



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE ESTUDOS EM SAÚDE E BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOLOGIA**

DANIELLY CRISTINA MARQUES DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE METAIS PESADOS NO
CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE SURFACTANTE DA LINHAGEM
Pseudomonas fluorescens Slim15**

Marabá, PA
2018

DANIELLY CRISTINA MARQUES DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE METAIS PESADOS NO
CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE SURFACTANTE DA LINHAGEM
Pseudomonas fluorescens Slim15**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas, Faculdade de Biologia, da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Cerqueira dos Santos

MARABÁ, PA
2018

DANIELLY CRISTINA MARQUES DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE METAIS PESADOS NO
CRESCIMENTO E NA PRODUÇÃO DE SURFACTANTE DA LINHAGEM
Pseudomonas fluorescens Slim15**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sidnei Cerqueira dos Santos
(Orientador)

Prof. Dr. Ulisses Albino
(Membro Titular- ICE)

Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva
(Membro Titular- ICE)

Marabá-PA, 18 de dezembro de 2018

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por ser meu guia nessa longa caminhada, me dando forças e coragem para enfrentar as dificuldades.

Aos meus queridos pais, Socorro Castro e Deusimar Castro, aos meus irmãos Gabriel de Jesus e Matheus Henrique, que foram meu alicerce e não mediram esforços para me impulsionar até esta etapa da minha vida.

Ao meu excelentíssimo orientador Sidnei Cerqueira dos Santos, pela paciência, apoio e incentivos que tornaram este momento possível.

Aos meus professores, que construíram a escada do saber para que eu pudesse subir.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, especialmente aos meus pais, Socorro Castro e Deusimar Castro por sempre acreditarem em mim, por seu apoio, força, incentivo e amor incondicional. Essa conquista eu devo principalmente a vocês, por serem meu alicerce e tenham a plena certeza que sem vocês eu não seria essa mulher que sou hoje. Sou grata, também, por todo apoio recebido pelo meu namorado Athos Reis, que me acompanhou desde o início dessa trajetória e sempre torceu pelo meu sucesso.

Sou grata à Instituição UNIFESSPA, que me proporcionou a oportunidade de ingressar no curso de Ciências Biológicas, e principalmente por me proporcionar um corpo docente excelente e incrível, sou extremamente honrada em ter sido aluna de professores tão maravilhosos como o professor Diógenes Siqueira, Cibelle Moreira, Zanderluce Gomes, Ana Cristina que foi essencial para a produção desse projeto, com o auxílio das análises estatística. Aos professores Ulisses Brigatto e Sebastião da Cruz pelo auxílio com materiais, disposição do laboratório e seus conhecimentos. Ao laboratório de Cinética e Dinâmica Molecular (Lablaser) pelo espaço para análise de tensão superficial.

Sou muitíssimo grata ao meu querido orientador Prof. Dr. Sidnei Cerqueira, por sua dedicação e amor ao ensino, por confiar no meu trabalho, acreditar em meu potencial e exigir o meu melhor, que nem eu mesma sabia que era capaz de realizar. Desde 2015 me guiando nessa caminhada, resgatou uma caloura crua e encaminhou e me fez crescer no mundo acadêmico, sou gata por cada palavra de incentivo, por cada puxão de orelha, por cada “Oh moça, não é assim”, “Moça, você está me dando uma trabalhadeira arretada”. Se eu conseguir ser a metade do profissional que o senhor é, serei com certeza uma bióloga exemplar. Obrigada por tudo, Tio Sid.

Meus sinceros agradecimentos ao grupo de pesquisa ICV, pela ajuda no processo experimental do projeto, especialmente à Thalyta Oliveira e Gabriel Nava, saibam que vocês foram essenciais nessa etapa e com a ajuda de vocês tornou-se mais rápido e mais brando essa etapa.

E por fim e não menos importante, quero agradecer aos meus amigos de longa data, Evelyn Caroline, Camila Mota, Luis Matheus e Yago Silva que sempre torceram por minhas conquistas e tenho certeza que estão vibrando junto comigo, sou grata pelo apoio e suporte que me forneceram nesses anos, obrigada amigos. E aos meus amigos que conquistei ao longo dessa graduação, Lorena Paz minha querida amiga que sempre está comigo dos melhores aos piores momentos,

you are primordial in my life, Thalyta Oliveira my lab partner and friend all the time, Elis Rodrigues, Wenderson Felipe, Camila Maciel, Jhennifer Gomes and Juan David. My family, I am grateful for everything, know that everything became easier with you on my side, you are responsible for my daily joy in these 4 years, and that our friendship transcends graduation, and know that I cheer for the success of all.

*"Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."
(Dalai Lama)*

RESUMO

O crescimento desordenado populacional e o aumento de atividades industriais e agrícolas são responsáveis por impactos ambientais de grandes proporções, como a contaminação da água e do solo por metais pesados. Esses resíduos minerais quando manuseados inadequadamente trazem amplo risco à saúde humana e aos demais seres vivos, pois possuem propriedades em reatividade e são bioacumuladores. Essas indicações reveem a emergente busca de tecnologias para reduzir os impactos ambientais ocasionados por acidentes e descarte inadequado residuais, assim, métodos biodegradáveis são uma alternativa viáveis para esse emblema como a biorremediação, que é uma tecnologia que utiliza o metabolismo de microrganismos para a eliminação, transformação ou a redução de poluentes à níveis de concentração aceitáveis. Micro-organismos potencialmente biorremediadores são capazes de crescer e proliferar em áreas hostis com altas concentrações de metais e podem produzir metabólicos secundários, como os biossurfactantes, que apresentam propriedades emulsificantes, dispersantes e solubilizantes, podendo ocasionar a utilização de substratos hidrofóbicos e a mobilização do contaminante. Os biossurfactantes possuem vantagens especiais comparando-as com surfactantes químicos, como a biodegradabilidade, compatibilidade ambiental e baixa toxicidade, demonstrando grande potencial para a biorremediação de áreas impactadas com metais pesados. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de metais pesados no crescimento e na produção de surfactante da linhagem *Pseudomonas fluorescens* Slim15.

Palavras-chave: Bactéria; Biorremediação; Biossurfactante; *Pseudomonas fluorescens*

ABSTRACT

The disorderly population growth and the increase in industrial activities and agricultural activities are responsible for large-scale environmental impacts, such as contamination of water and soil by heavy metals. These mineral residues, when handled improperly, pose a great risk to human health and to other living beings, because they have properties in reactivity, and are bioaccumulators. These indications reviews the emerging search for technologies to reduce environmental impacts caused by accidents and inappropriate waste disposal, thus, biodegradable methods are a viable alternative to this emblem such as bioremediation, which is a technology that uses the metabolism of microorganisms for the disposal, transformation or reduction of pollutants at acceptable concentration levels. Potentially bioremediation microorganisms are able to grow and proliferate in hostile areas with high concentrations of metals, and may produce secondary metabolites, such as biosurfactants, such as biosurfactants, which have emulsifying, dispersing and solubilizing properties, which may lead to the use of hydrophobic substrates and the mobilization of the contaminant. Biosurfactants have special advantages compared to chemical surfactants, such as biodegradability, environmental compatibility and low toxicity, demonstrating great potential for bioremediation of impacted areas with heavy metals. In this sense, this work had as objective to evaluate the influence of heavy metals on the growth and the production of surfactant of the lineage *Pseudomonas fluorescens* Slim15.

Keywords: Bacterium; Bioremediation; Biosurfactant; *Pseudomonas fluorescens*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Coloração de Gram da <i>P.fluorescens</i> em microscopia de luz-----	17
Figura 2 - Solução Mc Farland para ajuste de solução bacteriana -----	18
Figura 3 - Esquema do experimento da tolerância ao metal-----	19
Figura 4 - Esquema do processo de semeadura simples para determinação da CBM -----	19
Figura 5 - Mesa agitadora com amostras para produção de biossurfactante -----	20
Figura 6 - Caldo livre de células da bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i> -----	21
Figura 7 - Representação de índice de emulsificado-----	21

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO	12
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Contaminantes ambientais	12
1.2 Metais pesados	13
1.3 Biorremediação	13
1.4 Biossurfactante	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Micro-organismo	17
3.2 Metais pesados	17
3.3 Teste de tolerância a metais pesados	17
3.4 Influência de metais pesados na produção de biossurfactante	20
3.5 Análise Estatística	22
4 REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO II – AÇÃO BIORREMEIADORA DO SURFACTANTE PRODUZIDO PELA BACTÉRIA <i>Pseudomonas fluorescens</i> Slim15	26
Introdução	28
Materiais e Métodos	29
<i>Micro-organismo</i>	29
<i>Metais pesados</i>	30
<i>Teste de tolerância a metais pesados</i>	30
<i>Influência de metais pesados na produção de biossurfactante</i>	31
<i>Análise estatística</i>	32
Resultados	32
<i>Teste de Tolerância a Metais Pesados</i>	32
<i>Influência de metais pesados na produção de biossurfactante</i>	33
Discussão	34

<i>Teste de Tolerância a Metais Pesados</i>	34
<i>Influência de metais pesados na produção de biossurfactante</i>	36
Conclusão	37
Agradecimentos	37
Referências	38
Tabelas	45
Legenda de figuras	46
Figuras	47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
ANEXOS	51
Anexo 1. Instrução para submissão de manuscrito na revista World Journal of Microbiology and Biotechnology	51

CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes ambientais

A poluição do meio-ambiente, devido as ações antrópicas, é um dos fatores ativos na degradação da biosfera (SILVA et al., 2010). O crescimento da industrialização é um dos elementos que incorporam a degradação de recursos naturais (DECESARO et al., 2013). A contribuição do homem na contaminação do ecossistema pode originar por diversas fontes, através de atividades industriais, como descarte inadequado de efluentes contaminados; atividades mineradoras no despejo de rejeitos minerais de forma incorreta, dispersão de cinzas de processos de incineração; aterros sanitários, efluentes domésticos e atividades agrícolas com o uso de fertilizantes e agroquímicos (ARAÚJO; PINTO FILHO, 2010; MALDONADO; WENDLING, 2009).

Atividades agrícolas são potencialmente poluidoras devido ao despejo de grandes quantidades de substâncias poluentes no solo, produtos denominados azotados e fosfatados em forma de adubos, estrumes ou lamas residuais de fertilizantes e pesticidas (RIBEIRO, 2013). No tocanto à poluição no solo, o agregado dos agrotóxicos pode provocar a absorção de elementos minerais (CARVALHO; ORSINE, 2011). Nos centros urbanos, o solo está mais susceptível a altas concentrações de metais pesados como zinco, cobre, chumbo, níquel, principalmente quando estão próximas a rodovias e ferrovias (RIBEIRO, 2013).

A mineração é uma das atividades mais importantes para desenvolvimento do país, grande parte da população brasileira tem sua economia baseada nesse setor, entretanto é considerada uma prática que produz grandes quantidades de resíduos minerais e contribui para a contaminação do ambiente (CARVALHO et al., 2017). Toda atividade de mineração resulta em uma supressão da vegetação, interrompendo o crescimento e interferindo na qualidade da água, impactam todo o ecossistema, tanto prejudica a flora, fauna como a saúde humana.

As indústrias mineradoras possuem grande relevância no processo de contaminação associado a drenagem ácida de minas (DAM). A DAM é a solução aquosa ácida gerada quando minerais presentes em resíduos de mineração são oxidados espontaneamente em presença de oxigênio e água, produzindo ácido sulfúrico que dissolve metais presentes no solo e rocha (MUYZER, 2014). Os metais dissolvidos apresentam risco potencial de contaminação do solo, dos recursos hídricos e dos sistemas biológicos (BAILÓN-SALAS et al., 2018).

1.2 Metais pesados

O termo metal pesado é utilizado para elementos que possuem densidade maior que 5 g/cm³ ou que possuem número atômico superior a 20 (MALDONADO; WENDLING, 2009), e possuem características particulares, como bons condutores de eletricidade e, conseguem participam de reações químicas com íons positivos de enzimas no metabolismo. Segundo Lima, (2013), esses elementos também são denominados elementos-traço, e alguns destes elementos, como Mg, Fe, Zn, Mn, Cu são metais essenciais, com funções importantes no metabolismo dos organismos, se em baixas concentrações pois, em altas concentrações torna-se tóxico igualmente aos metais que mesmo em elementos-traços são altamente tóxicos, são considerados metais não essenciais, por exemplo, mercúrio, chumbo, cádmio, pois não possuem nenhuma função conhecida nos organismos.

O aumento da concentração de metais pesados no meio ambiente pode trazer riscos à saúde humana e aos demais seres vivos, pois são tóxicos e geralmente possuem um alto período de detenção no meio ambiente e fomenta à acumulação em animais, plantas e seres humanos (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). Esses metais pesados são considerados poluidores, pois possuem propriedades de bioacumulação e biomagnificação, ou seja, os predadores de topo de cadeia acumulam muito mais metais pesados que suas presas, os íons vão passando ao longo da cadeia alimentar (GUO; KANG; FENG, 2017). Os metais pesados acumulam-se no ambiente, principalmente em solos e sedimentos de áreas contaminadas, e podem causar toxidez aos microrganismos, forçando-os a recorrer a mecanismos de resistência a esses metais.

1.3 Biorremediação

Pode-se denominar biorremediação a utilização de organismos vivos tais como, plantas, micro-organismos e/ou seus metabólicos na remediação de poluentes (SVARTBERG et al., 2005). Os micro-organismos podem ser caracterizados como agentes biorremediadores de ambientes impactados, que objetiva reduzir a concentração de contaminantes a níveis não tóxicos (PEREIRA; FREITAS, 2012). Na atualidade, processos de biorremediação com uso de micro-organismos são cada vez mais pesquisados por cientistas, devido à alta eficiência desses organismos, baixo custo, biodegradável e possuem mecanismos que os tornam resistentes a estresses ambientais, como a toxicidade de metais pesados (YIN et al., 2018).

Os processos de biorremediação são inovações tecnológicas que surgiram recentemente no mundo profissional e acadêmico, os quais vieram como alternativa de outros agentes remediadores não biodegradáveis e tóxicos, como uma tecnologia inovadora apresenta vários resultados satisfatórios (LUNA; RUFINO; SARUBBO, 2016; FELIPE; DIAS, 2017; BAILÓN-SALAS et al., 2018).

1.4 Biossurfactante

Os biossurfactantes são uma alternativa viável como biorremediador de ambientes contaminados, são amplamente utilizados em indústrias visando a recuperação do ambiente (LUNA et al., 2013). Os microrganismos produzem metabólitos secundários, como os biossurfactantes, que participam de forma eficaz na remediação de contaminantes inorgânicos e orgânicos, melhorando sua biodisponibilidade, transformando a estrutura molecular do contaminante e eliminando-o do ambiente (SHARMA; SINGH; VERMA, 2018). Os metabólicos produzidos por bactérias possuem uma estrutura anfifílica, compostas por duas porções, uma porção polar que possui afinidade com a água e outra porção apolar que possui repulsa a água (PIRÔLLO, 2006).

Esses metabólicos secundários possuem propriedades redutoras da tensão superficial e interfacial, com sucesso acima dos surfactantes químicos produzidos a base de hidrocarbonetos (BODOUR; MILLER-MAIER, 1998). Seus atributos, de baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, melhor desempenho bioemulsificante, tolerância a valores extremos de pH, salinidade e temperatura, caracteriza os biossurfactantes como produtos extremamente promissores (YIN et al., 2018; FELIPE; DIAS, 2017).

Devido suas propriedades vantajosas, os biossurfactantes são utilizados em diversos setores, como agricultura, produção de alimentos, química, cosméticos e farmacêutica. Estes possuem uma classificação consoante ao seu peso molecular, os biossurfactante de baixo peso estão incluídos os glicolipídios, os fosfolipídios e os lipolipídios, e os metabólicos de alto peso molecular estão os polissacarídeos, as proteínas, as lipoproteínas e os lipopolissacarídeos (PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2011).

Os surfactantes microbianos desempenham um papel fundamental nos processos de remoção de poluentes em ambientes naturais, principalmente o que diz respeito aos metais, pois

eles são altamente eficientes na complexação de íons metálicos, reduzindo a toxicidade ou até mesmo transformando-os em outros compostos menos tóxicos (SILVA et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de metais pesados no crescimento e na produção de surfactante da linhagem *Pseudomonas fluorescens* Slim15.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o crescimento da espécie *Pseudomonas fluorescens* Slim15 na presença de diferentes concentrações e tipos de metais.

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de metal capaz de inibir o crescimento da bactéria em estudo.

Determinar a concentração bactericida mínima (CBM) das amostras que não apresentaram crescimento no ensaio de CIM.

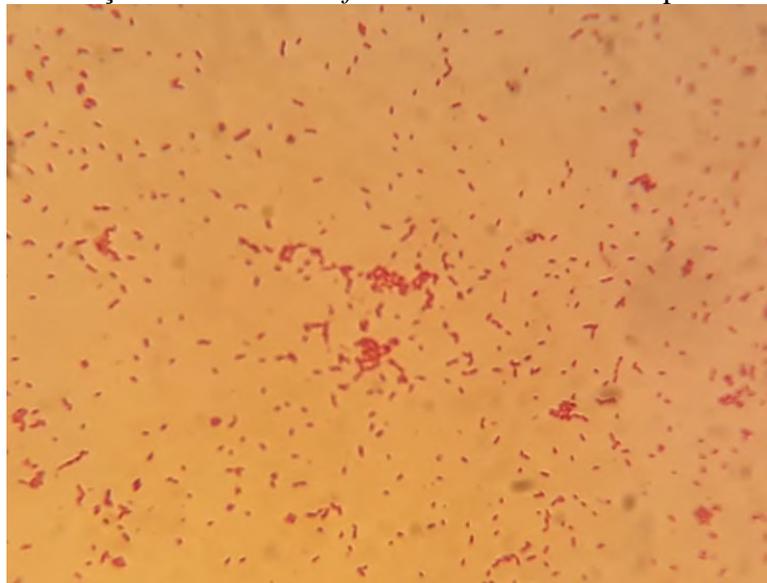
Avaliar a influência de metais pesados na produção de biossurfactante.

3 METODOLOGIA

3.1 Micro-organismo

A linhagem produtora de biossurfactante *Pseudomonas fluorescens* Slim15 (Figura 1) isolada no Parque Municipal de Mucugê, no estado da Bahia, Brasil (SANTOS et al., 2012) foi fornecida pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS), localizada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil. A linhagem bacteriana foi conservada no meio agar triptona de soja (TSA) (Kasvi) e mantida a 4°C no Laboratório Multiuso de Biologia da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

Figura 1. Coloração de Gram da *P. fluorescens* em microscopia de luz.



Fonte: Aatoria própria, 2018.

3.2 Metais Pesados

Os metais utilizados no experimento foram chumbo, zinco e cobre. A solução mãe foi preparada em água destilada, usando os seguintes sais: nitrato de chumbo [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] (Neon); sulfato de zinco (ZnSO_4) (Neon) e sulfato de cobre II (CuSO_4) (Neon), na concentração de 8.000 ppm de cada metal. A solução mãe foi esterilizada individualmente a 121°C por 20 minutos.

3.3 Teste de Tolerância a Metais Pesados

O teste de tolerância da bactéria *P. fluorescens* Slim15 aos metais pesados foi realizada a

partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).

A CIM foi realizada em placa para cultivo de células de 96 poços (Kasvi) contendo 90 μL de caldo Mueller-Hinton (CMH) (Himedia). Foi aplicado 100 μL da solução mãe de 8.000 ppm dos metais Pb, Zn e Cu nos respectivos poços, usando a técnica de diluição seriada, nas concentrações de 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 e 1.9 ppm. O inóculo de 10 μL da suspensão bacteriana foi aplicado em cada poço, como mostra a figura 2, ajustado a partir da escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/poço). O controle negativo foi realizado somente com CMH, CMH e solução de metal e apenas solução de metal, para controle positivo utilizou CMH e suspensão bacteriana. A placa foi incubada a 37°C por 24h (Figura 3).

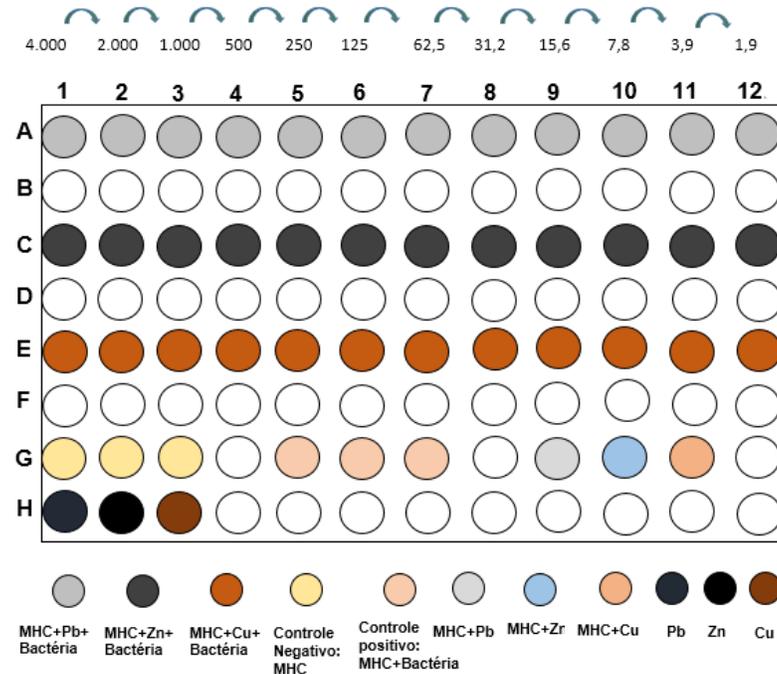
Após o período de incubação, foi aplicado nos poços 20 μL da solução reveladora incolor cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (Nuclear) e incubado na estufa por mais 2 horas. A leitura foi realizada através da mudança de coloração da solução reveladora, considerando o resultado positivo a presença de coloração rosa ou avermelhada e negativo a ausência de coloração (MOHR et al., 2017).

Figura 2. Solução Mc Farland para ajuste de solução bacteriana



Fonte: Autoria própria, 2018.

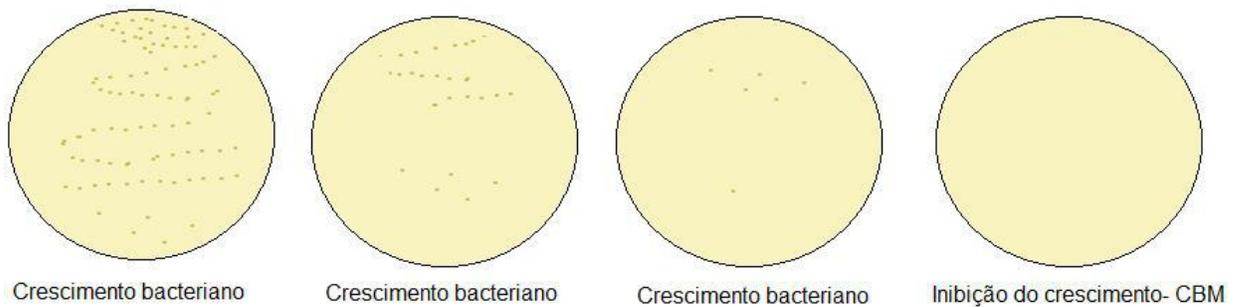
Figura 3. Esquema do experimento da tolerância ao metal



Fonte: Autoria própria, 2018.

A CBM foi realizada obtendo como base os resultados preliminares da inibição do crescimento no ensaio de CIM. Foi retirada uma alçada da cultura com o auxílio da alça bacteriológica, a partir dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano no teste de CIM, e semeada pela técnica de estrias por esgotamento na superfície do meio (TSA) contido em placa de Petri (Figura 4). A placa foi incubada na estufa a 37°C por 24 horas para avaliação de crescimento das colônias bacterianas.

Figura 4. Esquema do processo de semeadura simples para determinação da CBM



Fonte: Autoria própria, 2018.

3.4 Influência de Metais Pesados na Produção de Biossurfactante

A produção de biossurfactante foi realizada em Erlenmeyer de 50 mL contendo 30 mL de meio salino mineral (MSM), com a seguinte composição (g/L): K_2HPO_4 , 4,0 g; Na_2HPO_4 , 1,5 g; $NaNO_3$, 1,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,02g e glicerol, 0,5% (THAVASI et al., 2011). O pH foi ajustado para 7.0 usando HCl ou NaOH. O MSM foi esterilizado a 121°C por 20 minutos. Após a autolavagem, foi transferido individualmente 3.750, 935, 117, 58.5, 29.2 e 14.6 μ L da solução mãe de metal Pb, correspondentes as concentrações de 1000, 250, 31.25, 15.6, 7.8 e 3.9 ppm, respectivamente. Aos metais Zn e Cu foi adicionado 117, 58.5, 29.2 e 14.6 μ L da solução mãe para as concentrações de 31.25, 15.6, 7.8 e 3.9 ppm, na devida ordem.

O inóculo de 2,5 mL respectivo a 5% da suspensão bacteriana, ajustada conforme o teste de tolerância, foi adicionada no Erlenmeyer. Os controles negativos foram realizados com, MSM contendo as concentrações pré-determinadas dos três metais testados e o MSM puro sem inóculo, para o controle positivo foi produzido o MSM com inóculo bacteriano. Como demonstrado na figura 5, a cultura foi incubada no agitador orbital (QUIMIS) na rotação de 180 rpm, a 30°C, por 48 horas. Após essa etapa, as amostras de cultura foi centrifugada na Centrífuga SL 702 (SOLAB) a 4000 rpm por 20 minutos, para obtenção do caldo livre de células, mostrado na figura 6 (BUENO, 2008).

Figura 5. Mesa agitadora com amostras para produção de biossurfactante



Fonte: Autoria própria, 2018.

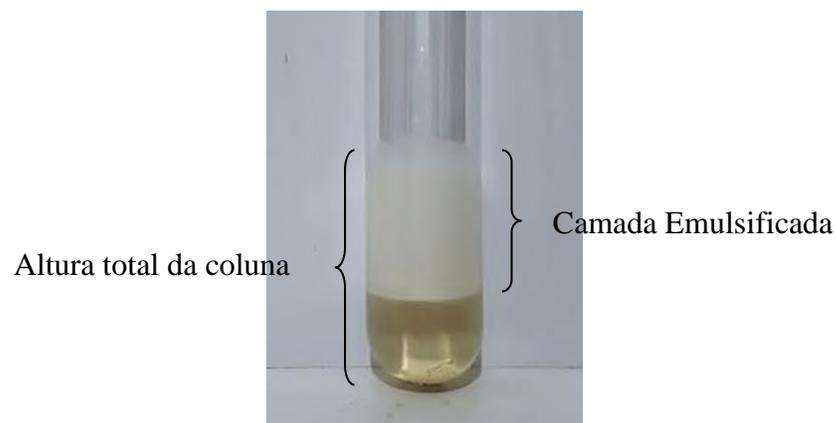
Figura 6. Caldo livre de células da bactéria *Pseudomonas fluorescens*



Fonte: Autoria própria, 2018.

A produção de biossurfactante foi medida através do índice de emulsificação (IE_{24}) (LUNA et al., 2013). Dois mililitros de óleo mineral (Nujol) e 2,0 mL do caldo livre de células foram transferidos para tubos de ensaio (100mm x 15mm) e vigorosamente agitados no vortex (Biomixer) por 2 minutos, após o processo foi deixado em repouso por 24 horas, em seguida, o IE_{24} foi calculado usando a seguinte fórmula: $IE_{24} (\%) = x / y \times 100$, onde x e y representam a altura da camada emulsificada (mm) e a altura total (mm), respectivamente (Figura 7). Os controles negativos foram realizados com MSM não inoculado e MSM com as concentrações definidas dos metais em estudo, já o controle positivo foi realizado com MSM e o caldo livre de células sem adicional de metal.

Figura 7. Representação de índice de emulsificado.



Fonte: Autoria própria, 2018.

A tensão superficial (TS) do caldo livre de células foi realizada no tensiômetro (DataPhysics, Oca15 plus), através do método da gota pendente à temperatura de 25°C. A tensão superficial da superfície da gota foi medida usando um sistema de imagem de vídeo automática e o programa Oca 10/Oca 20. O instrumento foi calibrado com ar e água destilada para uma leitura de $71,62 \pm 1.0$ mN/m (SANTOS et al., 2012).

3.5 Análise Estatística

Todos os testes de produção de biossurfactante foram realizados em triplicata, visando comparar as tendências centrais de produção de biossurfactantes entre as linhagens bacterianas. Os testes de análise foram realizados no programa Microsoft Excel 2013, utilizado o teste T de Student, visando comparar médias de dois grupos com amostras relacionadas. Foram considerados resultados estatisticamente significativos para valores de $p \leq 0,05$.

4 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.; PINTO FILHO, J. Identificação De Fontes Poluidoras De Metais Pesados Nos Solos Da Bacia Hidrográfica Do Rio Apodi-Mossoró - Rn. **Revista Verde**, v. 5, n. 2, p. 80–94, 2010.
- BAILÓN-SALAS, A. M. et al. Lead and copper removal from groundwater by spherical agglomeration using a biosurfactant extracted from *Yucca decipiens* Trel. **Chemosphere**, v. 207, p. 278–284, 2018.
- BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, R. M. Methods Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, n. 3, p. 273–280, 1998.
- BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes : isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.
- CARVALHO, M. S. DE et al. Concentração de metais no rio Doce em Mariana , Minas Gerais , Brasil Concentration of metals in the Doce river in Mariana , Minas Gerais , Brazil. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 37–41, 2017.
- CARVALHO, J. C. B.; ORSINE, J. V. C. Contaminação do meio ambiente por fontes diversas e os agravos á saúde a população. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1107–1118, 2011.
- DECESARO, A. et al. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 947–954, 2013.
- FELIPE, L. D. O.; DIAS, S. D. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes : vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 3, p. 228–236, 2017.
- GUO, J.; KANG, Y.; FENG, Y. Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 278–285, 2017.
- LIMA, D. P. DE. **Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do rio cassiporé, estado do amapá, amazônia, brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) - Fundação Universidade Federal do Amapá, Macapá.

LUNA, J. M. et al. Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 202–209, 2013.

LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A. Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 102, p. 558–566, 2016.

MALDONADO, A. C. D.; WENDLING, B. Manejo de ecossistemas aquáticos contaminados por metais pesados. **Agropecuária Técnica**, v. 30, n. 1, p. 21–32, 2009.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v. 30, n. 2, p. 261–278, 2004.

MOHR, L. C. et al. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de zno e tio₂ frente as bactérias *S. Aureus* e *E. Coli*. **Revista CSBEA**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 85, n. 1–2, p. 111–125, 2001.

MUYZER, G. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **nature reviews | microbiology**, v. 6, p. 441–454, 2014.

PACWA-PŁOCINICZAK, M. et al. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–654, 2011.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. DE. Uso De Microorganismos Para a Biorremediação De Ambientes Impactados. **Rev. Elet. em Gestão Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 975–1006, 2012.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

RIBEIRO, M. **Contaminação do solo por metais pesados**. 2013. Dissertação (mestrado em Engenharia do ambiente) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa .

SANTOS, S. C. et al. Biosurfactant production from *Pseudomonas* strains isolated in rhizospheric soils from semi-arid area of Bahia, Brazil. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v. 12, n. 1, p. 157–163, 2012.

SHARMA, R.; SINGH, J.; VERMA, N. Production, characterization and environmental applications of biosurfactants from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 132–139, out. 2018.

SILVA, F. S. F. DA et al. Produção de biossurfactantes por cepas bacterianas de origem marinha utilizando querosene como fonte de carbono. **Revista de ciências ambientais - rca**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2017.

SILVA, J. C. J. DA et al. Determinação de metais pesados em amostras de sedimentos superficiais da bacia do rio são francisco por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplada indutivamente após decomposição ácida assistida por radiação micro-ondas. **Eclética Química**, v. 39, p. 22–34, 2010.

SVARTBERG, K. et al. Controle de ph na técnica de biorremediação eletrocinética. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 2, p. 283–291, 2005.

THAVASI, R. et al. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. **Indian J Microbiol**, v. 51, n. 1, p. 30–36, 2011.

K. Yin, Q. Wang, M. Lv, L. Chen, Microorganism remediation strategies towards heavy metals, **Chemical Engineering Journal**, p.36 (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>.

CAPÍTULO II – AÇÃO BIORREMEIADORA DO SURFACTANTE PRODUZIDO PELA BACTÉRIA *Pseudomonas fluorescens* Slim15

Danielly Cristina Marques de Castro¹, Ana Cristina Viana Campos¹ Sebastião da Cruz Silva²,
Cristina Maria Quintella³, Sidnei Cerqueira dos Santos¹

Autor para correspondência: Sidnei Cerqueira dos Santos. Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas – IESB, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – Unifesspa. Avenida dos Ipês, s/n – Cidade Jardim – CEP: 68500-000 - Marabá – Pará. Telefone: 94 2101-7145, E-mail: sidnei.cerqueira@unifesspa.edu.br

Abstract

The contamination by heavy metals due to improper handling of mineral waste, promotes searches for efficient and biodegradable bioremediator measures, in this sense, biotechnological processes involving microorganisms have been used as a strategy to recover impacted environments. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of heavy metals on the growth and the production of surfactant of the *Pseudomonas fluorescens* Slim15 lineage, aiming at the selection of potential bioremediation agent of areas impacted by metals. To evaluate the tolerance to metals Pb, Cu and Zn, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) tests were carried out by means of a 96 well plate and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by sowing in Petri dishes. The analysis of the influence of metals on the biosurfactant production

¹ Laboratório Multiuso de Biologia, Instituto de Estudos em Saúde e Biológicas, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Cidade Universitária, Marabá, Pará, 68500-000.

² Laboratório de Análises Químicas, Instituto de Química, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. Unidade II, Marabá, Pará, 68505-080.

³ Laboratory of Kinetic and Molecular Dynamic, Institute of Chemistry, Federal University of Bahia, Campus de Ondina, Salvador, Bahia, 40170-290, Brazil

was evaluated from two properties of the biosurfactant, the emulsifying activity a measure of qualitative character and the surface tension test a quantitative measure. The results showed representative values in the MIC test, ranging from 62.5 to 2000 ppm and MBC of 4000 ppm for all tested metals. The metals showed significant influence on the production of emulsified and the reduction of surface tension. Thus, this research demonstrates that the bacterium *Pseudomonas fluorescens* Slim15 is a promising bioremediation agent of environments contaminated by heavy metals, revealing satisfactory yields, even in high concentrations of metals, so enhancing the study in biotechnology and reinforcing the applicability of products in this line of research.

Keywords: Biotechnology. Emulsified. Heavy metals. Surface tension. Tolerance.

Introdução

Os biossurfactantes fazem parte de um grupo de substâncias tensoativas capazes de reduzir a tensão superficial entre fluidos de diferentes polaridades, a partir da formação de agregados moleculares ou micelas, que são altamente eficientes na complexação de íons metálicos (Nitschke e Pastore 2002). Os surfactantes microbianos apresentam propriedades tensoativas promissoras, que se assemelham aos dos surfactantes químicos, porém, os biológicos se sobressaem pela baixa toxicidade, biodegradabilidade, possibilidade de produção a partir de fontes renováveis, estabilidade a valores extremos de pH e força iônica, pela maior atividade superficial e interfacial, bem como demonstram alta atividade emulsificante e detergência, além da possibilidade de modificação estrutural através de manipulação genética, biológica ou química (Felipe e Dias 2017).

As propriedades dos biossurfactantes fazem com que estes possuam uma vasta aplicabilidade em diversos setores, como nas indústrias farmacêutica e alimentícias, na produção de cosméticas e principalmente no processo de remediação de áreas impactadas por metais pesados, petróleo e seus derivados (Piróllo 2006; Bueno et al. 2010; Nitschke e Pastore 2002).

Os impactos ambientais advindos por metais pesados são decorrentes principalmente da eliminação inadequada de resíduos industriais ou de acidentes ambientais, ambos provenientes de atividades petrolífera e da mineração (Santana et al. 2013). As contaminações por metais pesados têm desencadeado desastres em grandes proporções, devido a sua alta toxicidade e bioacumulação. Por outro lado, alguns metais são considerados micronutrientes essenciais à manutenção dos processos fisiológicos das células e tecidos, incluindo cobre, manganês e zinco (Guo et al. 2017; Valls e Lorenzo 2002), porém, se utilizados em altas concentrações, esses íons formam complexos inespecíficos potencialmente tóxicos aos organismos (Mulligan et al. 2001; Nies 1999). Dessa forma, estes metais são considerados poluentes altamente persistentes na

natureza e capazes de alterar a diversidade, estrutura e função ecológica do ambiente contaminado (Baath 1989).

A busca por tecnologias de baixo impacto ambiental e com resposta de recuperação eficiente se faz cada vez mais necessário, como os processos de biorremediação, que utiliza de mecanismos biológicos para reduzir, degradar ou transformar poluentes tóxicos (Garbino 2013; Chibueze et al. 2016). O processo de biorremediação com surfactantes microbianos tem apresentado resultados promissores na complexação de metais (Brito et al. 2004). Os principais gêneros produtores de biosurfactante pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* e *Arthrobacter* (Santos 2012; Matsuura 2004). Os biosurfactantes mais estudados e que apresentam resultados mais eficientes são produzidos pelas famílias Pseudomonaceae e Bacillaceae (Bueno et al. 2010).

O gênero *Pseudomonas* é amplamente referenciado como bactérias que possuem tolerância à concentrações de metais pesados, como o Pb, Cu e Zn (Moraga et al. 2003; Echavez e Leal 2018). A espécie *Pseudomonas fluorescens* tem apresentado a capacidade de degradar compostos xenobióticos e de mobilizar de íons metálicos, devido a diversidade metabólica e capacidade adaptativa a diversos ambientes, tornando-a um potencial agente biorremediador (Paganini 2017; Lima et al. 2010; Latour e Lemanceau 1997; Hamme et al. 2006). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de metais pesados no crescimento e na produção de surfactante da linhagem *Pseudomonas fluorescens* Slim15, visando a seleção de potencial agente biorremediador de áreas impactadas por metais.

Materiais e Métodos

Micro-organismo

A linhagem bacteriana produtora de biosurfactante, *Pseudomonas fluorescens* Slim15 isolada no

Parque Municipal de Mucugê, no estado da Bahia, Brasil (Santos et al. 2012), foi utilizada nos ensaios de tolerância e produção de biossurfactante. Esta foi fornecida pela Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS 634), localizada no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil. A cepa de *P. fluorescens* foi conservada no meio agar triptona de soja (TSA) (Kasvi) e mantida a 4°C no Laboratório Multiuso de Biologia da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará.

Metais Pesados

A solução mãe de metais foi preparada em água destilada, usando os seguintes sais: nitrato de chumbo [Pb (NO₃)₂] (Neon); sulfato de zinco (ZnSO₄) (Neon) e sulfato de cobre II (CuSO₄) (Neon), na concentração de 8.000 ppm de cada metal. A solução mãe foi esterilizada individualmente a 121°C por 20 minutos.

Teste de Tolerância a Metais Pesados

O teste de tolerância de *P. fluorescens* Slim15 aos metais pesados foi realizada a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).

A CIM foi realizada em placa para cultivo de células de 96 poços, contendo 90 µL de caldo Mueller-Hinton (CMH). Foi aplicado 100 µL da solução mãe dos metais Pb, Zn e Cu nos respectivos poços, usando a técnica de diluição seriada, nas concentrações de 4.000 a 1.9 ppm. O inóculo bacteriano ajustado a partir da escala 0,5 de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ bactérias/poço), foi aplicado 10 µL em cada poço, realizou-se controles negativos e positivos para maior confiabilidade do estudo. A placa foi incubada a 37°C por 24h, após esse período adicionou-se a solução reveladora cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e incubado na estufa por mais 2

horas. A leitura foi realizada através da mudança de cor da solução reveladora (Mohr et al. 2017). A CBM teve como base os resultados do ensaio de CIM, sendo retirado uma alçada da cultura, com o auxílio da alça bacteriológica, a partir dos poços que apresentaram inibição e semeada por esgotamento na superfície do meio agar triptona de soja (TSA) em placa de Petri. A placa foi incubada na estufa a 37°C por 24 a 48 horas para avaliação de crescimento das colônias bacterianas.

Influência de Metais Pesados na Produção de Biossurfactante

A influência do tipo e da concentração dos metais testados foi avaliada a partir de duas propriedades do biossurfactante, atividade emulsificante e tensão superficial.

A produção de biossurfactante foi realizada em Erlenmeyer de 100 mL contendo 30 mL de meio salino mineral (MSM), com a seguinte composição (g/L): K_2HPO_4 , 4,0 g; Na_2HPO_4 , 1,5 g; $NaNO_3$, 1,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,02g; glicerol, 0,5% (THAVASI et al., 2011). O pH foi ajustado para 7.0 usando HCl ou NaOH. O MSM foi esterilizado a 121°C por for 20 minutos. Após a autolavagem, foi transferido individualmente 3.750, 935, 117, 58.5, 29.2 e 14.6 μ L da solução mãe de Pb, correspondentes as concentrações de 1000, 250, 31.25, 15.6, 7.8 e 3.9 ppm, respectivamente; e 117, 58.5, 29.2 e 14.6 μ L dos metais Zn e Cu. O inóculo de 2,5 mL da suspensão bacteriana, ajustada conforme o teste de tolerância, foi adicionado no Erlenmeyer. Os controles negativos foram realizados com MSM contendo as concentrações pré-determinadas dos três metais testados e MSM não inoculado, e o controle positivo foi MSM inoculado. A cultura foi incubada no agitador orbital (QUIMIS) na rotação de 180 rpm, a 30°C, por 48 horas. Após essa etapa, a cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos, para obtenção do caldo livre de células (Bueno 2008).

A produção de biossurfactante foi medida através do índice de emulsificação (IE₂₄) (Luna et al. 2013). Dois mililitros de óleo mineral (Nujol) e 2,0 mL do caldo livre de células foram transferidos para tubos de ensaio (100mm x 15mm) e agitados no vortex (Biomixer) por 2 minutos. Após 24 horas, o IE₂₄ foi calculado usando a seguinte fórmula: $IE_{24} (\%) = x / y \times 100$, onde x e y representam a altura da camada emulsificada (mm) e a altura total (mm), respectivamente. Os controles negativos foram realizados com MSM não inoculado e MSM com as concentrações definidas dos metais em estudo.

A tensão superficial (TS) do caldo livre de células foi realizada no tensiômetro (DataPhysics, Oca15 plus), através do método da gota pendente à temperatura de 25°C. A tensão superficial da superfície da gota foi medida usando um sistema de imagem de vídeo automática e o programa Oca 10/Oca 20. O instrumento foi calibrado com ar e água destilada para uma leitura de $71,62 \pm 1.0$ mN/m (Santos et al. 2012).

Análise estatística

Os testes de análise foram realizados no programa Microsoft Excel 2013, utilizado o teste T de Student, visando comparar médias de dois grupos com amostras relacionadas, considerando resultados estatisticamente significativos para valores de $p \leq 0,05$.

Resultados

Teste de Tolerância a Metais Pesados

Os resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima demonstram que a linhagem *P. fluorescens* Slim15 foi tolerante aos metais analisados, apresentando crescimento satisfatório na faixa de 1,9 a 31,25 ppm de zinco e cobre, e 1,9 a 1000 ppm de chumbo (Fig. 1),

sendo observado a inibição do crescimento a partir da concentração de 62,5 ppm de zinco e cobre, e 2000 ppm de chumbo.

Fig.1 situada em anexo de Figuras na página 28

A avaliação da concentração bactericida mínima foi realizada a partir da concentração de 62,5 ppm de zinco e cobre, e de 2000 ppm de chumbo. A CBM necessária para matar a linhagem *P. fluorescens* Slim15 foi de 4000 ppm para todos os metais testados, sendo considerado a morte do micro-organismo a ausência de colônias na superfície do meio TSA. A CBM de zinco e cobre foi 64 vezes maior que a CIM, em quanto que para o chumbo foi apenas duas vezes maior que a concentração necessária para inibir o crescimento da bactéria em estudo.

A inibição do crescimento bacteriano nos níveis toleráveis de metal reduz a atividade metabólica e divisão celular, mas algumas células permanecem viáveis podendo voltar a atividade em condições favoráveis. No entanto, o efeito bactericida dos metais sobre as cepas bacterianas aumenta gradativamente com o aumento da concentração de metal, inviabilizando a atividade metabólica de forma irreversível, destruindo toda forma de vida microbiana (Tortora et al. 2012).

Influência de Metais Pesados na Produção de Biosurfactante

Os resultados do índice de emulsificação realizado com o caldo livre de células de *P. fluorescens* Slim15 demonstraram que a maior produção de emulsificado ocorreu na concentração de 15,6 ppm de Zn e a menor com 7,8 ppm de Cu (Tabela 1). O controle positivo apresentou IE₂₄ de 59% e o negativo não apresentou formação de emulsificado.

Tabela 1 – situada na página 27.

De acordo com os testes de análise estatística, pode-se afirmar que as menores concentrações de Pb afetam positivamente o índice de emulsificação, indicando assim que houve diferença significativa ($p= 0,03$). Ao passo que, em concentrações mais altas do teste, as variações do

emulsificado não foram estatisticamente significativas (Fig. 2). Os resultados demonstraram que o metal cobre influenciou negativamente na produção de emulsificado com o caldo livre de células, diminuindo significativamente a formação da emulsão, com valor de $p \leq 0,03$ (Fig. 3). A Fig. 4 apresenta os valores do ensaio com metal Zn que obteve a maior média de formação de emulsificado, contudo, os resultados não apresentaram diferença significativa ($p \leq 1,0$) para produção do emulsificado nas concentrações testadas.

Fig.2, 3 e 4 - situadas em anexo de figuras na página 28

O surfactante produzido pela espécie *Pseudomonas fluorescens* foi capaz de reduzir a tensão superficial (TS) de 71,20 mN/m (controle) para valor próximo de 30 mN/m (Fig. 5), com a exceção do cobre que reduziu para menos de 10 mN/m ($p=0,000$).

Fig. 5 - situadas em anexo de figuras na página 29

Discussão

Teste de Tolerância a Metais Pesados

A adaptação microbiana é um mecanismo fundamental de resposta à presença de contaminantes, ambientes hostis, antibióticos, entre outras condições adversas (Andrade, Augusto, Jardim 2010).

A presença de íons metálicos pode induzir os genes das bactérias a desenvolver mecanismos de tolerância à toxicidade de metais, como Pb, Cd, Hg, Ni, Zn, entre outros, por meio da adsorção à parede celular, transporte através da membrana celular, armazenamento extracelular em cápsulas, precipitação ou por produção de metabólitos secundário bioemulsificantes (Malik 2004; Vicentin 2017; Zafar et al 2007). Estes mecanismos podem transcorrer por plasmídeos ou DNA cromossômico em diversas bactérias (Marzan et al. 2017; Rouch et al 1995; Malik 2004).

Segundo Alhasawi et al. (2015), a espécie *Pseudomonas fluorescens* possui capacidade de sobreviver em ambientes compostos por diversos metais, apresentando uma mudança metabólica

que garante a sobrevivência e o sequestro de metais. Moraga et al. (2003) demonstraram que o gênero *Pseudomonas* sp. foi resistente aos metais chumbo, cobre e zinco no teste de CIM, nas concentrações de 3,2 ppm para Pb, 3,2 ppm para Zn e 0,8 ppm para Cu. Echavez e Leal (2018) observaram que o gênero *Pseudomonas* foi tolerante a concentração de 5 ppm de Pb no teste de CIM. Para Rodríguez et al. (2017), a tolerância ao chumbo deve-se principalmente ao sequestro de íons metálicos. Chenia e Jacobs (2017) mostraram que *Pseudomonas* sp. foi tolerante a concentração de 1,45 ppm de Pb, 0,78 ppm de Zn e 0,41 ppm de Cu no teste de CIM. Cárdenas et al. (2017) observaram que a espécie *P. aeruginosa* apresentou tolerância aos metais Zn, Cu e Pb nas concentrações de 0,39, 0,10 e 0,51 ppm, respectivamente, no teste de CIM. Recentemente, Wu et al. (2018) isolaram uma linhagem de *Pseudomonas* sp. tolerante a concentração de 3,5 ppm de Cu no teste de CIM. Poirier et al. (2008) constataram que *P. fluorescens* apresentou tolerância às concentrações de 6,2 ppm de Zn e 4,2 ppm de Cu. Cruzando os resultados desta pesquisa com os trabalhos citados é possível observar que a linhagem *P. fluorescens* Slim15 apresentou maior perfil de tolerância aos metais em estudo, podendo se tornar um potencial agente biorremediador de metais.

As bactérias em geral possuem mecanismos de adaptação a ambientes inóspitos, entretanto, esses mecanismos tornam-se ineficazes a medida que as concentrações de metais são aumentadas, ocorrendo a saturação desses íons nos micro-organismos. Os íons metálicos interferem nas vias metabólicas das bactérias, competindo com os metais essenciais pelo sítios de ligações iônicas, afetando a fosforilação oxidativa, bloqueando enzimas no sistema de transporte de nutrientes, podendo, dessa forma, levar a morte das células bacterianas (Silva e Vieira 2008; Reis 2013). Segundo Xu et al. (2016), a presença de metais pesados em baixas concentrações induz a expressão de várias proteínas bacterianas, como resposta ao estresse, que pode inibir a resistência à antibióticos assim a bactéria torna-se mais vulnerável.

Influência de Metais Pesados na Produção de Biossurfactante

O índice de emulsificação é uma análise qualitativa (Paz et al. 2006) que determina indiretamente a presença de biossurfactante no caldo livre de células, assim como auxilia a dispersão de um fluido em outro, proporcionando o complexo de dois fluidos imiscíveis (Mnif e Ghribi 2015). Pinto et al. (2009) consideram que um bom agente emulsificante apresenta a habilidade de formar pelo menos 50% de emulsificado e mantê-lo estável no período de 24h, usando no teste óleo a base de hidrocarboneto. Santos et al. (2010, 2012) observaram que a linhagem *P. fluorescens* Slim15 apresentou índice de emulsificação próximo de 58%, usando diferentes substratos como fonte de carbono.

Lima et al. (2010) constataram a capacidade emulsificante da espécie *P. fluorescens*, apresentando IE₂₄ de 61,54%, utilizando óleo de girassol in natura como substrato. Peixoto (2008) isolou duas linhagens do gênero *Pseudomonas*, que apresentaram índice de emulsificado entre 57 e 61%, utilizando óleo de soja como substrato.

De acordo com Rufino et al. (2011) esses biossurfactantes produzidos possuem a capacidade de formar complexos entre suas micelas e íons metálicos, o que os tornam mais solúveis e podem ser removidos mais facilmente. Neste sentido, os biossurfactantes mobilizam esses metais no interior de suas micelas promovendo a rápida biorremediação de águas e solos contaminados.

O teste de tensão superficial é uma medida quantitativa que busca avaliar a atividade surfactante do sobrenadante (Matsuura 2004). De acordo com Desai e Banat (1997), para que um biossurfactante seja considerado um bom agente emulsificante, é necessário reduzir a TS abaixo de 40mN/m. Peixoto (2008) observou que as linhagens de *Pseudomonas* reduziram a tensão superficial na faixa de 26,8 a 31,5 mN/m. Na mesma linha de pesquisa, Lima et al. (2010) utilizaram caldo de abacaxi suplementado com óleo de girassol como substrato para produção de

biossurfactante pela *P. fluorescens* e observaram que o surfactante reduziu a TS da água de 72 para 27,5 mN/m. Silva et al. (2009) relataram que o biossurfactante produzida pela espécie *P. fluorescens* reduziu a TS de 70 mN/m para 30,04 mN/m, usando petróleo como substrato.

O modelo experimental de produção de biossurfactante na presença de metais é recente no mundo acadêmico, havendo poucos estudos acerca do assunto, apontando esse trabalho como propulsor de uma nova linha de pesquisa que estuda à influência de metais pesados na produção de biossurfactante.

Conclusão

De acordo com os resultados dessa pesquisa, foi possível observar que a produção de biossurfactante na presença de metais influenciou a produção do emulsificado e a redução da tensão superficial da linhagem *Pseudomonas fluorescens* Slim15. Demonstrando ótimo crescimento bacteriano ao teste de tolerância ao metal chumbo, e crescimento positivo de metais zinco e cobre quando comparados a literatura. O biossurfactante apresentou ótimo desempenho na redução de tensão superficial, demonstrando o menor valor de redução da tensão superficial no metal cobre.

A aplicabilidade do biossurfactante biológico é cientificamente comprovada, possuindo peculiaridades que sobressai aos surfactantes industriais e alguns biológicos, tornando-se uma alternativa estratégica para desenvolvimento de processo biorremediação para tratamento de ambientes contaminados por íons metálicos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Cinética e Dinâmica Molecular (Lablaser) da Universidade Federal da Bahia pela por colaborar na realização das análises de tensão superficial.

Referências

Alhasawi A, Costanzi J, Auger C, Appanna ND, Appanna VD. (2015) Metabolic reconfigurations aimed at the detoxification of a multi-metal stress in *Pseudomonas fluorescens* : Implications for the bioremediation of metal pollutants. *Journal of Biotechnology* 200: 38–43.

Andrade JIA, Augusto F, Jardim ICSF. (2010) Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclét. Quím* 35: 17–43.

Baath E. (1989) Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution* 2: 335–379.

Brito JRF et al. (2004) Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. *Acta sci. vet* 32: 125–131.

Bueno SM (2008) Bactérias produtoras de biossurfactantes : isolamento, produção, caracterização e comportamento num sistema modelo. Tese, Universidade Estadual Paulista.

Bueno SM, Silva AN, Garcia-Cruz CH.(2010) Estudo da produção de biossurfactante em caldo de fermentação. *Quim. Nova* 33: 1572–1577.

Cárdenas OGG et al. (2017) Perfíles de resistencia a antibióticos y metales pesados en

Pseudomonas aeruginosa potencialmente patógenas aisladas de agua de uso agrícola Antibiotic and heavy metal resistance profiles in potentially pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from agri. Nova Scientia 9: 97–112.

Chenia HY, Jacobs A. (2017) Antimicrobial resistance , heavy metal resistance and integron content in bacteria isolated from a South African tilapia aquaculture system. Dis Aquat Org 126: 199–209.

Chibueze C, Chioma A, Chikere B. (2016) Bioremediation techniques – classification based on site of application : principles , advantages , limitations and prospects. World J Microbiol Biotechnol 32: 1–18.

Desai JD, Banat IM. (1997) Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. Microbiol. Mol. Biol. Rev 61: 47–64.

Echavez FLC, Leal JCM. (2018) Bacterias heterótrofas de dos sitios contrastados del lago de maracaibo (venezuela) comparison of heavy metal ecotoxicity on heterotrophic bacteria from two. Bistua 14: 1–9.

Felipe LDO, Dias SDC. (2017) Surfactantes sintéticos e biossurfactantes : vantagens e desvantagens. QNEsc 39: 228–236.

Garbino CF (2013) Caracterização e identificação de microrganismos produtores de biossurfactantes para a biorremediação de cátions metálicos. Dissertação, Centro Universitário La

Salle – UNILASALLE.

Guo J, Kang Y, Feng Y. (2017) Bioassessment of heavy metal toxicity and enhancement of heavy metal removal by sulfate-reducing bacteria in the presence of zero valent iron. *J Environ Manage* 203: 278–285.

Hamme JDV, Singh A, Ward OP. (2006) Physiological aspects Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. adv* 24: 604–620.

Latour X, Lemanceau P. (1997) Métabolisme carboné et énergétique des *Pseudomonas* spp fluorescents saprophytes à oxydase positive. *Agronomie* 17: 427–443.

Lima DP. (2013) Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do rio cassiporé, estado do amapá, amazônia, brasil. Dissertação, universidade federal do amapá, 2013.

Lima RA, Andrade RFS, Santos LQ, Takaki GMC (2010) Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* em caldo de abacaxi (*Ananas comosus*) com óleo de girassol pós-fritura e aplicação na remoção de derivado do petróleo. *Exacta* 8: 201–210.

Liu J, Vipulanandan C. (2013) Effects of Au / Fe and Fe nanoparticles on *Serratia* bacterial growth and production of biosurfactant. *Mater. Sci. Eng. C* 33: 3909–3915.

Luna JM et al. (2013) Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids Surf. B* 102: 202–209.

Malik A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int* 30: 261–278.

Matsuura ABJ (2004) Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. Tese, Universidade Estadual de Campinas.

Mnif I, Ghribi D. (2015) High molecular weight bioemulsifiers, main properties and potential environmental and biomedical applications. *World J Microbiol Biotechnol* 31: 691–706.

Mohr LC, Capelezzo AP, Rippel T, Ternus RZ, Dalcanton F, Fiori MA, Mello JMM. (2017) Efeito antimicrobiano de nanopartículas de zno e tio₂ frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. *Revista CSBEA* 3: 1–10.

Moraga R, Merino C, Mondaca MA. (2003) Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Invest. mar* 31: 91–95.

Mulligan CN, Yong RN, Gibbs BF. (2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. hazard. mater* 85:111–125.

Nies DH. (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 730–750.

Nitschke M, Pastore G. M (2002) Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Quim. Nova* 25: 772–776.

Paganini CC (2017) Ação antimicrobiana de filme ativo incorporado com óleo essencial de

orégano no crescimento de *Weissella viridescens* e *Pseudomonas fluorescens*. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina.

Paz MCF et al. (2006) Influência de cloreto de sódio e de cobre na produção de biomassa e biosurfactante por uma nova amostra de *Geobacillus stearotherophilus* ucp 986. Rev. Biol. Ciênc. Terra 1: 56–64.

Peixoto RM (2008) Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes Bioprospecção de microrganismos do gênero *Pseudomonas* produtores de biosurfactantes. Dissertação, Universidade de São Paulo.

Pinto MH et al. (2009) Avaliação cinética da produção de biosurfactantes bacterianos. Quim. Nova 32: 2104–2108.

Pirôllo MPS (2006) Estudo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos. Dissertação, Universidade Estadual Paulista.

Poirier I et al. (2008) Responses of the marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* to an excess of heavy metals : Physiological and biochemical aspects. Sci Total Environ 06: 1–2.

Reis KC (2013) Seleção de bactéria resistente a Fe com potencial aplicação em biorremediação. Dissertação, Universidade Federal de Lavras.

Rodríguez V et al. (2017) Biosorption of lead phosphates by lead-tolerant bacteria as a

mechanism for lead immobilization. *World J Microbiol Biotechnol* 33: 1–11.

Rouch DA, Lee BTO, Morby AP. (1995) Understanding cellular responses to toxic agents : a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal of industrial Microbiology* 14: 132–141.

Rufino RD, Rodrigues GIB, Campos-Takaki GM, Sarubbo LA, Ferreira SRM. (2011) Application of a Yeast Biosurfactant in the Removal of Heavy Metals and Hydrophobic Contaminant in a Soil Used as Slurry Barrier. *Applied and Environmental Soil Science* 2011: 7.

Santana MCCB, Machado BA, Pereira LO, Druzian JI. (2013) Processo de remoção de metais pesados derivados de mandioca por meio da utilização de quitosana. *Prospect&I* 6: 543–552.

Santos SC, Fernandez LG, Rossi-Alva JC, Roque MRA. (2010) Evaluation of substrates from renewable-resources in biosurfactants production by *Pseudomonas* strains. *Afr. J. Biotechnol* 9: 5704-5711.

Santos SC et al. (2012) Biosurfactant production from *Pseudomonas* strains isolated in rhizospheric soils from semi-arid area of Bahia, Brazil. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 12: 157–163.

Silva CMMS, Vieira R. (2008) Impacto de xenobióticos e metais pesados na microbiota do solo. In MELO, Itamar S. & AZEVEDO, João L. *Microbiologia Ambiental* 2: 17–48.

Thavasi R et al. (2011) Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. *Indian J Microbiol* 51: 30–36.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2012) *Microbiologia*. Artmed, Porto Alegre.

Valls M, Lorenzo V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev* 26: 327–338.

Vicentin RP (2017) Remoção e alocação de metais pesados por bactérias diazotróficas nodulíferas da espécie *Cupriavidus necator*. Tese, Universidade Federal de Lavras.

Wu D, Zhang Z, Gao Q, Ma Y. (2018) Isolation and characterization of aerobic, culturable, arsenic-tolerant bacteria from lead–zinc mine tailing in southern China. *World J Microbiol Biotechnol* 34: 177.

Xu Y et al. (2016) *International Biodeterioration & Biodegradation* Antagonistic effects of the combination of both zinc and cefradine on the growth and morphology of the opportunistic pathogen *Pseudomonas fluorescens* YZ2. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 111: 85–92.

Zafar S, Aqil F, Ahmad I. (2007) Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresour. technol* 98: 2557–2561.

Tabelas

Tabela 1. Índice de emulsificação do caldo livre de células de *P. fluorescens* na presença de chumbo, cobre e zinco em diferentes concentrações.

Metal	IE₂₄ (%)			
	3,9 ppm	7,8 ppm	15,6 ppm	31,25 ppm
Pb	60	60	54	27
Cu	23	3	10	14
Zn	59	52	63	59

Legenda de figuras

Fig. 1 Gráfico demonstrando a tolerância da bactéria *Pseudomonas fluorescens* Slim15 aos metais Pb, Zn e Cu

Fig. 2 Índice de emulsificado do caldo livre de células de *P. fluorescens* na presença de chumbo.

Fonte: Autoria própria, 2018.

Fig. 3 Índice de emulsificado do caldo livre de células de *P. fluorescens* na presença de cobre.

Fonte: Autoria própria, 2018

Fig. 4 Índice de emulsificado do caldo livre de células de *P. fluorescens* na presença de zinco.

Fonte: Autoria própria, 2018

Fig. 5. Tensão superficial do caldo livre de células de *P. fluorescens* na presença de chumbo, cobre e zinco em diferentes concentrações.

Figuras

Fig. 1

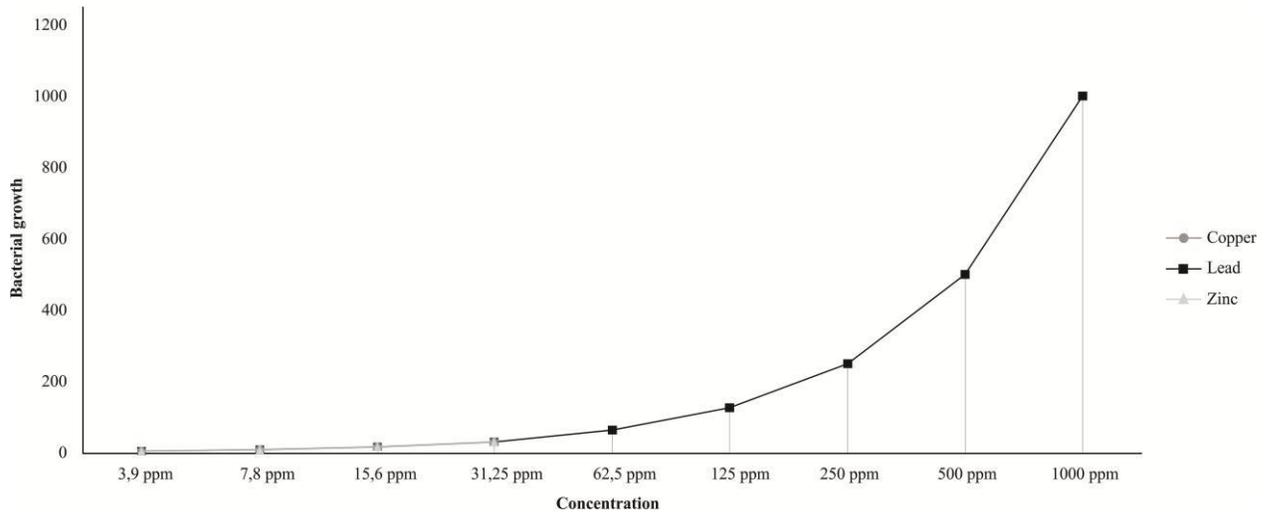


Fig. 2

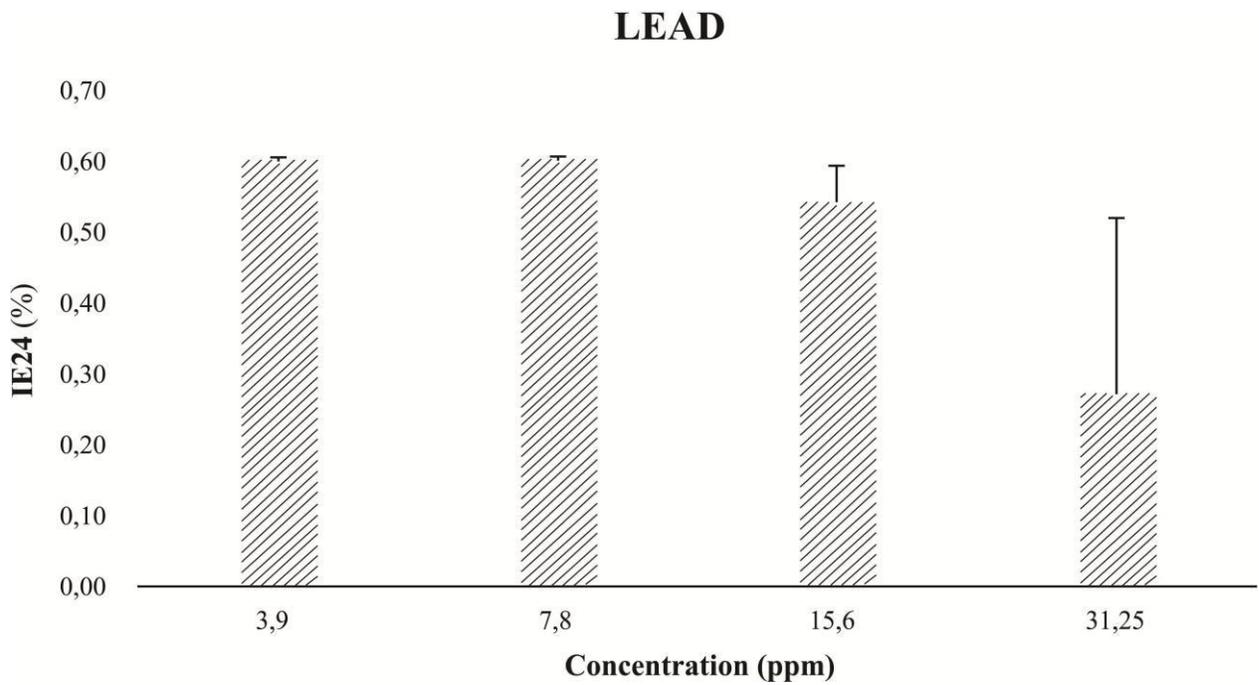


Fig. 3

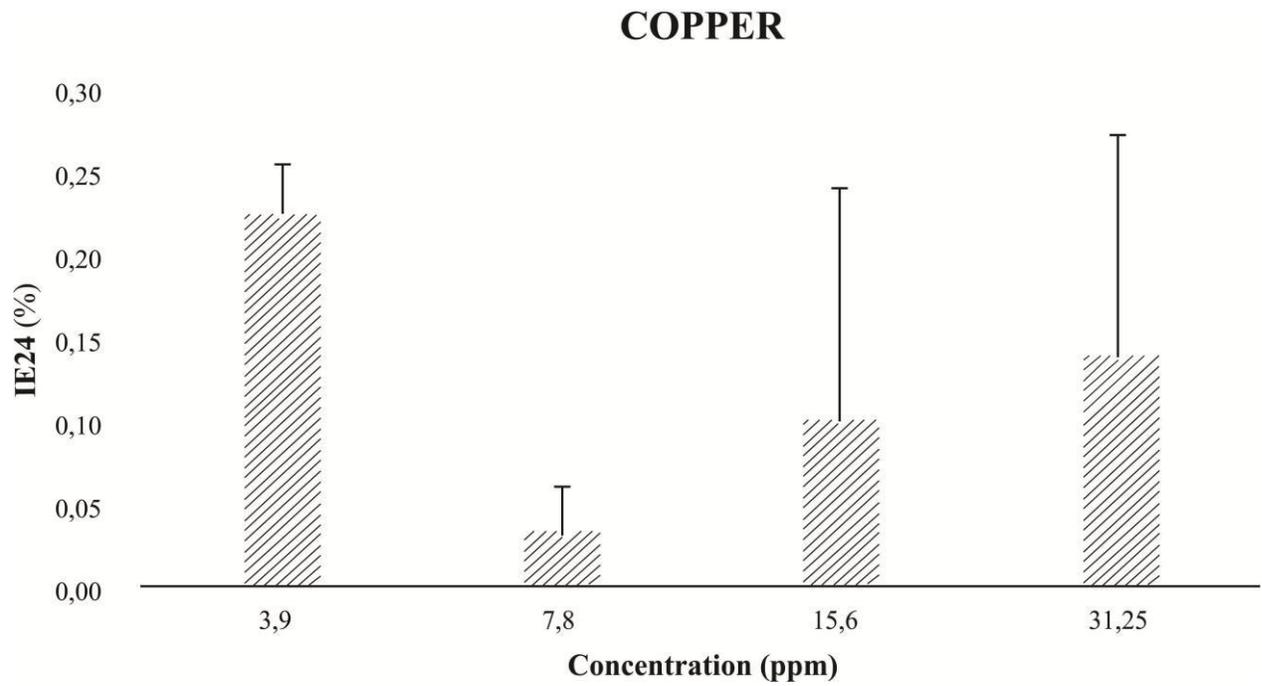


Fig. 4

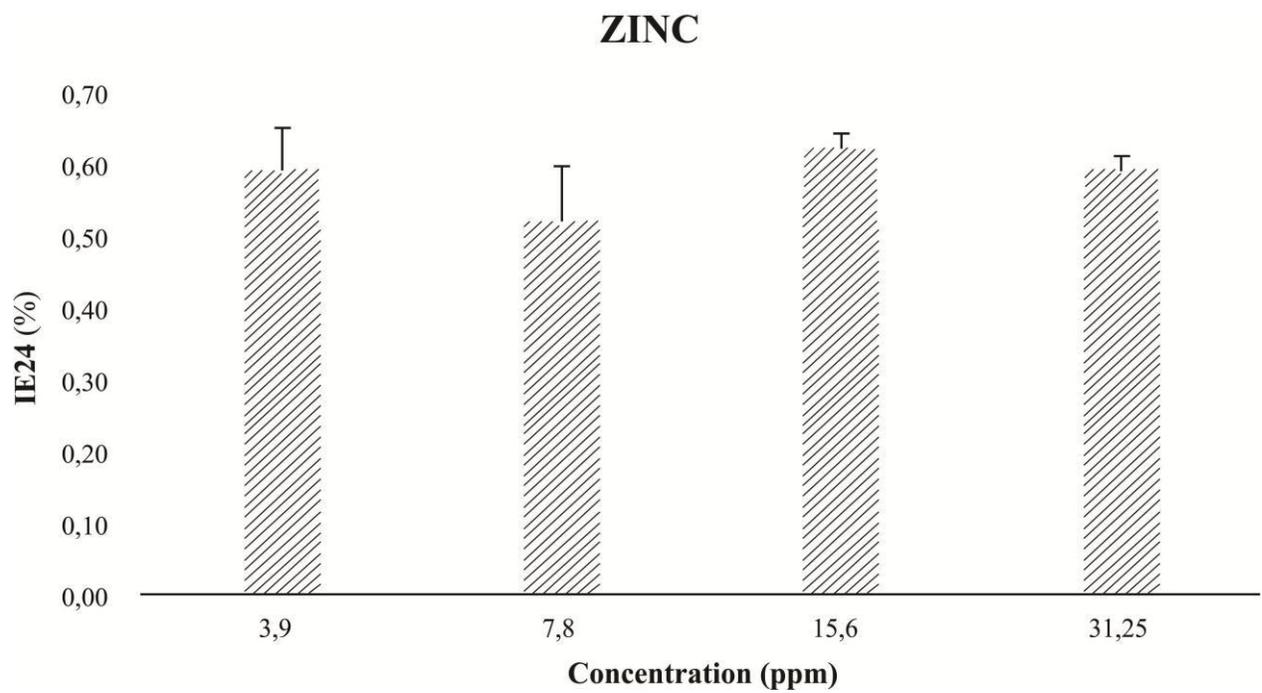
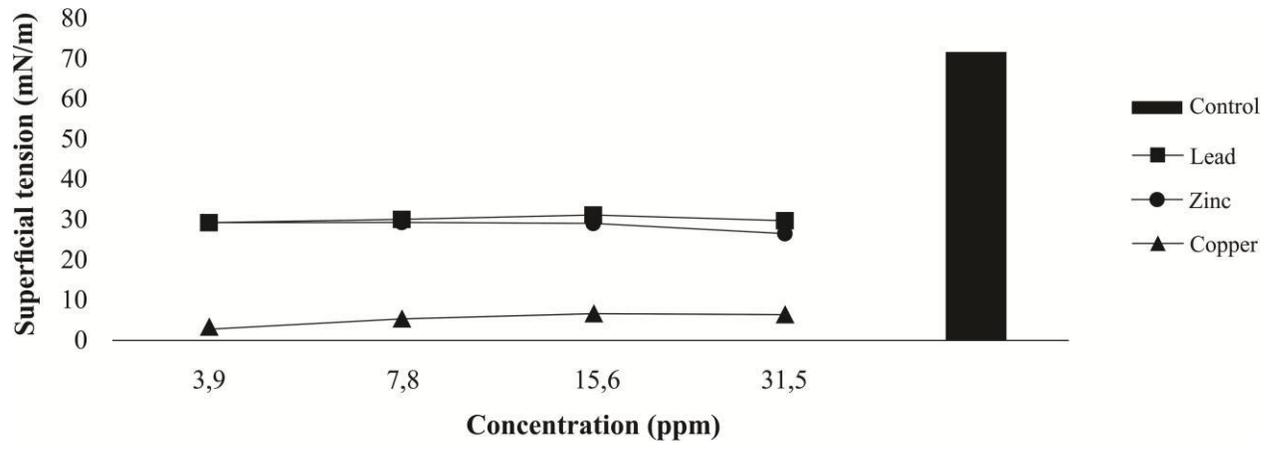


Fig. 5



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados dessa pesquisa, percebe-se que a bactéria *Pseudomas fluorescens* apresenta característica que a classifica como uma bactéria potencialmente biorremediadora. Os resultados do teste de tolerância aos metais mostraram um ótimo crescimento da bactéria em relação ao metal chumbo, e aos metais cobre e zinco manteve resultados positivos quando comparado aos testes realizados na literatura.

O biossurfactante produzido pela espécie bacteriana estudada obteve sua ação comprovada estatisticamente em relação ao metal chumbo, ação reduzida no metal cobre, sem diferença significativa no metal zinco e foi uma excelente redutora da tensão superficial, para valores abaixo de 40 mN/m, e a maior redução deu-se para o metal cobre. Demonstra-se assim que os metais influenciam diretamente na produção do emulsificado e redução da tensão superficial dessa linhagem, ou seja, aplicabilidade do biossurfactante biológico é cientificamente comprovada, possuindo peculiaridades que sobressaem aos surfactantes industriais a base de petróleo. Assim, o uso de métodos biotecnológicos para tratamentos in-situ de ambientes contaminados por íons metálicos, faz dessa produção, em uma perspectiva futura, a aplicação em processos de biorremediação.

ANEXOS

Anexo 1. Instrução para submissão de manuscrito na revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

11/12/2018

World Journal of Microbiology and Biotechnology - incl. option to publish open access

Life Sciences - Microbiology | World Journal of Microbiology and Biotechnology - incl. option to publish open access



www.springer.com

Microbiology Home > Life Sciences > Microbiology

SUBDISCIPLINES JOURNALS BOOKS SERIES TEXTBOOKS REFERENCE WORKS



World Journal of Microbiology and Biotechnology

Editor-in-Chief: Peter J. Large

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Journal no. 11274



\$199.00 Personal Rate e-only for the Americas

Get Subscription

Online subscription, valid from January through December of current calendar year

Immediate access to this year's issues via SpringerLink

1 Volume(-s) with 12 issue(-s) per annual subscription

Automatic annual renewal

More information: >> FAQs // >> Policy

IUMS ABOUT THIS JOURNAL EDITORIAL BOARD ABOUT THE EDITORS INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

MORE

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.