como conflitar os resultados obtidos neste trabalho. Com isso, estudos de doses tóxicas de metais pesados agindo na produção de exopolissacarídeos, mais especificamente em relação aos rizóbios, são necessários, uma vez que a produção de EPS está diretamente ligada a formação de nódulos, na relação simbiótica entre microrganismo-planta. Como

se comportam as plantas que dependem da nodulação em ambientes contaminados com metais pesados. Logo, estudos com estas abordagens são necessários.

4. CONCLUSÃO

Os estudos realizados com os isolados de rizóbios, identificados através do sequenciamento do gene 16S rRNA, utilizando um planejamento para avaliar o efeito da concentração dos íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , indicaram que houve influência da presença dos metais no meio de cultivo, em relação à produção da biomassa bacteriana e exopolissacarídeos. Uma vez que quando comparados à condição controle, desprovida dos mesmos íons metálicos, observa-se drasticamente a queda na produção de EPS e biomassa bacteriana. Considerando o potencial biotecnológico de produção de exopolissacarídeos dos isolados, principalmente do isolado identificado e denominado como JAB6, novos estudos devem ser continuados a fim de aperfeiçoar a produção de EPS em condições desfavoráveis de cultivo, como por exemplo, na presença de íons metálicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

AMOROSO, M.J., OLIVER, G., CASTRO, G.R. Estimation of growth inhibition by copper and cadmium in heavy metal tolerant actinomycetes. **Journal Basic Microbiology**, v. 42, p. 231–237, 2002.

BABICH, H., STOTZKY, G. Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 33, p. 681–695., 1977.

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

CAMPANHARO, J. C. **Produção e avaliação de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios**. 2006. 66f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CHEN, B.Y., WU, C.H., CHANG, J.S., An assessment of the toxicity of metals to *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64). **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1880–1886, 2006.

CLAUSEN, C.A. Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. **Waste Management & Research**, v.18, p. 264–268, 2000.

CUI J.-D.; ZHANG Y.-N. Evaluation of Metal Ions and Surfactants Effect on Cell Growth and Exopolysaccharide Production in Two-Stage Submerged Culture of *Cordyceps militaris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1394–1404, 2012. DOI 10.1007/s12010-012-9865-7

DUXBURY, T., BICKNELL, B. Metal tolerant bacterial populations from natural and polluted soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.15, p. 243–250, 1983.

EL-AZIZ, R., ANGLE, J.S., CHANEY, R.L. Metal tolerance of *Rhizobium meliloti* isolated from heavy-metal contaminated soil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 23, p. 795–798, 1991.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175 -185, 1998.

HASSEN, A., SAIDI, N., CHERIF, M., BOUDABOUS, A. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 7–15, 1998.

HENRIQUES, I.D.; LOVE, N.G. The role of extracellular polymeric substances in the toxicity response of activated sludge bacteria to chemical toxins. **Water Research**, v.41, p.4177–4185, 2007.

JITTAWUTTIPOKA, T.; PLANCHON, M.; SPALLA, O.; BENZERARA, K.; GUYOT, F.; CASSIER-CHAUVAT, C.; CHAUVAT, FRANCK. Multidisciplinary Evidences that

Synechocystis PCC6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e55564, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0055564

JUKES,T.H., CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules . In JUKES,T.H.,CANTOR ,C .R. Mammalian protein metabolism. New York: **Academic Press**, 1969.p.21-132.

KEELING, A.A., CATER, G.I.F., Toxicity of copper, lead, nickel and zinc in agar culture to aerobic, diazotrophic bacteria extracted from waste-derived compost. **Chemosphere**, v.37, p. 1073–1077, 1998.

KHAN, A. G. Relation between chromium biomagnification ratio, accumulation factor, and mycorrhizae in plant growth on tannery effluent polluted soil. **Environmental International**, v. 26, p.417–423, 2001.

KIM, S.U., CHEONG, Y.H., SEO, D.C., HUR, J.S., HEO, J.S., CHO, J.S. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp.). **Water Science and Technology**, v.55, p.105–111, 2007.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDSG., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIM, F. , WALLACE, L.M. , WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., HIGGINS, D.G.I Clustal W and Clustal X version 2.0.**Bioinformatics**, v. 23, p.2947-2948, 2007.

MADHAIYAN, M., POONGUZHALI, S., SA, T. Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Chemosphere**, v.69, p.220–228, 2007.

MALIK, A., JAISWAL, R. Metal resistance in *Pseudomonas* strains isolated from soil treated with industrial wastewater. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.16, p.177– 182, 2000.

MARMUR, J; A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. **Journal of Molecular Biology**, v.3, p. 208-218, 1961.

MARTENSSON, A.M., TORSTENSSON, I. Monitoring sewage sludge using heterotrophic nitrogen fixing microorganisms. **Soil Biology Biochemistry.**, v.28, p.1621– 1630, 1996.

MEGHARAJ, M., AVUDAINAYAGAM, S., NAIDU, R. Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. **Current Microbiology**, v. 47, p. 51–54, 2003.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N., MARTINES-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of eleutherizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 315-322, 2006.

MOHAMAD, O.A.; HAO, X.; XIE, P.; HATAB S.; LIN Y.; WEI, G., Biosorption of Copper (II) from Aqueous Solution Using Non-Living *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123. **Microbes Environment**, v.27, n.3, p.234–241, 2012.

OGAWA, T.; USUI, M.; YATOME, C.; IDAKA, E. Influence of chromium compounds on microbial growth and nucleic acid synthesis. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, p.254–260, 1989.

OLIVEIRA, A., PAMPULHA, M.E. Effects of long-term heavy metal contamination on soil microbial characteristics. **Journal Bioscience and Bioengineering**, v.102, p.157–161, 2006.

PIOTROWSKA-SEGET, Z., CYCON, M., KOZDROJ, J. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. **Applied Soil Ecology**, v.28, p.237–246, 2005.

RAAMAN, N., MAHENDRAN, B., JAGANATHAN C., SUKUMAR S., CHANDRASEKARAN V. Removal of chromium using *Rhizobium leguminosarum*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.627–636, 2012.

RAJAPAKSHA, R.M.C.P., TOBOR-KAPLON, M.A., BÅÅTH, E., Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.2966–2973, 2004.

RAMAN, N.; SRINIVASAN, V.; RAVI, M. Effect of chromium on the axenic growth and phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi, *Laccaria laccata* and *Suillus bovinus*. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v.68, p.569–575, 2002.

RATHNAYAKE, I.V.N.; MEGHARAJ M.; KRISHNAMURTI, G.S.R.; BOLAN, N.S.; NAIDU, RAVI. Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity? **Chemosphere**, v.90, p.1195–1200, 2013.

RENELLA, G., ORTIGOZA, A.L.R., LANDI, L., NANNIPIERI, P. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphate activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED50). **Soil Biology Biochemistry**, v.35, p.1203–1210, 2003.

ROANE, T.M., PEPPER, I.L. Microorganisms and metal pollutants. In: Roane, T.M., Gerba, C.P., Pepper, I.L. (Eds.), **Environmental Microbiology**. Academic Press, San Diego, California, London, pp. 403–423, 2000.

SABIE, F.T.; GADD, G.M.; The effect of Zinc on the yeast-mycelium transition of *Candida albicans* and examination of zinc uptake at different stages of growth. **Mycology Research**, v.94, p.952–958, 1990.

SAEKI, K., KUNITO, T., OYAIZU, H., MATSUMOTO, M. Relationships between bacterial tolerance and forms of copper and zinc in soils. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.1570–1575, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v.4, p.406-25, 1987.

SLAVEYKOVA, V.I.; PARTHASARATHY, N.; DEDIEU, K.; TOESCHER, D. Role of extracellular compounds in Cd-sequestration relative to Cd uptake by bacterium *Sinorhizobium meliloti*, **Environmental Pollution**, v.158, p.2561–2565, 2010.

SPROCATI, A.R., ALISI, C., SEGRE, L., TASSO, F., GALLETTI, M., CREMISINI, C. Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. **Science Total Environment**, v.366, p.649–658, 2006.

TAMURA, K. DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA 4: molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Softwarew Version 4.0. **Molecular Biology Evolutionary**, v. 24, p.1596-1599, 2007.

TANGAROMSUK, J., POKETHITIYOOK, P., KRUATRACHUE, M., UPATHAM, E.S. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. **Bioresouce Technology**, v.85, p.103–105, 2002.

TOES, A.-C.M.; DALEKE, M.H.; KUENEN, J. G.; MUYZER, G. Expression of *copA* and *cusA* in *Shewanella* during copper stress **Microbiology**, v.154, p.2709–2718, 2008.

XIE, P.; HAO, X.; MOHAMAD, O.A.; LIANG, J.; WEI, G. Comparative Study of Chromium Biosorption by *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123 in Single and Binary Mixtures **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.570–587, 2013.

YILMAZ, E.I. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. **Research Microbiology**, v.154, p.409–415, 2003.

ZHANG, Y., ZHANG, Z., SUZUKI, K., MAEKAWA, T. Uptake and mass balance of trace metals for methane producing bacteria. **Biomass Bioenergy**, v.25, p.427–443, 2003.

CAPÍTULO 3 – Biossorção de cobre (II) e cromo (VI) em soluções aquosas usando células não-vivas de isolados de rizóbios

RESUMO

A presença de elevada quantidade de cargas predominantemente aniônicas na parede celular faz com que estas estruturas sejam capazes de interagirem fortemente com cátions metálicos. Tal característica desempenha um papel importante no sequestro e imobilização dos íons metálicos, em ambientes contaminados. A utilização de células bacterianas vivas, em tratamentos de água ou solo contaminados, em elevadas concentrações de metais pesados e outros compostos, não é vantajosa. A presença de elevadas concentrações dos contaminantes pode causar toxicidade às células, impedindo que estas se desenvolvam e, cumpram o papel na imobilização e remoção dos contaminantes. Uma estratégia a estes problemas de toxicidades é a utilização de células não-vivas no processo de biorremediação. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar o potencial de células não-vivas, de isolados de rizóbios, como bioabsorventes dos íons Cu^{2+} e Cr^{6+} , em solução aquosa. Para isso, quatro isolados de bactérias pertencentes à ordem Rhizobiales (SEMIA 4064, LMG 6125, LMG 11892 e JAB6) foram investigados quanto à eficiência na remoção de íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , em diferentes tempos (30 min. e 30 horas). Os dados isotérmicos foram analisados de acordo, com o modelo de Langmuir. Após a seleção dentre os quatro isolados que apresentou maior capacidade de remover os íons metálicos. Foi estudado as melhores concentrações do bioabsorvente e dos íons Cu^{2+} e Cr^{6+} , que favoreciam o processo de remoção. Os resultados demonstraram que dos quatro isolados de rizóbios na concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (bioabsorvente) em solução aquosa de 100 mg L^{-1} dos íons Cu^{2+} e Cr^{6+} (separadamente), a melhor taxa de remoção de ambos íons metálicos foi do bioabsorvente LMG 6125 (*Sinorhizobium meliloti*). Diante, do tempo de exposição das células os íons metálicos observamos que não houve diferença significativa entre os tempos de 30 minutos e 30 horas. A maior taxa de remoção foi de Cu^{2+} 56% e Cr^{6+} 57% na concentração do bioabsorvente de $2,5 \text{ g L}^{-1}$, para ambos metais com concentração inicial de 500 mg L^{-1} . O bioabsorvente apresentou melhor

capacidade de bioissorção na dose $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de células mortas. O modelo de Langmuir descreveu bem as isotermas de equilíbrio de sorção para os bioissorventes estudado.

Palavras-chaves: células mortas, bioissorvente, biorremediação, *Rhizobium* spp., metais pesados

CHAPTER 3 – Biosorption of copper (II) and chromium (VI) in aqueous solutions using non-living cells of rhizobial isolates

ABSTRACT

The presence of high amounts of predominantly anionic charges on the cell wall makes these structures are capable of interacting strongly with metal ions. This feature plays an important role in the kidnapping and immobilization of metal ions in contaminated environments. The use of live bacterial cells for treatment of water or soil contaminated with high concentrations of heavy metals and other compounds is not advantageous. The presence of high concentrations of the contaminants may cause toxicity to cells, preventing them from developing and fulfill the role in the immobilization and removal of contaminants. One strategy to problems of toxicity is the use of non-living cells in the bioremediation process. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential of non-living cells of rhizobial isolates, as bissorventes of Cu^{2+} and Cr^{6+} in aqueous solution. For this, four strains of bacteria belonging to the order Rhizobiales (SEMIA 4064, LMG 6125, LMG 11892 and JAB6) were investigated for the removal efficiency of heavy metal ions (Cu^{2+} and Cr^{6+}), at different times (30 minutes and 30 hours). The isothermal data were analyzed according to the Langmuir model. After the selection of the four isolates showed greater ability to remove metal ions. The best concentrations of biosorbent and Cu^{2+} and Cr^{6+} , was studied favoring the removal process. The results showed that the four strains of rhizobia with 0.5 g L^{-1} (biosorbent) in aqueous solution of 100 mg L^{-1} of Cu^{2+} and Cr^{6+} (separately), the best rate of removal of both metal ions was the biosorbent LMG 6125 (*Sinorhizobium meliloti*). The time of exposure of the cells the metal ions observed no significant difference between the times of 30 minutes and 30 hours. The highest removal rate was 56% for ion Cu^{2+} and 57% for ion Cr^{6+} at the concentration of biosorbent 2.5 g L^{-1} for both metals with an initial concentration of 500 mg L^{-1} . The biosorbent showed better biosorption capacity at a dose 0.5 g L^{-1} of dead cells. The Langmuir model described well the equilibrium sorption isotherms for the studied biosorbents.

Keywords: no-living cells, biosorbent, bioremediation, *Rhizobium* spp., heavy metals.

1. INTRODUÇÃO

Muitos metais pesados constituem um risco ambiental global (MEJÁRE e BÜLOW, 2001), sendo de difícil remoção, seja por métodos químicos ou biológicos. Cobre (Cu) e cromo (Cr) são aplicadas em alguns processos no setor agroindustrial tais como, em insumos agrícolas, processamento do couro, galvanização, fabricação de automóvel, mineração, entre outros (OGUNBILEJE et al., 2013). Geralmente esses metais podem ser elementos traços, mas em níveis tóxicos podem causar efeitos carcinogênicos ou mutagênicos. A exposição aguda ao Cu^{2+} e Cr^{6+} pode causar problemas de saúde, como por exemplo, anemia, doenças do fígado e rins, danos cerebrais e morte em última instância (RAUNGSOMBOON et al., 2008; ZHOU et al., 2009). Vários danos ambientais também podem ser causados pela presença de elevadas concentrações de metais pesados, sendo um destes danos a redução da biodiversidade em áreas contaminadas. Com isso, a remoção destes compostos tóxicos de efluentes torna-se uma importante prioridade que se reflete em regulamentos ambientais mais rígidos.

Como forma de atender tais regulamentos, uma série de estudos tem demonstrado a possibilidade de remoção e recuperação de metais pesados de soluções (SAEED et al., 2005; WU, et al., 2009). Métodos tradicionais de remoção incluem precipitação, oxidação/redução, troca iônica, filtração, processos eletroquímicos, separação por membranas e evaporação. No entanto, estes métodos apresentam várias desvantagens como custo elevado, remoção incompleta, baixa seletividade, alto consumo de energia, além de gerar um lodo tóxico de difíceis tratamento e destinação. Estudos visando a busca por adsorventes de baixo custo, que sejam versáteis, apresentem elevada capacidade de adsorção de poluentes e que gerem o mínimo de resíduo, são necessários. Um processo alternativo é a biossorção, que utiliza vários materiais de origem biológica, incluindo bactérias, fungos, leveduras, algas, etc. Estes biossorventes possuem propriedades que conseguem remover metais, diminuindo a concentração de íons de metais pesados presente nos efluentes e em ambientes contaminados. São eficazes em sequestrar rapidamente íons metálicos em soluções complexas (MOHAMAD et

al., 2012; XIE et al., 2013). Por esse motivo, a bioissorção é uma opção ideal para o tratamento de efluentes complexos com grande volume e baixa concentração (VEGLIO e BEOLCHINI, 1997; VOLESKY e HOLAN, 1995).

Um bioissorvente que vem sendo muito estudados são as células bacterianas ativas e inativas (RAAMAN et al., 2012; MOHAMAD et al., 2012; XIE et al., 2013). Contudo bioissorventes não-vivos são preferidos por facilitarem o processo de tratamento prevenindo a toxicidade das células pelos níveis tóxicos de metais pesados. As células microbianas, biopolímeros e estruturas biogênicas, presentes nos microrganismos, apresentam em suas estruturas moleculares uma abundância de grupamentos carregados negativamente. Estes grupamentos prontamente disponíveis formam complexos com íons metálicos através de interações eletrostáticas (HUANG et al., 2013; MOHAMAD et al., 2012; SUTHERLAND, 2001; XIE et al., 2013). Estes processos de complexação são afetados por uma série de fatores, incluindo o pH, temperatura e as cargas presentes nos bioissorventes (HUANG et al., 2013). Alguns estudos têm demonstrado a utilização da biomassa morta na aplicação como bioissorvente. No entanto, a busca por microrganismos com moléculas bioestruturadas com elevada presença de cargas, alta viscosidade, entre outras características é necessária. Raros são os estudos relatando uso de células morta como bioissorvente na remoção de diferentes metais pesados. Diante do exposto, é importante a pesquisa das aplicações de células morta como agentes biorremediadores efetivos, em processos de adsorção de contaminantes metálicos. Com isso, os objetivos do nosso trabalho foram: (i) estudar a capacidade de remoção dos íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} por células mortas de quatro isolados de rizóbios; (ii) analisar se os tempos de exposição das células afetam a taxa de remoção e (iii) investigar algumas condições que favoreçam o processo de adsorção dos íons metálicos por ação do bioissorvente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de

Jaboticabal. As técnicas utilizadas neste trabalho não oferecem risco para o meio ambiente e saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

2.1. Isolados utilizados

Quatro isolados pertencentes à ordem Rhizobiales que apresentaram produção de EPS foram utilizados neste trabalho. Dos isolados, dois foram obtidos do *Laboratorium voor Microbiologie – Universiteit Gent* (Bélgica) LMG 6125 (*Sinorhizobium meliloti*) e LMG 11892 (*Sinorhizobium arboris*), um isolado obtido *Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária* (FEPAGRO) Rio Grande da Sul, (Brasil) SEMIA 4064 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) e JAB6 (*Rhizobium tropici*). Atualmente todos os isolados fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal.

2.2. Condições e meios de cultivo

Os isolados foram cultivados em meio líquido TY (5 g triptona, 3 g extrato de levedura; 0,46 g CaCl_2 por litro) a 28°C, com agitação 150 rpm, durante 48 horas (BERINGER, 1974). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 800 μL deste meio de cultivo, e adicionada em 200 μL de glicerol, em seguida foi congelada rapidamente com nitrogênio líquido e estocada a -80°C, sendo este o estoque definitivo. Além desse estoque, as bactérias também foram mantidas a 4°C em tubos contendo meio TY sólido, sendo este o estoque de trabalho.

2.3. Preparação de Bioissorvente Bacteriano e Solução Iônica de Cobre e Cromo

Os isolados foram previamente cultivado em meio PGY a 28 °C durante 24 h, com agitação, a 150 × g. No final da fase exponencial, as células foram colhidas por centrifugação a 12.000 × g durante 15 min. As células recolhidas foram lavadas três vezes com água destilada, desionizada (ddH₂O) e

esterilizada e, depois submetida a autoclavagem a 121 °C durante 20 min (Li et al., 2010). Os isolados foram ressuspensos para ser designados às soluções dos metais no ensaio de bioadsorção, item 2.4.

As soluções de teste (5 mL cada) contendo Cu^{2+} , Cr^{6+} foram preparadas a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ com uma série graduada nas concentrações de 50 a 500 mg L^{-1} , respectivamente. O pH inicial de cada solução de ensaio foi ajustado para o valor apropriado, HCl 0,1 M ou 0,01 M NaOH antes da adição do EPS.

2.4. Remoção de Cobre e Cromo por EPS e células mortas de Rizóbios

2.4.1. Teste de Screening da capacidades de remoção de Cu^{2+} e Cr^{6+} entre os isolados

As amostras de células mortas dos quatro isolados de rizóbios foram constituídas por uma concentração de 0,5 g L^{-1} (massa seca). E a concentração inicial dos íons metálicos, Cu^{2+} e Cr^{6+} , foi de 100 mg L^{-1} em frascos de 300 mL contendo 100 mL de solução. Os pHs foram ajustado para 5,0 para solução de Cu^{2+} e 4,0 para Cr^{6+} (MOHAMAD et al., 2012; XIE et al., 2013). As amostras foram agitadas a 150 $\times$ g e 28 °C por 30 minutos de 30 horas. Após estes períodos, as amostras foram centrifugadas a 10.000 $\times$ g durante 15 minutos. As amostras remanescentes de Cu e Cr no líquido sobrenadante foram determinadas por espectroscopia de absorção atômica com chama. Os valores da capacidade de bioadsorção e taxa de remoção de Cu^{2+} e Cr^{6+} foram avaliados da seguinte forma (CHENG et al., 2008).

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{B} \quad (\text{equação 1})$$

$$\text{Taxa de Remoção (\%)} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

Onde q_e é a capacidade de adsorção dos metais Cu^{2+} e Cr^{6+} por concentração do bioadsorvente ($\text{mg do metal g}^{-1}$ de massa seca de bioadsorvente); C_0 é a concentração inicial de íon metálico (mg L^{-1}), C_e é a concentração residual do metal na solução em equilíbrio com o bioadsorvente (mg L^{-1}), e B é a concentração de células mortas (g L^{-1} massa seca).

2.4.2. Efeito da concentração inicial dos íons metálicos e da dose do bioissorvente

A amostra de células mortas que apresentou melhor taxa de remoção dos íons metálicos (item 2.4.1.) foi selecionada para os ensaios de estudo de concentração inicial de Cu^{2+} e Cr^{6+} e dose de bioissorvente no processo de remoção dos íons metálicos. As amostras foram constituídas por uma concentração inicial de Cu^{2+} e Cr^{6+} variando de 50, 100, 300 e 500 mg L^{-1} com doses de células mortas que variaram 0,5; 1,5 e 2,5 g L^{-1} de massa seca. O pH foi ajustado para 5,0 para Cu^{2+} e 2,0 para Cr^{6+} , as amostras foram agitadas a $150 \times \text{g}$ e 28°C por 30 minutos (MOHAMAD et al., 2012; XIE et al., 2013). Os íons residuais de Cu e Cr foram analisados de acordo com o item 2.4.1..

2.5. Isoterma de Bioissorção

Para determinar o equilíbrio da bioissorção de Cu^{2+} e Cr^{6+} , pelos bioissorventes, utilizou-se a dose $0,5 \text{ g L}^{-1}$, das células mortas dos quatro isolados, separadamente testados. Os bioissorventes foram suspensos em cada solução de Cu^{2+} e Cr^{6+} com concentração inicial 100 mg L^{-1} em diferentes tempo de agitação. A concentração dos metais na suspensão foi medida após 30 minutos e 30 horas de incubação a 28°C e 150rpm. Foi utilizado a equação da isoterma de Langmuir para determinar a característica dos parâmetros de bioissorção simulados no experimento.

$$\frac{C_{eq}}{q_{eq}} = \frac{K_L}{q_{max}} + \frac{C_{eq}}{q_{max}} \quad (\text{equação 3})$$

$$q_{eq} = \frac{q_{max}K_L C_{eq}}{1 + K_L + C_{eq}} \quad (\text{equação 4})$$

Onde q_{eq} é a concentração de equilíbrio do metal na biomassa (g^{-1} bioissorvente seco mg do metal), q_{max} é a concentração máxima do metal sobre a biomassa (g^{-1} bioissorvente seco mg metal), K_L é uma energia de adsorção relacionada constante de Langmuir (mg L^{-1}) e C_{eq} é a concentração de equilíbrio de metal na solução (mg L^{-1}).

Outro parâmetro essencial da isoterma de Langmuir é R_L , que pode ser calculado de acordo com a seguinte equação:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \quad (\text{equação 5})$$

Onde, R_L indica o perfil da isoterma e a natureza do processo de biossorção ($R_L > 1$: desfavorável; $R_L=1$: linear; $0 < R_L < 1$: favorável; $R_L=0$: irreversível) (LIN et al., 2012).

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos dos foram analisados pelo Software R, submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre médias de tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Screening da capacidades de remoção de Cu^{2+} e Cr^{6+} pelos isolados

A seleção de um isolado que apresentasse melhor taxa de remoção do íon cobre e cromo, através da aplicação de células mortas como biossorvente, têm seu resultados ilustrados nas figuras 1 e 2. Os ensaios analisaram a dose $0,5 \text{ g L}^{-1}$ dos quatro isolados de rizóbio aplicados em soluções de cobre e cromo na concentração de 100 mg L^{-1} , que foram mantidos por agitação (150 rpm) a 28°C por 30 minutos e 30 horas. Os resultados deste ensaio demonstram que de todos os isolados testados os isolados LMG 6125 e JAB6 apresentaram taxas semelhantes de remoção de cobre. Os tratamentos com os biossorventes LMG6125 e JAB6 não demonstraram diferença estatística nos tempos 30 minutos e 30 horas. Apesar deste fato, a aplicação das células mortas de *S. meliloti* (LMG 6125), como biossorvente, se torna mais interessante por apresentar taxas mais altas de remoção do íon cobre em períodos de tempos menores. Já na seleção do melhor biossorvente para remoção de cromo foi observado que o isolado LMG 6125 foi o que melhor removeu o íon metálico, em ambos os tempos testados. No entanto, os dados

demonstram que o tempo de trinta horas é representado por maiores taxas de remoções de cromo, para todos os bioissorventes testados.

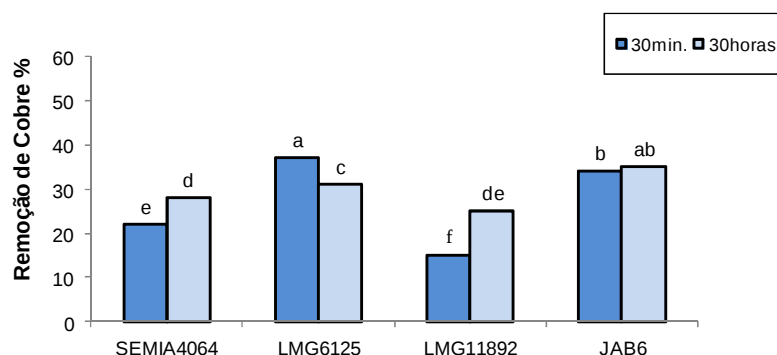


Figura 1. Screening da ação das células mortas dos isolados de rizóbios (0,5 g L⁻¹) na remoção de Cu²⁺ (C₀=100mg L⁻¹), 28°C, 150rpm após 30 minutos e 30 horas.

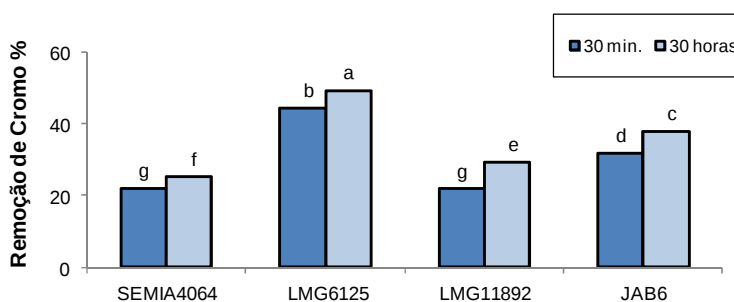


Figura 2. Screening da ação das células mortas dos isolados de rizóbios (0,5 g L⁻¹) na remoção de Cr⁶⁺ (C₀=100mg L⁻¹), 28°C, 150rpm após 30 minutos e 30 horas.

3.2. Efeito da concentração inicial dos íons metálicos e da dose do bioissorvente na remoção de metais

De acordo com os resultados obtidos no item 3.1, o isolado LMG 6125 foi selecionado para o estudo do efeito da concentração do sorvente e do soluto, no processo de adsorção de ambos os metais. Os resultados da adsorção de cobre bivalente em diferentes concentrações do metal (50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹) por células mortas (LMG 6125) em diferentes concentrações do bioissorventes (0,5; 1,5 e 2,5 g L⁻¹) estão apresentados nas figuras 3 e 4. Os resultados demonstraram que a maior taxa de remoção de cobre pela biomassa

rizobiana mortas de LMG 6125, foi na concentração inicial de 500 mg L⁻¹. As taxas de remoção de Cu²⁺ foram 43; 57 e 65,5%, para as doses de biossorvente 0,5; 1,0 e 2,5 g L⁻¹, respectivamente. As menores eficiências de remoção do cobre foram na concentração de 100 mg L⁻¹, (11, 11 e 28%, respectivamente).

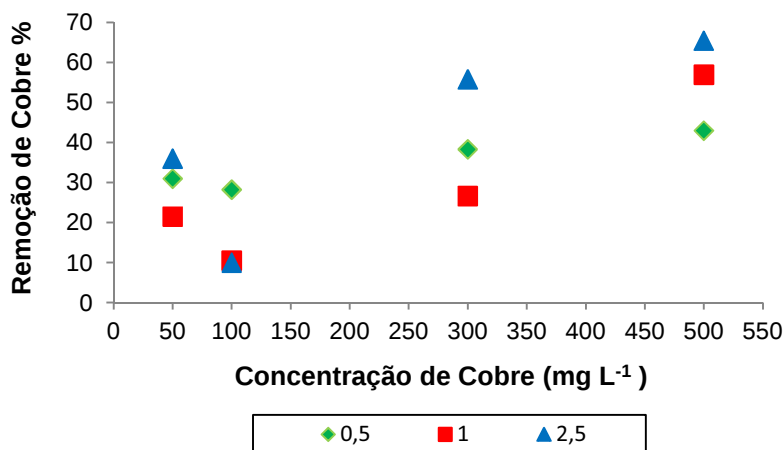


Figura 3. Eficiência de remoção de Cu²⁺ por células mortas do isolados LMG 6125 com varias concentrações iniciais de cobre bivalente 50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹ com varias doses de biossorvente 0,5; 1,5 e 2,5 g L⁻¹.

A dose de biossorvente utilizada para este estudo é um parâmetro importante, uma vez que determina a capacidade de biossorção (mg g⁻¹). A capacidade de LMG 6125 em biossorver íons do metal cobre bivalente está ilustrados na figura 4. A capacidade máxima de biossorção pelas células mortas foi observada na concentração de 0,5 g L⁻¹. Os valores obtidos demonstraram que esta dose do biossorvente consegue adsorver 31; 56; 230 e 430 mg g⁻¹ de cobre na concentrações iniciais 50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹ respectivamente, demonstrando que a dosagem do biossorvente influencia fortemente o grau de biossorção. Em muitos casos, suspensões com menores concentrações de biossorvente produziram mais absorção e menor eficiência de remoção (TANGAROMSUK, et al., 2002). Ao mesmo tempo, os resultados mostraram que ao aumentar a concentração do biossorvente para 2,5 g L⁻¹, apesar da taxa de remoção ser maior nesta concentração do biossorvente (Fig. 3); a quantidade de soluto adsorvido por unidade massa de biossorvente diminuiu significativamente quando comparado com a dose 0,5 g L⁻¹, apresentando valores 4, 7, 67 e 131 mg g⁻¹. A resposta mais importante, estava na dosagem alta do absorvente onde o soluto disponível não ligou-se aos sítios

ativos presentes na parede celular das células bacterianas (biossorvente), resultando em baixa absorção do soluto (TANGAROMSUK, et al., 2002; MOHAMAD et al., 2012). Outros aspectos são devido a interação eletrostática com o aumento de grandes quantidades de biomassa (DÖNMEZ e AKSU, 2002) interferindo nas cargas presentes nos sítios de ligação. O aumento da dosagem do biossorvente pode não ser anulada, pois isso irá resultar em baixa adesão específica entre o soluto e o sorvente (GADD, et al., 1988).

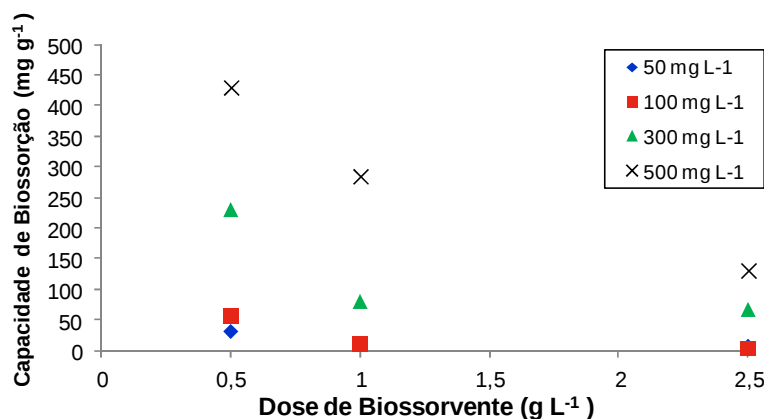


Figura 4. Capacidade de biossorção de células mortas do isolado LMG 6125 em diferentes concentrações do biossorvente (0,5; 1,5 e 2,5) g L⁻¹ sobre a concentrações iniciais de cobre bivalente (50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹).

Os resultados experimentais quanto a biossorção de cromo em concentrações iniciais (50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹), por células mortas de *risóbio* isolado LMG 6125 estão ilustrados nas figuras 5 e 6. A taxa de remoção de cromo hexavalente que demonstrou melhores resultados na concentração inicial de 500 mg L⁻¹ do íon Cr⁶⁺, apresentando 48; 43 e 57% para as dose do biossorvente (0,5; 1,0 e 2,5 g L⁻¹), respectivamente. As menores eficiências de remoção do cobre foram na concentração de 100 mg L⁻¹ com 6 e 16% nas doses 0,5 e 1,0 g L⁻¹, respectivamente. A concentração de biossorvente que apresentou melhores taxa de remoção do íon Cr⁶⁺ foi a 2,5 g L⁻¹.

Muitos pesquisadores têm enfatizado que a concentração inicial de íons desempenha papel importante na processo de biossorção em soluções aquosas (ZUBAIR et al., 2008; XIE et al., 2013). Em estudo semelhante, investigando a ação de *M. amorphae* (CCNWGS0123) como biossorvente de Cr (III), e Cr (VI), após 24h de exposição as células vivas, foram apresentaram

remoção máxima de 49% para o Cr (VI) e 61% para Cr (III), em solução aquosa. Os autores relatam que houve um aumento abrupto na capacidade de adsorção e uma menor quantidade de Cr (III) e Cr (VI) foram removidos pelo bioissorvente. Este fato pode ser explicado uma vez que a eficácia dos grupos funcionais para adsorção está intimamente relacionada com a concentração de íons. Mostrando que à medida que a concentração inicial dos íons aumentou, houve um número maior de mols de Cr (III) e Cr (VI) aderidos à superfície das células, representando que mais sítios se tornaram disponíveis na biomassa (XIE et al., 2013). Resultados semelhantes têm sido confirmado na adsorção de cobre, zinco usando *Pinus sylvestris* e *Streptomyces ciscaucasicus* por Uzun et al. (2009) e Li et al. (2010), respectivamente.

O perfil dos dados obtidos neste trabalho é diferentes dos descritos nos trabalhos citados. Observamos que até a concentração de 100 mg L^{-1} , todas as concentrações do bioissorvente se apresentam em uma curva ascendente. Contudo, quando observamos as concentrações do íons cromo de 300 e 500 mg L^{-1} a curva representa atingir um platô, demonstrando claramente que apesar de aumentarmos a concentração de íons na solução, em todas as doses testadas a taxa de remoção se manteve. É evidente que é muito importante considerarmos a concentração para o processo de remoção. Levando-se em conta que nosso estudo foi baseado em ensaios de soluções iônicas e suspensões de células e a água como um fluído torna possível que as moléculas, íons e estruturas complexas, entre outros, se organizem entre si, até atingir o equilíbrio.

A capacidade de bioissorção de cromo hexavalente pela ação da biomassa morta demonstrou melhores resultados na concentração do bioissorvente de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, apresentando 6; 56; 270 e 480 miligramas do íon Cr^{6+} adsorvido por grama de bioissorvente, nas concentrações iniciais (50, 100, 300 e 500 mg L^{-1}), respectivamente. Enquanto isso, a capacidade de adsorção de íons diminuiu com o aumento da dosagem da biomassa este fato se deve, porque os íons Cr foram insuficientes para cobrir todos os sítios de ligação do bioissorvente, o mesmo observado na capacidade bioissorção de íons cobre (Figura 4). Doses elevadas de bioissorvente demonstram ter capacidade reduzida de adsorção se compararmos aos tratamentos com doses menores.

Para a concentração do bioissorvente de 2,5 g L⁻¹ a capacidade de bioissorção foi de 9; 19; 66 e 114 mg de Cr⁶⁺ por g do bioissorvente, nas concentrações de 50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹, respectivamente.

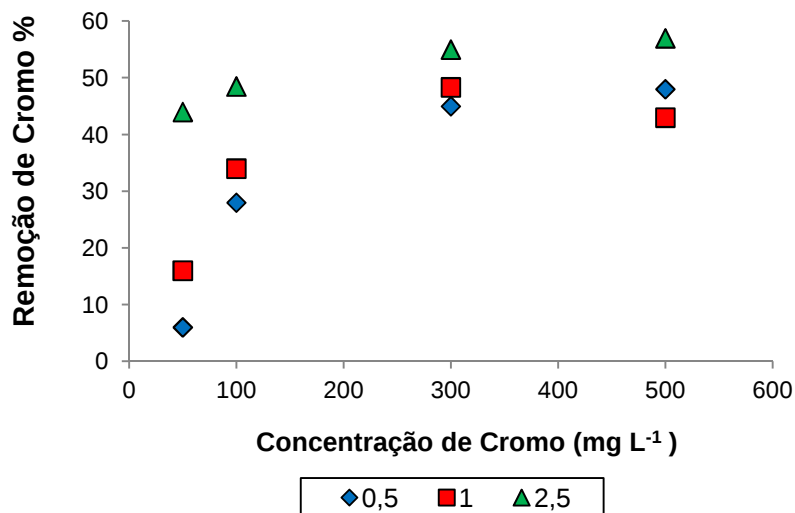


Figura 5. Eficiência de remoção de Cr⁶⁺ por células mortas do isolados LMG 6125 com varias concentrações iniciais de cromo hexavalente (50, 100, 300 e 500 mg L⁻¹) com várias doses de bioissorvente (0,5; 1,5 e 2,5 g L⁻¹).

Fica claro, que com o aumento do bioissorvente ocorre uma redução da interação dos íons cátions presentes na solução e o bioissorvente (aniônico). Este fato se dá, pois as amostras com concentrações maiores de células, o espaço entre estas diminuiu. Isto é, uma célula encontra-se mais próxima da outra em amostras de concentração 2,5 g L⁻¹ que em amostras com concentração 0,5 g L⁻¹. Sendo as estruturas externas das células bacterianas de natureza químicas, aniônicas e estando em solução catiônica ocorre assim a interação eletrostática, entre as moléculas e íons, por processo físico-químicos com as forças de van der Waals. As amostras que apresentam maiores concentrações de células, por estarem umas mais próximas às outras ocorre a formação de aglomerados de células. Estes aglomerados formados por complexações de células e íons metálicos fazem com que ocorra a perda da área de superfície, este fato, pode explicar o porquê das capacidades de bioissorção ser tão reduzida em concentração mais elevadas do bioissorvente.

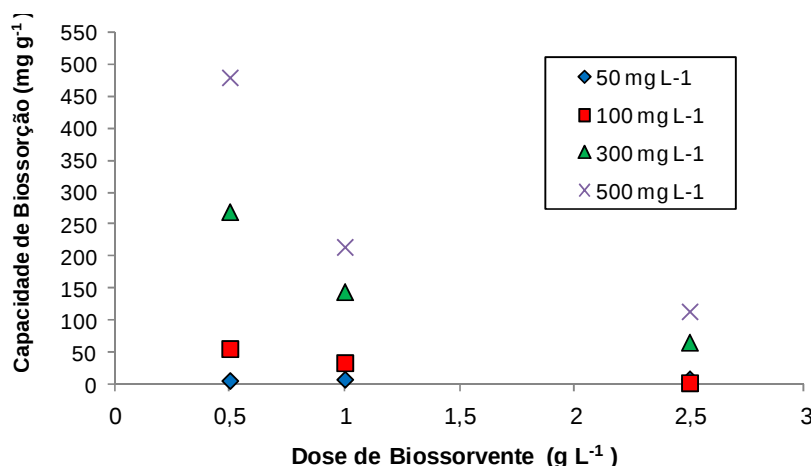


Figura 6. Capacidade de biossorção de células mortas do isolado LMG 6125 em diferentes concentrações do biossorvente (0,5–2,5) g L⁻¹ sobre a concentrações iniciais de cromo hexavalente (50 - 500 mg L⁻¹).

Os metais biossorvidos inativam biomateriais que estavam envolvidos na complexação entre os íons metálicos e os vários grupos, tais como amina, carboxila, fosfato, hidroxila, etc, presentes na superfície da célula. Os grupos funcionais presentes na superfície da célula poderiam ser identificados com base na densidade de carga de superfície em diferentes valores de pH (HE e TEBO, 1998); a densidade de carga negativa aumentou linearmente a partir de pH 3,0 a 4,0 (HUANG e LIU, 2013). Os mesmos autores concluíram que a carga negativa entre pH 3,0 e 4,0 poderia ser pronunciada devido aos grupos carboxílicos, enquanto que o fosfato e os grupos hidroxilas foram responsáveis por cargas negativas em maiores valores de pH (4,0-7,0) e, cargas positivas em pH baixo (< 3,0) pode ser atribuído aos grupos aminas nas superfícies das células.

3.3. Isoterma de Biossorção

A comparação entre os quatro isolados de rizóbio como biossorvente foi determinada e, finalmente, as isotermas foram ajustadas para comumente serem usadas como modelo de biossorção isotérmica. Os parâmetros isotérmicos referentes à remoção de cobre pelos quatro isolados em diferentes tempos de agitação estão contidos na Tabela 1, de acordo com o modelo de Langmuir. Os dados apontam que os isolados LMG 6125 e JAB6 apresentam valores semelhantes de $q_{\max}$ (máxima quantidade de metal que o biossorvente pode adsorver). Em relação ao tempo de agitação, o maior tempo em que os

biossorventes estavam em contato com o soluto (cobre) teve influência, demonstrando maiores valores de $q_{\max}$ para os isolados SEMIA 4064 e LMG 11892. No ponto $q_{\max}$, todos os sítios ativos foram ocupados pelos íons e, o material não pode ser mais adsorvido pelo biossorvente ou ainda qualquer outro metal, mesmo se a concentração na solução for aumentada. Os valores de K_L nestes ensaios demonstraram que os isolados apresentam uma baixa afinidade pelo cobre bivalente. Pois os valores de K_L (que representa o coeficiente de dissociação do complexo soluto-adsorvente) são relativamente baixos.

Tabela 1. Parâmetros de Langmuir representando a isoterma de biossorção de células mortas dos quatro isolados de rizóbios nos tempos de 30 minutos e 30 horas, em pH 5,0, concentração de 100 mg L^{-1} de cobre e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de biossorvente.

BIOSSORVENTES	Tempo	Parâmetros de Langmuir		
		$q_{\max}$	K_L	R_L
SEMIA4064	30 min.	44,01	0,013	0,4326
	30 horas	56,01	0,014	0,4143
LMG6125	30 min.	74,02	0,016	0,3833
	30 horas	62,01	0,014	0,4044
LMG11892	30 min.	30,01	0,012	0,4513
	30 horas	50,01	0,013	0,4237
JAB6	30 min.	68,02	0,015	0,3940
	30 horas	70,02	0,015	0,3905

Os parâmetros isotérmicos de acordo com o modelo de Langmuir, para a remoção do cromo hexavalente pelos biossorventes (células mortas dos quatro isolados) nos diferentes tempos de agitação estão contidos na Tabela 2. Os dados demonstram que dos biossorventes testados, LMG 6125 apresentou o maior valor de $q_{\max}$ no tempo de 30 minutos, indicando que as células bacterianas apresentam elevada capacidade de adsorver íons cromo hexavalente. Por outro lado, K_L que é o coeficiente de Langmuir que representa a afinidade entre o soluto e o adsorvente, o que significa que um valor mais elevado de K_L corresponde a uma afinidade elevada. Os valores de K_L neste ensaio demonstraram uma baixa afinidade entre os biossorventes e os íons cromo hexavalente. No entanto, o biossorvente produzido pelo isolado LMG 6125 apresentou os maiores valores de K_L . De acordo, com os parâmetros correlacionados na tabela 2, podemos concluir que o cromo necessita de tempos maiores para uma adsorção máxima, pelos biossorventes testados. A

adsorção é do tipo física, por ação de forças eletrostáticas, este tipo de adsorção é apontado uma vez que o bioissorvente é por biomassa não viva (não depende de metabolismo) e pelo tempo que leva para atingir $q_{\max}$ (30 a 40 minutos). Isto nos mostra que o modelo de Langmuir é o modelo mais apropriado para este ensaio, pois este modelo é baseado em monocamada, isto é, o $q_{\max}$ se dá após o soluto recobrir todo o bioissorvente. Já as equações de Freundlich demonstra um modelo de adsorção em multicamadas que tendem ao infinito.

Tabela 2. Parâmetros de Langmuir representando a isoterma de bioissorção de células mortas dos quatro isolados de rizóbios nos tempos de 30 minutos e 30 horas, em pH 2,0, concentração de 100 mg L^{-1} de cromo e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de bioissorvente.

BIOSSORVENTES	Tempo	Parâmetros de Langmuir		
		$q_{\max}$	K_L	R_L
SEMIA4064	30 min.	44,01	0,013	0,4326
	30 horas	50,20	0,014	0,4234
LMG6125	30 min.	88,42	0,018	0,355
	30 horas	98,43	0,020	0,3346
LMG11892	30 min.	43,60	0,013	0,4332
	30 horas	58,61	0,014	0,4101
JAB6	30 min.	63,61	0,015	0,4017
	30 horas	75,82	0,016	0,3800

Outro parâmetro essencial para o modelo de Langmuir foi R_L , que foi calculado para os diferentes bioissorventes, na remoção íon cobre, foram analisados os tempos de 30 minutos e 30 horas. O R_L para os bioissorventes SEMIA 4064, LMG 6125, LMG 11892 e JAB6 foram encontrados como sendo 0,38 a 0,45 na concentração 100 mg L^{-1} de íons cobre. Os mesmo bioissorventes apresentaram valores de R_L de 0,33 a 0,43 na concentração 100 mg L^{-1} de íons cromo. Os valores obtidos de R_L apontam que a isoterma é favorável, uma vez que os valores estão entre 0 e 1, indicando que os dados se encaixam bem com o modelo de Langmuir. (LIN et al., 2012).

4. CONCLUSÃO

Em conclusão a este trabalho, todos os isolados testados foram capazes de remover os íons metálicos de cobre e cromo. Destes isolados, o LMG 6125 se destacou com melhores taxas de remoção para os íons cobre e cromo em curtos períodos de tempo, apresentando características importantes de um

bom bioissorvente. O potencial de remoção dos íons cobre e cromo demonstram estar diretamente relacionado à concentração dos íons presentes na solução. As taxas de remoção do íon cobre aumenta com o aumento da concentração, já as taxas de remoção de cromo se estabilizam acima da concentração de 300 mg L⁻¹, independentemente da dose do bioissorventes. As células mortas de LMG 6125 em doses maiores no processo de bioissorção de ambos os íons metálicos, têm a capacidade de bioissorção reduzida. Elevadas concentrações dos bioissorventes tendem a formar complexações entre as células e os íons metálicos, formando aglomerados, com a redução da área de superfície, menor é o contato dos íons aos sítios ativos presentes na parede celular das células. Este estudo apresenta dados relevantes mas, são necessários mais estudos quanto a remoção de íons metálicos por células mortas de rizóbio, como análise de microscopia eletrônica de varredura, espectrometria de energia dispersiva de raios-x (EDX); espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared), entre outros estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

DÖNMEZ, G.; AND Z. AKSU. Removal of chromium (VI) from saline wastewaters by *Dunaliella* species. **Process Biochemistry**, v.38,p.751–762, 2002.

GADD, M.G., C. WHITE, AND L. DEROME. Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeasts. In P.R. Norri, and D.P. Kelly (ed.), **Biohydrometallurgy**. Chippenham, Wilts, A. Rowe, UK. 1988.

HE, L.M., TEBO, B.M., Surface Charge Properties of and Cu(II) Adsorption by Spores of the Marine *Bacillus* sp. Strain SG-1. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, n. 3, p. 1123–1129, 1998.

HUANG, W.; LIU, Z-M. Biosorption of Cd(II)/Pb(II) from aqueous solution by biosurfactant-producing bacteria: Isotherm kinetic characteristic and mechanism studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p.113–119, 2013.

LI, H. F., LIN, Y. B., GUAN, W.; CHANG, J.; XU, L.; GUO, J.; WEI, G. Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX72-14. **Journal of Hazardous Materials**, v.179, p.151–159, 2010.

LIN, Y.; WANG, X.; WANG, B.; MOHAMAD O.; WEI, G. Bioaccumulation characterization of zinc and cadmium by *Streptomyces zinciresistens*, a novel actinomycete. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.77, p.7–17, 2012.

MEJÁRE, M.; BÜLOW, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, v.19, n. 2, p. 67–73, 2001.

MOHAMAD, O.A.; HAO, X.; XIE, P.; HATAB S.; LIN Y.; WEI, G., Biosorption of Copper (II) from Aqueous Solution Using Non-Living *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123. **Microbes Environmental**, v.27, n.3, p.234–241, 2012.

OGUNBILEJE, J. O.; SADAGOPARAMANUJAM, V. M.; ANETOR, J. I.; FAROMBI, E. O.; AKINOSUN, O. M.; OKORODUDU, A. O. Lead, mercury, cadmium, chromium, nickel, copper, zinc, calcium, iron, manganese and chromium (VI) levels in Nigeria and United States of America cement dust. **Chemosphere**, v. 90, n. 11, p. 2743–2749, 2013.

RAAMAN, N., MAHENDRAN, B., JAGANATHAN C., SUKUMAR S., CHANDRASEKARAN V. Removal of chromium using *Rhizobium leguminosarum*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.28, p.627–636, 2012.

RAUNGSOMBOON, S., CHIDTHAISONG, A., BUNNAG, B., INTORN, D., HARVEY, N. Removal of lead by the cyanobacterium *Gloeocapsa sp.* **Bioresource Technology**, n. 99, p. 5650–5658, 2008.

SAEED, A.; AKHTER, M. W.; IQBAL, M. Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbent. **Separation and Purification Technology**, v. 45, n. 1, p. 25–31, 2005.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal, Barking**, v.11, p. 663-674, 2001.

TANGAROMSUK, J., POKETHITIYOOK, P., KRUATRACHUE, M., UPATHAM, E.S. Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. **Bioresouce Technology**, v.85, p.103–105, 2002.

UCUN, H.; AKSAKAL, O.; YILDIZ, E. Copper (II) and zinc (II) biosorption on *Pinus sylvestris*. **Journal of Hazardous Materials**, v.161, n.2–3, p.1040–1045, 2009.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F. Removal of metals by biosorption: **A review. Hydrometallurgy**, v. 44, p. 301–306, 1997.

VOLESKY, B.; HOLAN, Z. R. Biosorption of heavy metals. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 3, p. 235–250, 1995.

WU, C. H.; KUO, C. Y.; LO, S. L. Recovery of heavy metals from industrial sludge using various acid extraction approaches. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 289–293, 2009.

XIE, P.; HAO, X.; MOHAMAD, O.A.; LIANG, J.; WEI, G. Comparative Study of Chromium Biosorption by *Mesorhizobium amorphae* Strain CCNWGS0123 in Single and Binary Mixtures **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.169, p.570–587, 2013.

ZHOU, W. Z., WANG, J., SHEN, B. L., HOU, W. G., ZHANG, Y. H. Biosorption of copper (II) and cadmium (II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. **Colloids and Surfaces B**, v. 72, p. 295–302, 2009.

ZUBAIR, A., BHATTI, H. N., et al. Kinetic and equilibrium modeling for Cr (III) and Cr (VI) removal from aqueous solutions by *Citrus reticulata* waste biomass. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 91, p. 305–318, 2008.

CAPÍTULO 4 – Aplicação dos exopolissacarídeos rizobianos como bioemulsificantes de óleos e hidrocarbonetos

RESUMO

Dois isolados do gênero *Rhizobium* (SEMIA 4064, JAB6) e dois *Sinorhizobium* (LMG 6125, LMG 11892) que apresentaram elevada produção de goma, em meio sólido, foram selecionados com o objetivo de isolar, purificar, quantificar e caracterizar os exopolissacarídeos (EPSs). Este trabalho também estudou o potencial dos EPSs como bioemulsificantes de óleos e hidrocarbonetos. Os EPSs foram produzidos em meio PSY, com elevada concentração de sacarose, o rendimento máximo foi do isolado JAB6 ($6,63 \pm 0,10 \text{ g L}^{-1}$), após 144 horas de incubação. Os estudos reológicos demonstraram que os EPSs, em meio aquoso, são fluídos de comportamento pseudoplástico e a maior taxa de viscosidade foi do EPS produzido pelo isolado SEMIA 4064. A partir das análises de CLAE, é evidente que os EPSs são heteropolímeros, composto por açúcares neutros (glicose, galactose, manose, ramnose e ácido glucurônico, o ácido galacturônico foi encontrado apenas nos EPSs dos isolados LMG 6125 e LMG 11892). Os EPSs foram capazes de estabilizar emulsões em água com vários compostos hidrofóbicos (hidrocarbonetos, óleo diesel e óleos vegetais). O bioemulsificante produzido por SEMIA 4064 (5 mg mL^{-1}) apresentou maiores taxas de emulsificação de óleo diesel (45%), tolueno (44%), hexano (89%), óleo de soja (81%), óleos de girassol (79%) e óleos de oliva (83%). As variações de pH (2-11) e salinidade (0 a 30%), têm influência na atividade emulsificante. Foi observado diferentes valores de taxa de emulsificação (E_{24}) em óleos diesel, quando se alterou o pH e salinidade. O EPS de JAB6 demonstrou maiores capacidades de emulsificação em pH 10 ($E_{24} = 53\%$) ou salinidades 30% ($E_{24}=27\%$). Os resultados deste estudo contribuem para compreender o influência da composição química e as propriedades do material dos EPSs de rizóbios e a aplicação biotecnologia destas biomoléculas como bioemulsificantes, visando adequar esta tecnologia em processos de biorremediação. Este estudo irá melhorar o conhecimento sobre a exploração dos EPSs de rizóbios como recursos renováveis não-convencional.

Palavras-chaves: óleo diesel, óleo vegetal, emulsificação, biopolímeros, índice de emulsificação, E_{24}

CHAPTER 4 – Application of rhizobial exopolysaccharides like biomulsifiers of oil and hydrocarbons

ABSTRACT

Two isolates of the genus *Rhizobium* (SEMIA 4064, JAB6) and two *Sinorhizobium* (LMG 6125, LMG 11892), that showed elevated production of gum in solid medium, were selected with objective to isolate, purify, quantify and characterize the exopolysaccharides (EPSs). This work also studied the potential of EPSs as bioemulsifiers of oils and hydrocarbons. The EPSs were produced in PSY medium with high concentration of sucrose, the maximum yield was isolated JAB6 ($6.63 \pm 0.10 \text{ g L}^{-1}$), after 144 hours of incubation. The rheological studies demonstrated that EPSs have pseudoplastic fluid behaviour in aqueous solution and the highest rate of viscosity EPS was produced by isolated SEMIA 4064. Based on the HPLC analysis, it is clear that the EPSs are heteropolymers composed of sugars neutral (glucose, galactose, mannose, rhamnose and glucuronic acid, galacturonic acid was found only in EPSs isolates LMG 6125 and LMG 11892). The EPSs were able to stabilize emulsions in water with various hydrophobic compounds (hydrocarbons, diesel oil and vegetable oils). The bioemulsier produced by SEMIA 4064 (5 mg mL^{-1}) had higher rates of emulsification of diesel oil (45%), toluene (44%), hexane (89%), soybean oil (81%), sunflower oil (79%) and olive oil (83%). Variations of pH (2-11) and salinity (0-30%), influence the emulsifying activity. Different emulsification rate values (E_{24}) in diesel oil was observed when the pH is changed and salinity. The EPS showed higher capacity JAB6 emulsification at pH 10 ($E_{24} = 53\%$) or 30% salinity ($E_{24} = 27\%$). The findings contribute to understanding the influence of the chemical composition and material properties of the EPSs of rhizobia and biotechnology application of these biomolecules as bioemulsifiers, in order to adapt this technology for bioremediation processes. This study will improve our knowledge about the operation of EPSs rhizobia and non-conventional renewable resources.

Keywords: diesel oil, vegetable oil, emulsification, biopolymers, emulsification index, E_{24}

1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de polímeros, como as substâncias poliméricas extracelulares (EPSs) são produzidos naturalmente por microrganismos. O uso de polímeros microbianos como biossurfactantes é vantajoso comparado com os surfactantes sintéticos. Os surfactantes convencionais exibem algumas propriedades como toxicidade, recalcitrância e bioacumulação no ecossistema, gerando sérios danos ao meio ambiente. Os EPSs são biossurfactantes biodegradáveis e menos tóxicos, além de apresentarem atividade em uma ampla variedade de condições (BANAT et al., 2000). Estas propriedades tornam os biossurfactantes uma alternativa aos surfactantes sintéticos, por serem mais adequados para o controle e recuperação de ambientes contaminados (DESAI e BANAT 1997). Diante destes aspectos, amplia-se o espectro do potencial de aplicações dos biopolímeros destinando seu uso em indústrias de petróleo e derivados de petróleo, tratamento e processamento de metais; detergentes e materiais de lavanderia; agricultura; indústria têxtil; processamento de papel e celulose; tintas; cosméticos; produtos farmacêuticos; produtos de higiene pessoal; processamento de alimentos e biorremediação da água e do solo (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Dentre as inúmeras aplicações dos EPSs, muitos trabalhos têm demonstrado a ação destes compostos no processo de biorremediação sendo muito utilizados como bioemulsificantes. Um dos exemplos de expolissacarídeos usados como bioemulsificantes, é o emulsano, que apresenta a propriedade de formar e estabilizar emulsões óleo-água com uma variedade de substratos hidrofóbicos (BACH et al., 2003). O EPS é responsável pela fixação inicial e a formação de biofilme (LAUS et al., 2005) e, ao emulsificar hidrocarbonetos e óleos aumenta a solubilidade e, consequentemente, a eficiência de degradação desses compostos pelos microrganismos presentes na estrutura do biofilme (BONILLA et al., 2005). A elevada capacidade para estabilizar emulsões entre água e compostos hidrofóbicos, é devido a presença em sua molécula de regiões polares, que é capaz de reduzir a tensão interfacial de soluções água/óleo e óleo/água. Exemplos de bioemulsificantes incluem: RAG – 1 emulsano e biodispersan,

produzidos por isolados de *Acinetobacter calcoaceticus* (ROSENBERG et al., 1988; SAR e ROSENBERG, 1983). Outros biopolímeros com aplicações potenciais como bioemulsificantes incluem polissacarídeos extracelulares produzidos por *Pseudomonas tralucida* (APPAIAH e KARANTH, 1991), *Pseudoalteromonas* sp. (GUTIERREZ, et al., 2008), *Zoogloea* sp. (LIM et al., 2007), *Bacillus megaterium* (CHOWDHURY et al., 2011), *Rhizobium miluonense*, *Burkholderia seminalis*, *Ensifer adhaerens* (HUANG et al., 2012) e *Enterobacter cloaceae* (IYER et al., 2006).

Os rizóbios produzem três formas diferentes de polissacarídeos (lipopolissacarídeos constituídos de Lípideo A, polissacarídeos fixado na membrana celular e β -(1,2)-glicanas cíclicas, um polissacarídeo cíclico armazenado no citoplasma que regula a adaptação osmótica. Os EPSs que contêm dois principais monômeros, ribose e manose, desempenham um papel importante na formação e extensão de infecção (BREEDVELD et al., 1993; KANNENBERG e BREWIN, 1994; MANDAL et al., 2007; MILLER et al., 1986). Na natureza, a produção de EPS pelos rizóbios na forma de vida livre, protege as células ou em simbiose com plantas aumenta a formação de nódulos (LAUS et al. 2005; GLENN et al., 2007). No entanto, há falta de estudos para as aplicações de EPS de rizóbios como bioemulsificantes de hidrocarboneto e óleos, que contaminam o meio ambiente.

Neste estudo, buscou-se a produção de EPS de quatro isolados de rizóbios, que foram quantificados, identificados quanto composição química e propriedades reológicas das biomoléculas. Além disso, os EPSs foram avaliados quanto a capacidade de emulsificar óleos e hidrocarbonetos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi executado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal. As técnicas utilizadas neste trabalho não oferecem riscos para o meio ambiente e para a saúde humana, encaixando-se nos padrões de biossegurança (NB-1).

2.1. Isolados utilizados

Quatro isolados que apresentaram elevada produção de goma em placa Petri, contendo meio sólido. Dos isolados, dois foram obtidos do *Laboratorium voor Microbiologie – Universiteit Gent* (Bélgica) LMG 6125 (*Sinorhizobium meliloti*) e LMG 11892 (*Sinorhizobium arboris*), um isolado obtido *Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária* (FEPAGRO) Rio Grande da Sul, (Brasil) SEMIA 4064 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) e JAB6 (*Rhizobium tropici*). Atualmente todos os isolados fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP de Jaboticabal.

2.2. Condições e meios de cultivo

Os isolados foram cultivados em meio líquido TY (5 g tripton, 3 g extrato de levedura; 0,46 g CaCl_2 por litro) a 28°C, com agitação de 150 rpm, durante 48 horas (BERINGER, 1974). Em seguida, foi retirada uma alíquota de 800 μL deste meio de cultivo, e adicionada em 200 μL de glicerol. Posteriormente, congelou-se a mistura resultante rapidamente com nitrogênio líquido, estocando-a a -80°C, sendo este o estoque definitivo. Além desse estoque, as bactérias também foram mantidas a 4°C em tubos contendo meio TY sólido, sendo este o estoque de trabalho.

2.3. Produção de exopolissacarídeos

Cultura de 24 horas foi inoculada em frascos tipo erlenmeyer, com capacidade para 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido PGY (1,4 g K_2HPO_4 ; 1 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10 g glicerol; 3 g extrato de levedura por litro; pH 6,8) (CAMPANHARO, 2006) e incubada em agitador orbital a 150 rpm, 28°C, por 24 horas, ou seja, até a obtenção de uma suspensão com leitura de densidade óptica (DO_{600}) igual a 4,6 nm. Alíquotas das culturas correspondentes a 10% (v/v) foram transferidas para frascos tipo erlenmeyer de 300,0 mL, contendo 100,0 mL do meio líquido PSY (1,2 g K_2HPO_4 ; 0,8 g KH_2PO_4 ; 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30,0 g sacarose; 1,0 g extrato de levedura por

litro; pH 6,8) (CAMPANHARO, 2006) e incubadas novamente por tempo determinado, a 150 rpm e temperatura de 28°C. Estes inóculos foram cultivados em triplicata. Os cultivos foram em dois tempos: 72 e 144 horas. Após o término do tempo de cultivo, a cultura foi submetida à centrifugação ($10.000 \times g$, a 4°C, por 50 minutos), separando-se as células do sobrenadante. O pH foi aferido do sobrenadante e posteriormente foi feita a recuperação do EPS, conforme descrito no item 2.4.

As células recuperadas (biomassa celular) foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%), novamente centrifugadas ($10.000 \times g$, a 4°C, por 15 minutos), e secas em estufa a 50°C até obtenção da massa constante, para que a biomassa celular fosse avaliada por gravimetria.

2.4. Obtenção de EPS produzido pelos isolados

O sobrenadante coletado, conforme descrito no item 2.3. foi utilizado para a extração de EPS. O EPS foi precipitado adicionando-se 3 volumes de álcool etílico 96%, resfriado e recuperado utilizando um bastão de vidro. O EPS de cada amostra foi transferido para béquers com massa conhecida. O material foi seco em temperatura ambiente e a massa foi aferida até permanecer constante. O volume do frasco foi medido antes e após da precipitação do EPS em balança de precisão para a verificação da quantidade de EPS obtida. Em seguida, foi calculada a concentração de EPS expressa em g de EPS por L de meio de cultura (g L^{-1}). A eficiência relativa na produção de EPS foi avaliada pela relação entre o total de EPS e a biomassa celular.

2.5. Propriedades Reológicas do EPS

As amostras foram moídas em moinho de inox até se obter um sólido pulverizado para facilitar a solubilização. Os EPS foram solubilizados em água deionizada à temperatura de $\pm 20^\circ\text{C}$, na concentração de 5 g L^{-1} . As soluções foram mantidas sob agitação mecânica constante, em velocidade média, à temperatura de $\pm 20^\circ\text{C}$ por 20 min. As avaliações reológicas das soluções polissacarídicas foram efetuadas em reômetro de deformação controlada ARES, da Rheometrics Scientific. Foi utilizada geometria de cilindros

concêntricos, com diâmetro do cilindro interno de 25 mm e diâmetro do cilindro externo de 27 mm, faixa de frequência avaliada entre 0,01 e 100 rad/s. As amostragens foram realizadas em duplicata à temperatura de 25 °C. Os reogramas, para cada uma das duas concentrações de cada EPS, foram gerados utilizando-se software *RheoWin* (versão 3.20).

O modelo Ostwald-de-Waele ou da Lei da Potência (Equação 2) foi ajustado aos reogramas e os valores do índice de consistência e índice de comportamento de fluxo do fluido foram determinados para as concentrações das soluções analisadas.

$$\tau = K.\dot{\gamma}^n \quad (\text{Equação 1})$$

onde: τ = tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ = taxa de deformação (s^{-1}); K = índice de consistência (Pa.s); n = índice de comportamento de fluxo do fluido (adimensional).

2.6. Determinação da composição em monossacarídeo do EPS dos microrganismos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A composição dos monossacarídeos do EPS bruto das bactérias foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando a química de marcação dos monômeros com 1-fenil-3-metil-5-pirazolone (PMP), segundo a metodologia descrita por Fu e O'Neill (1995), modificada por Castellane et al. (2014). Amostra de 1,0 mg de EPS foi hidrolisada com 200 μ L de ácido trifluoracético 4 mol L⁻¹ em tubos de hidrólise de 13 x 100 mm, selados com uma chama de maçarico sob vácuo. Os tubos então foram permaneceram a 120°C, durante 2 horas. Após resfriamento a temperatura ambiente, os tubos foram abertos e a solução foi evaporada em um liofilizador Hetovac vr-1. O resíduo foi dissolvido em 0,5 mL de isopropanol puro, novamente evaporado.

Após isso, o EPS hidrolisado e os padrões de monossacarídeos padrões foram pre-derivatizados (marcação química) com PMP. As reações foram conduzidas em microtubos, acrescentando-se em cada tubo 40 μ L de solução de PMP (0,5 mol L⁻¹ em metanol) e 40 μ L de solução de hidróxido de sódio (0,3 mol L⁻¹). Os tubos foram agitados e incubados a 70°C por 2 horas. Após o resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi neutralizada pela adição de

40 μL de solução de ácido clorídrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Foram adicionados 0,5 mL de éter butílico, na extração dos derivados de monossacarídeos e os tubos agitados por 5 segundos. As fases foram separadas por centrifugação a $5.000 \times g$ por 5 minutos e a fase superior (orgânica) foi removida e descartada. Este procedimento de extração foi repetido por 3 vezes e a fase aquosa resultante foi misturada com 1,0 mL de água milli-Q.

As análises dos monossacarídeos marcados com PMP foram desenvolvidas num sistema para CLAE equipado com um detector UV/VIS (Shimadzu, modelo SPD-M10A). O comprimento de onda para a detecção foi de 245 nm. A separação dos monossacarídeos derivados com PMP foi realizada através de uma coluna GHRC ODS-C-18 (4,6 mm i.d. x 15 cm) com velocidade de fluxo constante de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; usando os tampões A e B, constituídos por 100 mmol L^{-1} de acetato de amônio (pH 5,5), 25% de acetonitrila, com 10% e 25% de acetonitrila, respectivamente. O gradiente para a separação foi: 0% de B, 30 minutos e 0-100% de B, até 100 minutos. Os monossacarídeos padrões utilizados foram glicose, manose, ramnose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico, e as seguintes concentrações: 0,0125; 0,0250. 0,0500 e $0,1000 \text{ mg mL}^{-1}$ para a construção da curva de calibração. A quantidade de amostra injetada no cromatógrafo foi de 20 μL .

2.7. Atividade de Emulsificação (E_{24})

A capacidade do EPS para estabilizar emulsões com vários compostos hidrofóbicos foi testada como descrito por Freitas et al. (2009). Solução aquosa de EPS (1 e 5 mg mL^{-1}) foi misturada em tubos de ensaio com tampa rosqueável a compostos hidrofóbicos na proporção de 4:6 e homogeneizados em agitador de tubos, em velocidade máxima, por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura de 25°C . Durante 96 horas, em intervalos regulares de 24 horas contadas a partir do momento da homogeneização, foram efetuadas medidas da altura da camada emulsificada (CE) e da altura total (AT) dos líquidos no tubo. O índice de emulsificação foi obtido com o auxílio da fórmula (COOPER e GOLDENBERG, 1987):

$$E_{24} = (\text{CE}/\text{AT}) \times 100$$

(Equação 2)

Todos os testes foram realizados em triplicata. Os compostos testados foram hidrocarbonetos (tolueno, Sigma; hexano, Riedel de Haen); óleo diesel e óleos vegetais (soja, girassol e oliva).

Para o estudo dos efeitos do pH, e salinidades sobre a taxa de emulsificação de óleos diesel, a concentração dos EPSs foi de 1 mg mL⁻¹. As soluções de EPSs dos respectivos isolados tiveram seus pHs ajustados nas faixas de (2,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0), usando NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. Para determinar o efeito da salinidade (NaCl) na atividade de emulsificação, diferentes concentrações de NaCl (1, 10, 20 e 30%, m/v) foram adicionadas às soluções de EPSs de cada isolado, misturando-as até ser obtido dissolução completa. Para este ensaio a atividade de emulsificação de cada tratamento foi avaliada tal como descrito acima, no tempo de 24 horas.

2.8. Análise estatística

Os dados obtidos dos padrões de comparação dos biopolímeros foram analisados pelo Software R, submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, para comparação entre médias de tratamento. Para o teste de produção de EPS foi utilizado análise fatorial de dois fatores.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da Produção de EPS

Para avaliar a produção dos EPSs, a massa do frasco foi determinada antes e após a precipitação da amostra do EPS e posteriormente foi quantificada em g L⁻¹. As amostras de células e de EPS secas obtidas foram pesadas e os valores encontrados, estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados demonstraram que na produção de EPS no tempo de 72 horas, os isolados SEMIA 4064 e LMG 6125 não diferiram estatisticamente entre si, produzindo 3,01 e 2,50 g L⁻¹, respectivamente. O isolado LMG 11892 foi o que apresentou menor produção do biopolímero (1,50 g L⁻¹), enquanto que o isolado JAB6 demonstrou elevado potencial como produtor de exopolissacarídeos, com 5,34 g L⁻¹, apresentando diferença estatística

significativa em relação aos demais isolados. Em relação à produção de EPS no tempo de 144 horas, os isolados SEMIA 4064 e LMG 6125 demonstraram que as produções destas substâncias não diferiram estatisticamente, em relação ao período de incubação de 72 horas. Já os isolados LMG11892 e JAB6 apresentaram aumento significativo da produção de EPS no tempo de 144 horas. O isolado JAB6 independentemente do tempo de cultivo apresentou maior produção de EPS em relação aos demais microrganismos.

Tabela 1. Produção de exopolissacarídeos e de biomassa celular no meio de cultura por isolados de rizóbios e eficiência relativa de produção de EPS.

ISOLADOS	EPS		Biomassa		Eficiência		pH	
	72 h	144 h	72 h	144 h	72 h	144 h	72 h	144
	g L ⁻¹		g L ⁻¹		(EPS/Biomassa)			
SEMIA4064	3,01 aB	3,48 aB	2,18 bB	2,57 aB	1,85 aB	1,53 aB	6,98	6,83
LMG6125	2,51 aB	2,75 aB	2,34 bB	2,64 aB	1,08 aB	1,04 aB	7,03	6,53
LMG11892	1,50 bC	2,86 aB	2,89 bA	3,88 aA	0,52 aB	0,73 aB	7,03	6,39
JAB 6	5,34 bA	6,63 aA	0,79 aC	0,76 aC	6,93 aA	8,73 aA	7,01	6,74

** Letras maiúsculas iguais não diferiram estatisticamente quanto aos isolados e letras minúsculas iguais não diferiram estatisticamente quanto ao tempo.

No tempo de 72 horas de incubação, a produção de biomassa celular dos isolados SEMIA 4064 e LMG 6125 (2,18 e 2,34 g L⁻¹, respectivamente) não diferiu estatisticamente entre si. O isolado LMG 11892 foi o que apresentou maior produção de células bacterianas (2,89 g L⁻¹) e o menor produtor de células foi o JAB6 com 0,79 g L⁻¹. Com incubação de 144 horas, a produção de biomassa celular foi maior que no tempo de 72 horas para todos os isolados exceto para o isolado JAB6. O isolado JAB6 não apresentou dados de produção de células com diferença estatística, para os tempos de 72 e 144 horas, indicando que atingiu seu platô de crescimento celular em 72 horas e, a fonte de carbono consumida era convertida em metabólitos secundários, como aqui estudados, a produção de EPS que aumentou em relação do tempo.

Recentes estudos realizados por Persona (2012), comparando a produção de biopolímeros entre a estirpe selvagem da espécie *R. tropici* SEMIA 4077, e seu mutante, observou que eles não apresentaram diferenças significativas (7,4 g.L⁻¹ e 7,6 g.L⁻¹, respectivamente). Mas apresentaram

diferenças relevantes nas quantidades de células bacterianas sendo SEMIA 4077 com $0,92 \text{ g.L}^{-1}$ e para seu mutante $0,09 \text{ g.L}^{-1}$. Enquanto que, outra estirpe de *R. tropici* (SEMIA 4080) e seu mutante identificado e denominado como MUTPA7, produziram $2,52 \pm 0,45 \text{ g L}^{-1}$ e $3,94 \pm 0,41 \text{ g L}^{-1}$ de EPS, respectivamente. O mutante MUTZC3 e o isolado de rizóbio JAB6 exibiram as melhores produções de EPS ($5,52 \pm 0,36$ e $5,06 \pm 0,20 \text{ g L}^{-1}$ de EPS, respectivamente), nas condições de cultivo testadas (CAMPANHARO, 2006; CASTELLANE et al., 2014).

A produção de EPS por *R. tropici* (CIAT899) estudado por Staudt et al. (2012) apresentou um valor máximo de $4,08 \text{ g L}^{-1}$, sendo substrato meio mínimo acrescido com sacarose (2%). Mandal et al. (2007) obtiveram uma produção máxima de $0,35 \text{ g L}^{-1}$ de EPS do isolado de *Rhizobium* sp.(VMA301) tendo como substrato meio mínimo, extrato de levedura suplementado com manitol (1%) e asparagina (0,3%). Dados obtidos por Kaci et al. (2005) em estudo com *Rhizobium* sp. (KYGT207) crescido em substrato de extrato de levedura e sucrose (2%) relataram produção de EPS de $2,5 \text{ g L}^{-1}$.

Geralmente, a produção do biopolímero é inversamente proporcional a taxa de crescimento bacteriano, o que sugere uma regulação entre o metabolismo bacteriano em detrimento ao catabolismo, onde as células em determinado ponto de sua curva de crescimento não investem em esqueletos de carbono para o crescimento, em detrimento da atividade metabólica das células (CASTELLANE et al., 2014). Em virtude da proteção física e química da biomassa, contra fatores externos adversos e até mesmo a formação de nichos ecológicos secundários tornando possível, uma mútua interação interespecífica.

3.2. Análise Reológica

Para todos os casos, a viscosidade aparente foi imediatamente recuperada em baixas taxas de cisalhamento, após submeter as amostras para taxas de cisalhamento com valores até 100 s^{-1} . A viscosidade aparente das soluções de EPSs, dos isolados rizobianos, medida em baixas taxas de cisalhamento mostrou um aumento acima 10 Pa s (Fig. 1). Os parâmetros reológicos da solução de exopolissacarídeo foram medidos e como esperado,

na presença do polímero, a dinâmica dos fluídos verificou-se ser dependente do cisalhamento. A análise das propriedades reológicas dos EPSs em meio aquoso mostraram evidências de comportamento de fluido pseudoplástico, uma vez que a viscosidade foi influenciada pela taxa de cisalhamento (Figura 1). Este comportamento é esperado para soluções de polissacarídeos, pela estrutura do polímero apresentar elevada massa molecular (RAO et al., 2003). Além disso, a viscosidade é recuperada para baixas taxas de cisalhamento, após a imposição de valores de alta taxa de cisalhamento (Figura 1).

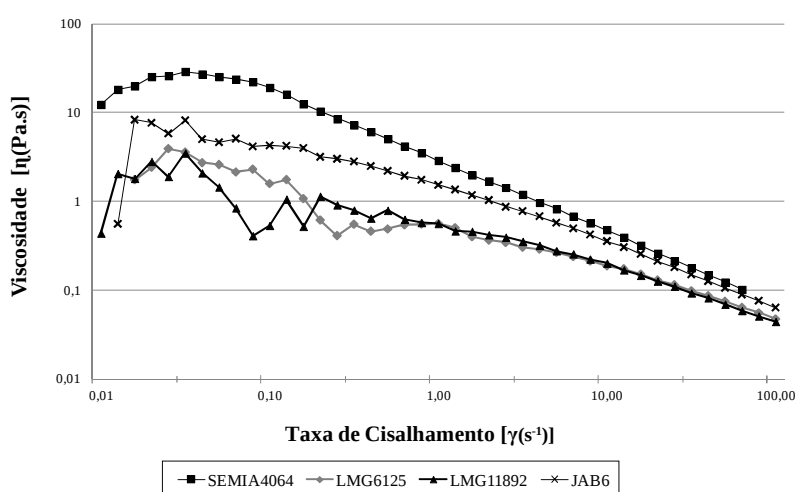


Figura 1. Curvas da viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas de EPSs dos diferentes isolados de rizóbios, a 25°C.

A partir da construção do reograma é possível estabelecer se um líquido apresenta comportamento de fluido newtoniano ou não-newtoniano, em determinadas condições de tensão. Um líquido newtoniano é representado, graficamente, por uma reta com início na origem da curva de fluxo. Os que não exibem esse comportamento são chamados não-newtonianos. Na concentração de 5 g L⁻¹ dos EPSs, produzidos pelos isolados de rizóbios, em solução aquosa exibiram comportamento não-newtoniana (Figura 2). Estudos sobre avaliação de EPS de isolados de rizóbios têm demonstrado que esses biopolímeros geralmente apresentam comportamento não newtoniano e pseudoplástico (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; CASTELLANE et al., 2014).

Amostra de diferentes isolados são completamente solúveis em água gelada ou quente, produzindo soluções com viscosidade elevada, em baixas

concentrações além de apresentarem estabilidade ao calor e a variações de pH. A diminuição no crescimento da tensão com o aumento da taxa de cisalhamento, resultando em menor viscosidade aparente, caracteriza as soluções como fluidos pseudoplásticos (CASTELLANE, 2011).

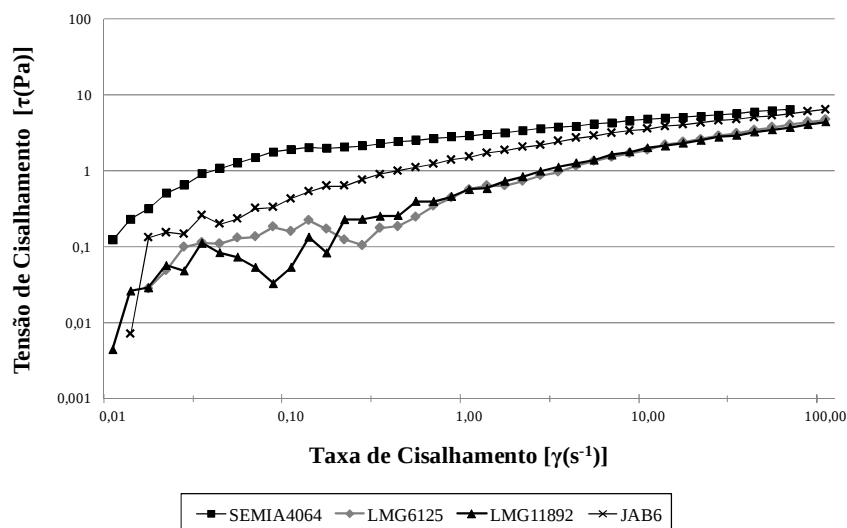


Figura 2. Curvas da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento para as amostras analisadas de EPSs dos diferentes isolados de rizóbios, a 25°C.

A descrição do comportamento reológico dos materiais pode ser feita baseando-se em modelos que relacionam a tensão de cisalhamento com a taxa de deformação. Em cada caso, a relação entre a tensão de cisalhamento (τ , Pa) e taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) foi instalado usando a lei de potência ou modelo de Ostwald-de-Waele (Equação 1), que é comumente empregado (ALVES et al., 2010; CANDIA e DECKWER, 1999; CASTELLANE et al 2014; SANCHÉZ, et al., 2002).

O valor de n é uma medida da pseudoplasticidade do polímero (BRETAS e D'AVILA, 2005). O desvio de n da unidade indica o grau de desvio do comportamento newtoniano. Para $n = 1$, o fluido é newtoniano, enquanto que para $n < 1$ é considerado pseudoplástico e $n > 1$ é dilatante. Observamos que os EPSs produzidos por SEMIA 4064, LMG 6125, LMG 11892 e JAB6 apresentam comportamento de fluido pseudoplástico, em solução aquosa na concentração de 5 g L^{-1} dos heteropolissacarídeos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores do índice de consistência e do índice de lei das potências calculados para cada uma das amostras.

Amostra	K	n
SEMIA 4064	1,00	0,32
LMG 6125	3,10	0,17
LMG 11892	1,00	0,34
JAB 6	1,90	0,26

K = índice de consistência (Pa.s); n = índice de comportamento de fluxo do fluido (adimensional).

Freitas et al. (2009), estudaram o comportamento do caldo de cultura, ao final do cultivo, a concentração de EPS foi de $15,0 \text{ g L}^{-1}$, comportamento do fluido foi idêntico ao em solução aquosa de 1,5% (m/v). Este resultado confirma que a viscosidade observada durante o cultivo foi confirmada pela presença do EPS no caldo de cultura. Além disso, o fato de que o EPS manteve o mesmo comportamento mostra que o processo de extração não alterou de viscosidade do polímero (FREITAS et al., 2009). À medida que a concentração de polímero torna-se mais elevada, as moléculas individuais começam a sobrepor, induzindo a formação de junções intermoleculares e, portanto, limitando o arranjo e alongamento das cadeias poliméricas (FREITAS et al., 2009), conseqüentemente, ocorre um aumento da viscosidade da solução (BAE et al., 2008).

3.3. Determinação da composição em monossacarídeo do EPS dos microrganismos

Os EPSs produzidos pelos isolados de SEMIA 4064 e JAB6 (*Rhizobium* spp.) e LMG 6125 e LMG 11892 (*Sinorhizobium* spp.) em meio suplementado com sacarose (PSY) foram recuperados, após 6 dias, de acordo com CAMPANHARO, (2006). A caracterização dos EPSs extraídos em termos de composição química está presente na Tabela 3. A análise de composição revelou que os todos os EPSs são heteropolissacarídeos compostos por açúcares neutros e ácidos. Dos açúcares, a glicose e a galactose foram os monossacarídeos mais abundantes, presentes nos EPSs de todos os isolados estudados. O conteúdo de monossacarídeos no polímero produzido pelo

isolado SEMIA 4064 correspondeu a 65% de glicose; 33% de galactose; a ramnose, estava presente mas em pequena quantidade, 2,13%. A manose e o ácido glicurônico estavam presentes em níveis que denotam a presença destes açúcares apenas como componentes traços. O EPS produzido pelo isolado de *Rhizobium tropici* (JAB6) apresentou quase o mesmo padrão de açúcares, o maior teor foi de glicose (54%), galactose (39%) e quantidades pequenas de ácido glicurônico(4%), manose (3%) e ramnose (0,6%). O EPS produzido por *Rhizobium tropici* (SEMIA 4080) cultivado no mesmo meio PSY apresenta composição similar, com glicose sendo o principal constituinte do açúcar (55%), seguido de galactose (32%) e pequenas quantidades de ácido glicurônico, ramnose e manose (CASTELLANE et al., 2014). A hidrólise ácida e análise por HPAEC/PAD dos EPS_{RT} apresentaram glicose e galactose nas relações molares de 4:1 e também foi detectado traços de manose (1%) (MONTEIRO et al, 2012).

O biopolímero produzido por células do isolado LMG 6125 contém carboidrato constituído de glicose com o maior teor (47%) seguido pela galactose (32%) e quantidades pequenas de ramnose (8%), ácido galacturônico (10%) e concentrações traços de manose e ácido glicurônico. O EPS produzido por LMG 11892 apresentou quase o mesmo padrão de açúcares, no entanto o maior teor de monossacarídeo foi a galactose (47%) seguida da glicose (45%) e quantidades pequenas de manose (4%), ramnose (2%), ácido glicurônico (1%) e ácido galacturônico em concentração traço.

Tabela 3. Composição do percentual (m/v) dos monossacarídeos dos EPS produzidos pelos isolados.

ISOLADOS ⁽¹⁾	Manose (%)	Ramnose (%)	Ácido Glicurônico (%)	Ácido Galacturônico (%)	Glicose (%)	Galactose (%)
SEMIA4064	*	2,13	*	-	65,25	32,61
LMG6125	*	8,40	*	10,00	46,66	32,12
LMG11892	4,23	1,98	1,29	*	44,71	47,35
JAB6	2,68	0,60	3,57	-	54,17	38,99

⁽¹⁾ Estirpes crescidas em meio líquido PSY (líquido), contendo sacarose como fonte de carbono, por 144 horas a 150 rpm, a uma temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. * traços, ou seja, quantidade abaixo do limite de detecção do detector UV-visível.

Os EPSs produzidos por *Pseudomonas oleovorans* de subproduto do glicerol foram extraídos após 5 dias de cultivo. A análise de composição revelou que a galactose foi o mais abundante dos monossacarídeos (68%), e quantidades significativas de manose (17 %) e glicose (13 %) além de pequenas quantidades de ramnose (2 %) e fucose (4%). Já o EPS produzido por *P. oleovorans* em cultivo com glicerol puro, tinha uma composição similar, com 70% de galactose, 23% de manose, 4% de ramnose e menor teor de glicose e fucose não foi detectada (FREITAS et al., 2009). Estas diferenças podem estar relacionadas com o uso de glicerol subproduto que contém algumas impurezas não presentes em glicerol puro e podem ter influenciado a composição dos açúcares presentes no EPS (FREITAS et al., 2009). Os autores concluem que o tipo de fonte de carbono presente no meio de cultivo, para a produção de EPS tem significativa influência sobre os teores dos monossacarídeos presentes no biopolímero. A presença de ácidos orgânicos (piruvato, urônico, etc.) comum em EPS microbianos, influencia significativamente as propriedades dos biopolímeros, como a solubilidade e reologia (RINAUDO, 2001).

3.4. Atividade de Emulsificação (E_{24})

3.4.1. Estabilidade da Emulsão em diferentes óleos e hidrocarbonetos e concentrações dos EPSs

Os dados referentes as taxas de emulsificação e a estabilidade da emulsão produzida pelos EPSs dos diferentes isolados de rizóbios testados em diferentes concentrações de diferentes hidrocarbonetos e óleos são mostrados na Tabela 4 e ilustrados pelas Figuras 3 e 4. Os EPSs foram capazes de reduzir a tensão interfacial nas misturas óleo/água, mesmo em concentrações reduzidas dos EPSs testados e ainda produzir emulsões estáveis. Os melhores valores quanto a taxa de emulsificação, demonstrados na concentração de 1 mg mL⁻¹ dos EPSs, para óleos vegetais foram para SEMIA 4064 E_{24} =53% (óleo de girassol) e E_{24} =50% (óleo de oliva); LMG 6125 E_{24} =51% (óleo de soja); E_{24} =55% (óleo de girassol) e E_{24} =59% (óleo de oliva); LMG 11982 com E_{24} =55% (óleo de girassol) e E_{24} =56% (óleo de oliva). Para os hidrocarbonetos

e óleo diesel, a taxa de emulsificação foi pouco significativa sendo os melhores resultados demonstrados em óleo diesel 18% (LMG 11982); tolueno 20% (SEMIA 4064) e 28% (JAB6) e hexano 22% (SEMIA 4064).

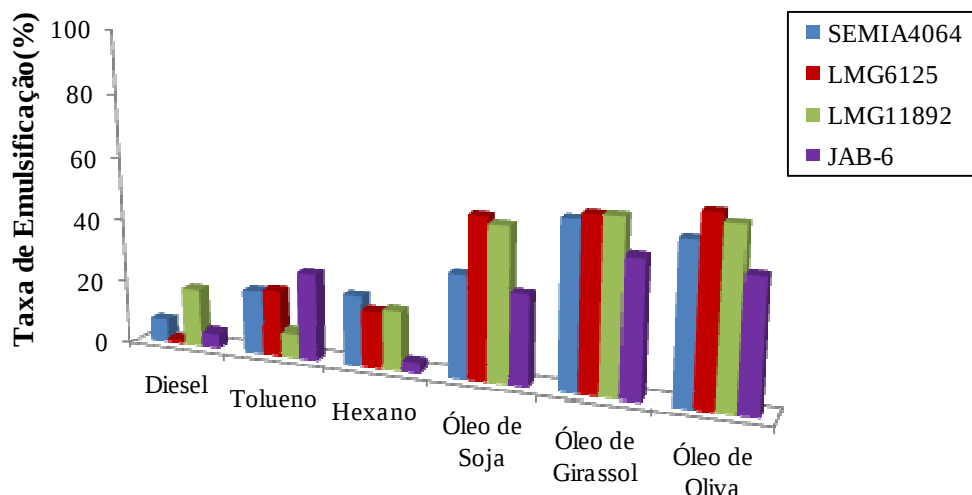


Figura 3. Atividade de Emulsificação dos EPSs produzidos pelos isolados de rizóbio, na concentração de 1 mg mL^{-1} em diferentes hidrocarbonetos e óleos vegetais.

Os EPSs foram capazes de emulsificar as misturas óleo/água, além de produzir emulsões estáveis. Os melhores valores quanto a taxa de emulsificação foram demonstrado com a concentração de 5 mg mL^{-1} dos EPSs. Para a emulsificação de hidrocarbonetos e óleo diesel os melhores resultados foram: óleo diesel (45 %), tolueno (44 %) e hexano (89 %), com EPS produzido pelo isolado SEMIA 4064. Os melhores resultados da emulsificação para óleos vegetais foram em óleo de soja (81%), óleo de girassol (79%) e óleo de oliva (83%), pelo EPS de SEMIA 4064 que proporcionou tais valores.

De acordo, com os resultados dos ensaios de reologia observou-se que o isolado SEMIA 4064 produziu o EPS que apresentou a maior viscosidades (29 Pa.s) em função da taxa de cisalhamento ($0,03 \text{ s}^{-1}$) e adicionalmente, apresentou as maiores taxas de emulsificação para os óleos e hidrocarbonetos testados. O EPS de SEMIA 4064 não apresentou o açúcar neutro ácido galacturônico, na composição do heteropolissacarídeos.

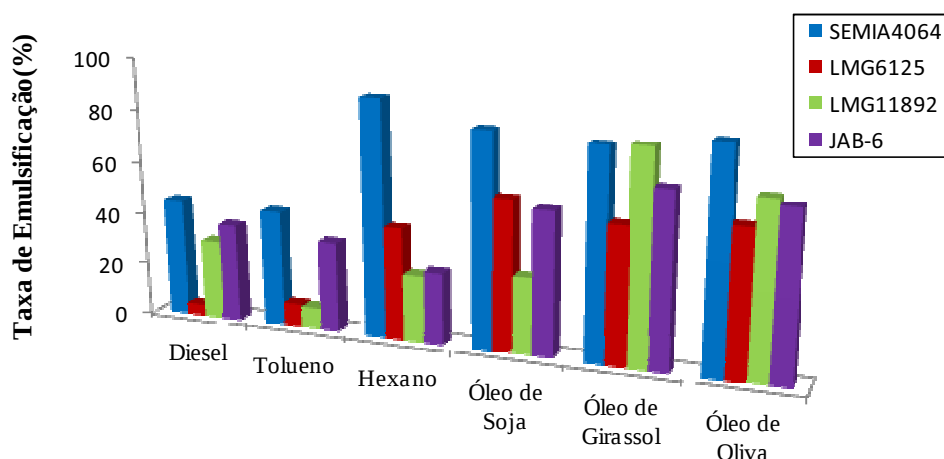


Figura 4. Atividade de Emulsificação dos EPSs produzidos pelos isolados de rizóbio, na concentração de 5 mg mL^{-1} em diferentes hidrocarbonetos e óleos.

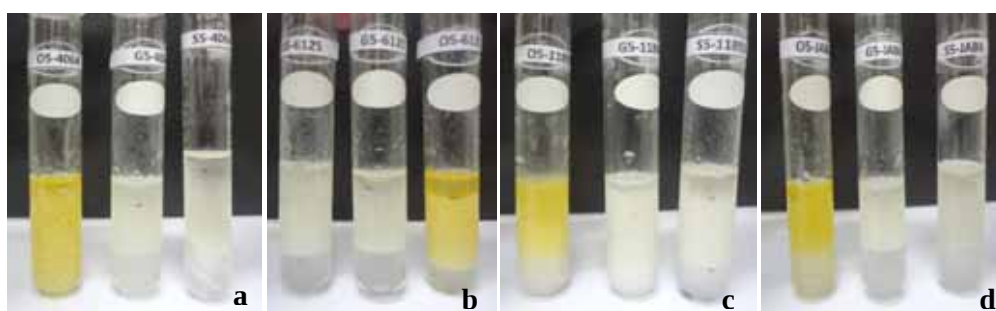


Figura 5. Fotos de teste de emulsificação (E_{24}), dos EPS em solução (5 mg mL^{-1}), na proporção de 2:3 de óleos vegetais (óleo de oliva, óleo de girassol e óleo de soja), pH 7, a 25°C , após 24 hora: (a) emulsão do EPS do isolado SEMIA 4064, (b) emulsão do isolado LMG 6125, (c) emulsão do isolado LMG 11892 e (d) emulsão do isolado JAB6.

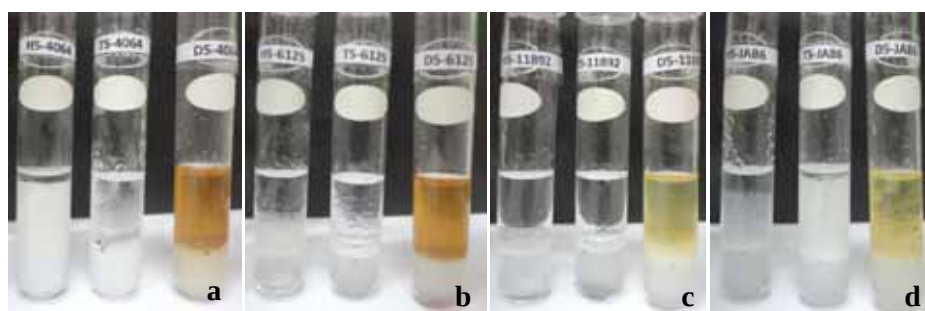


Figura 6. Fotos de teste de emulsificação (E_{24}), dos EPS em solução (5 mg mL^{-1}), na proporção de 2:3 de hidrocarbonetos (hexano, tolueno) e óleo diesel, pH 7, a 25°C , após 24 hora: (a) emulsão do EPS do isolado SEMIA 4064, (b) emulsão do isolado LMG 6125, (c) emulsão do isolado LMG 11892 e (d) emulsão do isolado JAB6.

Tabela 4 – Estabilidade da Atividade Emulsificantes dos EPSs dos isolados de rizóbio com diferentes concentrações e a eficiência sobre diferentes tipos de hidrocarbonetos e óleos vegetais.

Hidrocarboneto/ Óleos	EPS (mg mL ⁻³)	SEMIA 4064			LMG 6125			LMG 11892			JAB6				
		E ₂₄	E ₄₈	E ₇₂	E ₂₄	E ₄₈	E ₇₂	E ₉₆	E ₂₄	E ₄₈	E ₇₂	E ₉₆			
Diesel	1	6,88	8,31	8,31	3,24	3,24	3,24	3,24	18,49	19,81	18,49	17,18	4,61	2,63	2,63
Diesel	5	45,51	45,51	44,20	3,95	3,95	3,33	2,67	30,01	28,18	28,18	28,18	37,68	31,62	32,97
Tolueno	1	20,27	19,59	14,19	11,22	11,22	11,22	11,22	7,89	7,89	7,89	7,89	27,84	22,63	17,25
Toleuno	5	44,23	44,23	42,92	8,78	9,46	9,46	8,78	8,00	8,00	6,65	6,65	34,35	33,04	33,04
Hexano	1	22,30	22,30	22,30	15,55	15,55	15,55	15,55	18,86	20,25	20,25	20,25	3,34	3,34	3,34
Hexano	5	89,94	85,83	84,46	42,85	43,05	43,05	43,05	25,29	20,47	17,69	17,69	27,03	26,35	24,58
Óleo Soja	1	32,76	35,33	29,31	34,58	30,22	30,22	25,34	48,76	31,43	26,35	26,35	28,73	26,10	24,71
Óleo Soja	5	81,15	78,27	78,27	57,18	51,02	43,91	42,63	29,09	27,70	28,40	27,70	54,17	44,74	43,57
Óleo Girassol	1	52,86	51,43	50,00	53,85	51,09	46,27	43,83	54,92	53,49	49,21	49,21	43,24	41,89	40,50
Óleo Girassol	5	78,85	82,92	64,26	51,73	50,34	46,18	46,18	79,50	73,49	56,35	53,49	65,20	65,20	54,83
Óleo Oliva	1	50,00	47,22	45,83	54,27	53,05	32,91	29,25	55,62	53,79	53,79	53,79	41,48	44,78	42,08
Óleo Oliva	5	82,75	79,42	80,31	55,11	50,75	52,10	52,10	65,21	61,86	61,86	61,86	62,61	62,61	62,61

3.4.2. Efeito da variação do pH e salinidade nas taxas de emulsificação

O óleo diesel foi escolhido para este ensaio por ter apresentado os menores valores dos índices de emulsificação nos ensaios anteriores. Como este óleo é um dos maiores contaminantes de água e solo, estudamos outras condições tentando otimizar o processo de emulsificação do óleo diesel. Sendo assim, investigamos os efeitos da salinidade e pH na atividade de emulsificação do óleo diesel, pelos EPSs dos isolados rizóbios na concentração de 1 mg mL^{-1} , os dados estão ilustrados na figura 7. A ação da salinidade, sobre os EPSs testados apresentou comportamento diverso quanto às taxas de emulsificação do óleo diesel. O EPS de SEMIA 4064 demonstrou um aumento na taxa de emulsificação com 20 e 30% de NaCl. Para o EPS de LMG 6125 a melhor concentração de salinidade foi a de 1%, enquanto que o EPS produzido pelo isolado LMG 11892 apresentou melhor taxa de emulsificação na concentração de 20% de NaCl e sem a presença do sal. Já o EPS do isolado JAB6 apresentou a maior taxa de emulsificação com 30% de salinidade. Algumas pesquisas relatam que a atividade emulsionante foi significativamente inibida a uma concentração superior a 5% de NaCl (ILORI et al., 2005). Os bioemulsificantes produzidos por *Geobacillus pallidus* (XS2 e XS3) apresentaram melhores atividades emulsificantes com salinidade até 20% (ZHENG et al., 2011).

O pH pode interferir nas taxas de atividades emulsificantes e é observado que cada tipo de EPS apresenta um pH ótimo para a formação de emulsões. O EPS do isolado SEMIA 4064 apresentou melhor atividade de emulsificação do óleo diesel em pH 7,0. O EPS produzido pelo isolado JAB6 obteve um aumento significativo da sua capacidade de emulsificação em pH 10,0. Há estudos que revelam que as taxas de emulsificação dos EPSs são maiores em meio alcalino do que em meio ácido (CHOWDHURY et al., 2011). Uma propriedade importante dos bioemulsificantes é a sua eficácia ao longo de uma vasta faixa de temperatura, pH e salinidade (BANAT et al., 2000).

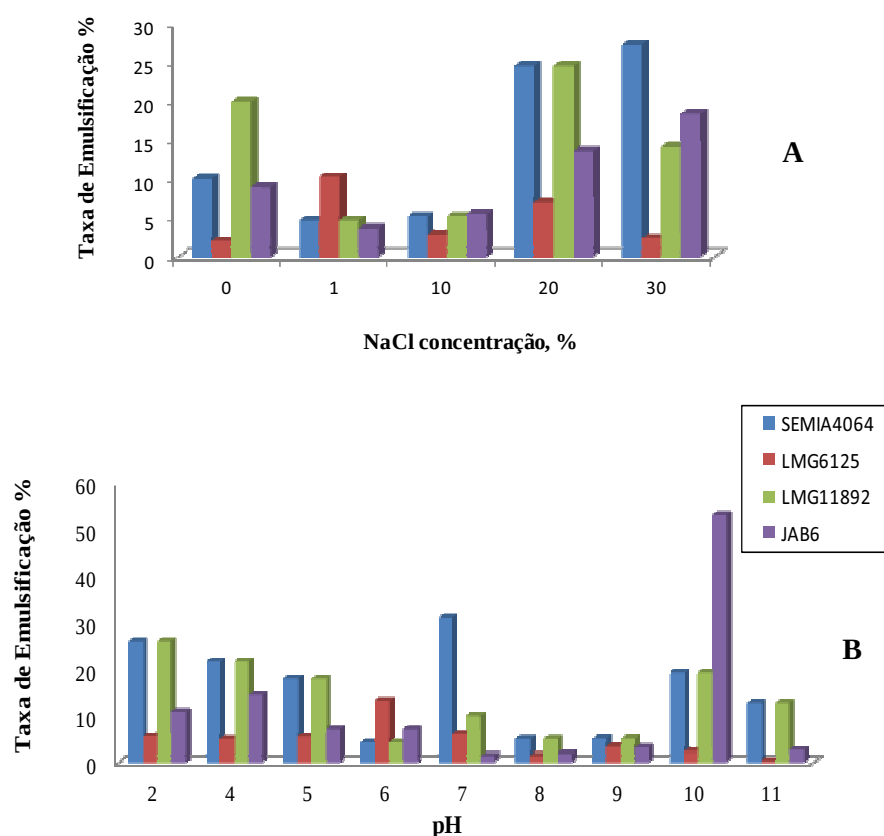


Figura 7. Efeito da salinidade (A) e do pH (B) na atividade de emulsificação de óleo diesel dos EPSs produzidos pelos isolados de rizóbio, na concentração de 1mg mL^{-1} .

A literatura tem citado que o valor do E_{24} diminuiu com o aumento do número de átomos de carbonos nos hidrocarbonetos alifáticos e parafinas líquidas, numa mistura complexa de n-alcenos, de cadeia longa demonstrando uma atividade emulsificante restritiva (ZHENG et al., 2011). Há relatos que bioemulsificantes de baixa massa molecular são capazes de reduzir a tensão de superfície para valores inferior a 40 mN m^{-1} (MULLIGAN, 2005), enquanto os bioemulsificantes com elevado massa molecular podem formar emulsões estáveis sem redução notável da tensão superficial (BATISTA et al., 2006). Os compostos que são ativos de superfície, como os EPSs produzidos por bactérias, são muitas vezes visto como auxiliares na degradação de hidrocarbonetos, aumentando a solubilidade desses substratos hidrofóbicos. A atividade de emulsificação dos EPSs é determinada por sua força na retenção da emulsão por um certo período de tempo (ZHENG et al., 2011).

4. CONCLUSÃO

Todos os isolados analisados neste trabalho que apresentaram presença de goma em meio sólido apresentaram boa capacidade de produção de EPS, sendo que o maior produtor de biopolímero foi o isolado JAB6. A viscosidade dos biopolímeros é um fator importante demonstrando estar ligado à capacidade de emulsificação. Os EPSs rizobianos estudados são heteropolissacarídeos ácidos predominantemente de glicose e galactose como monômeros. Os heteropolissacarídeos podem ser utilizados como emulsionantes para formar emulsão entre água e hidrocarbonetos tais como, óleo diesel, óleo de soja ou tolueno, com estabilidade. As características das moléculas de cada tipo de óleo ou hidrocarboneto (tamanho e tipo de cadeia de carbono, ramificações, etc.) interferem na capacidade dos EPSs em emulsificar estes diferentes compostos hidrofóbicos. As soluções de alguns EPSs mostraram-se mais eficientes em formar camadas de emulsão em meio alcalino e em níveis elevados de salinidade. Quando o emulsionante apresentou alta atividade, independentemente da concentração, pH e salinidade, mostrou-se estável o que torna este produto adequado para a aplicação na recuperação de diferentes tipos de ambientes contaminados. Os EPSs dos isolados testados neste trabalho podem ser utilizados como agentes emulsificantes e estabilizantes de emulsões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V.D.; FREITAS F.; CRISTIANA A.V. TORRES, C.A.V.; CRUZ, M.; MARQUES, R.; GRANDFILS, C.; GONÇALVES, M.P. OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Rheological and morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production by *Enterobacter* sp. **Carbohydrate Polymers**, v.81, p.758–764, 2010.

APPAIAH, K.A.A.; KARANTH, N.G.K. Insecticide specific emulsifier production by hexachlorocyclohexane utilizing *Pseudomonas tralucida* Ptm+ strain. **Biotechnology Letters**, v.13, p.371–374, 1991.

ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS_SAS, L.F.; SANTOS JUNIOR, O. dos; VASCONCELOS, A.F.D.; SILVA, M. de L.C. da; LEMOS, E.G.M.; CAMPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M.S. Propriedades reologicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarideos produzidos por bacterias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v.33, p.895-899, 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 Environmental Microbiology**, v.69, p.2608–2615, 2003.

BAE, I.Y.; OH, I.-K.; LEE, S.; YOO, S.-H.; LEE, H. G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.42, p.10–13, 2008.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495–508, 2000.

BATISTA, S.B.; MOUNTEER, A.H.; AMORIM, F.R.; TOTOLA, M.R., Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresource Technology**, v.97, n. 6, p.868–875, 2006.

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

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, p.456–463, 2005.

BREEDVELD, M.W.; CREMERS, H.C.; BATLEY, M.; POSTHUMUS, M.A.; ZEVENHUIZEN, L.P.; WIJFFELMAN, C.A.; ZEHNDER, A.J. Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.750–757, 1993.

BRETAS, R. E. S.; D'AVILA, M. A. **Reologia de polimeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005.

CAMPANHARO, J. C. **Produção e avaliação de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios**. 2006. 66f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CANDIA, J.-L. F., DECKWER, W.-D. Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress**, v.15, p.446–452, 1999.

CASTELLANE, T.C.L. **Obtenção e avaliação de mutantes exoz- ephbab envolvidos no metabolismo de polimeros de carbono em *Rhizobium tropici* SEMIA 4080 com potencial biotecnológico**. 2011. 101f. Tese. (Agronomia em Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

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

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 sedimentattached isolate of freshwater origin. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1381–1393, 2011.

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

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

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Emulsifying behavior and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.549–556, 2009.

FU, D.; O'NEILL, R. A. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high - performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 227, p. 377-384, 1995.

GLENN, S.A.; GURICH, N.; FEENEY M.A.; GONZÁLEZ J. E. The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.7077–7088, 2007.

GUTIERREZ, T.; SCHIMMIELD, T.; HAIDON, C.; BLACK, K.; GREEN, D.H. Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. Strain TG12. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.4867–4876, 2008.

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, p.1367–1373, 2012.

ILORI, M.O.; AMOBI, C.J.; ODOCHA, A.C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v.61, n. 7, p. 985–992, 2005.

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

KACI Y., HEYRAUD A., BARAKAT M., HEULIN T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research Microbiology**, v.156, p.522–531, 2005.

KANNENBERG, E.L.; BREWIN, N.J. Host-plant invasion by *Rhizobium*: the role of cell-surface components. **Trends Microbiology**, v.2, p.277–283, 1994.

LAUS, M.C.; VAN BRUSSEL, A.A.; KIJNE, J.W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.18, p.533–538, 2005.

LIM, D.J.; KIM, J.D.; KIM, M.Y.; YOO, S.H.; KONG, J.Y. Physicochemical properties of the exopolysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. KCCM10036. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.979–984, 2007.

MANDAL, S.M.; RAY, B.; DEY, S.; PATI, B.R. Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Biotechnology Letters**, v.29, p.1271–1275, 2007.

MILLER, K.J.; KENNEDY, E.P.; REINHOLD, V.N. Osmotic adaptation by gram-negative bacteria: possible role for periplasmic oligosaccharides. **Science**, v.231, p.48–51, 1986.

MONTEIRO, N.K; ARANDA-SELVERIO, G.; EXPOSTI, D.T.D.; SILVA, M.L.C.; LEMOS, E.G.M.; CAMPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M; Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v.35, n.4, p.705-708, 2012.

MULLIGAN, C.N., Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, n. 2, p.183–198, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NOEL, K.D. Rhizobia. In: Schaechter M (ed) **Encyclopedia of microbiology**, 3rd edn. Academic Press, New York, pp 261–277, 2009.

PERSONA, M.R. **Comparação de mutantes de *Rhizobium tropici* produtores de biopolímeros de interesse biotecnológico**. 2012. 78f Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

RAO, Y. M., SURESH, A. K., & SURASHKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, v.38, p.1301–1310, 2003.

RINAUDO, M. Relation between the molecular structure of some polysaccharides and original properties in sol and gel states. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.433–440, 2001.

ROSENBERG, E.; RUBINOVITZ, C.; GOTTLIEB, A.; ROSENHAK, S.; RON, E. Z. Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.317–322, 1988.

SANCHEZ, M. J.; JIMENEZ-APARICIO, A.; LOPEZ, G. G., TAPIA, G. T., RODRIGUEZ-MONROY, M.. Broth rheology of *Beta vulgaris* cultures growing in an air lift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.37–41, 2002.

SAR, N., ROSENBERG, E. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoacetic* strains. **Current Microbiology**, v.9, p.309–314, 1983.

STAUDT, A.K.; WOLFE, L.G.; SHROUT, J.D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v.194, p.197–206, 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, p. 9155–9161, 2011.

CAPÍTULO 5 – Considerações Finais

Os estudos realizados com os isolados de rizóbios, avaliando o efeito da concentração dos íons metálicos Cu^{2+} e Cr^{6+} , indicaram que houve influência da presença dos metais no meio de cultivo, em relação à produção da biomassa bacteriana e exopolissacarídeos. Em comparação à condição controle, desprovida dos íons metálicos, houve um queda acentuada na produção de EPS e biomassa celular das bactérias. Estes dados são muito importantes, uma vez que a produção de EPS é fundamental para o desenvolvimento e manutenção da vida microbiana como células livres ou em comunidades. Estudos futuros indicando qual a concentração dos íons metálicos que permite a produção de EPS são fundamentais.

A aplicação de células mortas de rizóbios no processo de remoção de íons metálicos indicou que este tipo de bioissorvente pode ser empregado com sucesso. No entanto, mais pesquisas são necessárias, como por exemplo, o por que as elevadas concentrações dos bioissorventes apresentam baixa capacidade adsorvitiva. Apesar de haver algumas hipóteses na literatura, não há nenhum trabalho que concretize o que ocorre de fato. A nossa hipótese é que os bioissorventes em concentrações elevadas tendem a formar complexações entre as células e os íons metálicos, formando aglomerados. Estes aglomerados reduzem a área de superfície e consequentemente, ocorre um menor contato entre íons metálicos e os sítios ativos presentes nas células. Outro estudo relevante no processo de remoção de íons metálicos é a aplicação de células vivas dos isolados de rizóbios empregados nesta pesquisa, bem como as células imobilizadas em alginato e os EPSs produzidos. Estudos como pH, temperatura e meios de cultivo, entre outros parâmetros devem ser analisados para posteriores pesquisas em escala real.

A produção de colônias gomosas em placa de Petri contendo meio sólido pode indicar microrganismos capazes de boa produção de EPS. A aplicabilidade de heteropolissacarídeos como potenciais bioemulsificantes de óleos, hidrocarbonetos e outros compostos hidrofóbicos, parece ter a viscosidade como parâmetro chave a ser analisado. A concentração de EPS em uma solução óleo-água apresenta maiores camadas emulsificantes e mais

estáveis em óleos e hidrocarbonetos com cadeias moleculares distintas. Assim como, observamos que as variações de pH e salinidade alteram as taxas e emulsão de óleos diesel, é importante estudos envolvendo outros óleos com o mesmo design experimental. Desta forma pode-se indicar que o EPS com característica físico-química conhecida, tem capacidade emulsificação ótima de um determinado óleo, em pH e salinidade pré-definido. Outro fato que deve ser listado para pesquisas futuras é se a ação das enzimas degradadoras destes compostos hidrofóbicos apresentam atividade ótima na mesma faixa de pH e salinidade, que da atividade de emulsificação.