MARCELA DOS PASSOS GALLUZZI BALTAZAR

**Estudo do potencial de biossorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e
Enterobacter cloacae isoladas de uma área de mineração**

**São Paulo
2017**

MARCELA DOS PASSOS GALLUZZI BALTAZAR

**Estudo do potencial de biossorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e
Enterobacter cloacae isoladas de uma área de mineração**

Tese apresentada à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Engenharia
Química

Orientador: Prof. Dra. Elen Aquino
Perpetuo

**São Paulo
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Escola Politécnica da Universidade de São Paulo

Este exemplar foi revisado e corrigido em relação à versão original, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____

Catálogo-na-publicação

Baltazar, Marcela dos Passos Galluzzi

Estudo do potencial de bioabsorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae* isoladas de uma área de mineração / M. P. G.

Baltazar, E. A. Perpetuo -- versão corr. -- São Paulo, 2017.

122 p.

Tese (Doutorado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia Química.

1.Bioabsorção de cobre 2.Bioacumulação 3.Otimização de cultivo
I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de
Engenharia Química II.t. III.Perpetuo, Elen Aquino

BALTAZAR, M.P.G. Estudo do potencial de bioissorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae* isoladas de uma área de mineração. 2017. 122 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este trabalho aos meus avós paternos
Antonio Baltazar Filho e Ruth Galluzzi Baltazar,
minhas maiores e eternas saudades.

Agradecimentos

Gratidão é um dos sentimentos mais nobre que existem e nesse momento, eu quero agradecer a Deus por poder senti-lo e por todas as bênçãos que eu tenho nessa vida.

Agradeço imensamente:

Aos meus pais, por toda a liberdade, por toda confiança, por todos os ensinamentos, por todas as dores, por todos os conselhos, pela vida. Por estar aqui e por serem eles.

Aos meus avós maravilhosos, os mais doces momentos da vida. Os sorrisos mais gratificantes, minha gratidão eterna por todos os nossos momentos.

Aos meus irmãos, por toda nossa convivência e parceria, em tantas situações que exigiam amor, paciência e parceria. Minha fortaleza.

Ao Vinícius Boscolo, por cada segundo de paciência, pela parceria de alma e de vida, por ser meu porto seguro em todas as horas que eu precisei e por me dar os melhores sorrisos e experiências de vida. Pra toda vida, independente dos caminhos.

Agradeço ao Dr. Esio Bresciani, um grande modelo profissional, a pessoa que me deu a oportunidade e a inspiração de estar aqui hoje. Obrigada pela confiança, pra sempre.

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dra. Elen Aquino Perpetuo, acima de tudo uma grande amiga e um grande espelho. Sou muito grata pela confiança, pelos ensinamentos, pela parceria de sempre. É um presente ter você e uma ponte maravilhosa.

À todos os professores que já passaram pela minha vida e me ensinaram muito, me inspiraram e me fortaleceram.

Ao meu time mais bonito, companheiros de experimentos, de dúvidas, de aflições, de medos, de resultados, de alegrias, de muita parceria: Ingrid Avanzi, Louise Gracioso, Leticia Cardoso, Felipe Santana e Bruno Karolski. Juntos somos melhores com certeza. Obrigada por cada segundo de convivência, tudo ficou muito mais fácil e gostoso contando com a ajuda de vocês.

À Deborah Freitas por ter me ensinado muito quando eu sabia pouco. Na vida profissional e na vida pessoal. Uma “guru” e tanto. Inesquecível.

À toda equipe do CEPEMA-POLI-USP, que dividiu momentos incríveis comigo, me ensinaram muito e me acompanharam ao longo desses últimos 10 anos que eu trabalho aqui.

Ao Prof. Dr. Claudio Oller por me dar a oportunidade de viver tudo isso aqui.

Ao Prof. Dr. Jorge Tenório pela confiança, pelos ensinamentos, pela paciência e amizade.

Á todos os meus alunos que me lembram frequentemente quem eu fui um dia e me fazem querer ser a ponte deles também, e por consequência, ser melhor a cada dia.

Aos meus amigos do coração Rafael Santos e Juliana Peixoto por me darem de presente uma afilhada maravilhosa que me faz querer ser uma pessoa melhor a cada dia também.

Á todos os meus amigos de vida, sempre presentes me proporcionando dias melhores, muitas gargalhadas e momentos inesquecíveis.

Ao departamento de engenharia química e todos os funcionários que nele trabalham pelo suporte e esclarecimentos necessários durante todo o curso.

À todos que tornam minha vida melhor.

Á todos vocês, meu muitíssimo obrigada por tudo.

*“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu”*

RESUMO

BALTAZAR, M.P.G. **Estudo do potencial de bioissorção de cobre por *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae* isoladas de uma área de mineração.** 2017. 122 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A mina do Sossego, localizada em Canaã dos Carajás - Pará, principal mina de cobre do país, atualmente possui uma lagoa de rejeitos com baixas concentrações de cobre. Este é um cenário de impacto ambiental, que pode ser diminuído através de processos de biorremediação, usando a microbiota local. Neste contexto, este trabalho avalia a capacidade de bioissorção de cobre (Cu^{++}) por linhagens bacterianas isoladas de amostras ambientais da mina, bem como as melhores condições para o processo. Dentre as linhagens isoladas de amostras ambientais (água e sedimento), duas delas foram exploradas nesse trabalho quanto à resistência e capacidade de bioissorção de cobre, uma vez que mostraram-se representativas da microbiota e tolerantes à concentrações de até 400 mg.L^{-1} de Cu^{++} . Estas linhagens foram identificadas como *Enterobacter cloacae* e *Rhodococcus erythropolis* por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e sequenciamento do gene 16S rRNA, apresentando capacidades máximas de bioissorção de Cu^{++} de aproximadamente $122,0 \text{ mg.g}^{-1}$ e $370,0 \text{ mg.g}^{-1}$ para *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente, nas condições estudadas. Os parâmetros cinéticos de isotermas de bioissorção foram obtidos através do modelo de Langmuir. As melhores condições para o processo de bioissorção de Cu^{++} encontradas foram de 28°C , 180 rpm e $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa para, pH de 5 e 6, respectivamente para *R.erythropolis* e *E.cloacae*. Dados de bioacumulação também foram observados, sugerindo um mecanismo de efluxo celular para ambos os isolados, apresentando dados de captação máxima de Cu^{++} de 210 mg.g^{-1} , para *R. erythropolis* e 20 mg.g^{-1} , para *E. cloacae*. Também foram avaliadas diferentes condições de cultivo para maior obtenção de biomassa bacteriana, conseguindo um aumento de rendimento celular de até 7 vezes para *R. erythropolis* e 3 vezes para *E.cloacae*.

Palavras-chave: Bioissorção metálica. Bioissorção de cobre. Bioacumulação.

ABSTRACT

BALTAZAR, M.P.G. **Study of copper biosorption potential by *Rhodococcus erythropolis* and *Enterobacter cloacae* isolated from a mining area**. 2017. 122 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The Sossego mine, located in Canaã dos Carajás - Pará, currently has a tailings pond with low concentration of copper. This is an environmental impact scenario, which can be decreased by bioremediation processes using the local microbiota. In this context, this work evaluates the copper biosorption capacity (Cu^{++}) from bacterial strains isolated from environmental samples of the mine, as well as the best conditions for the process. Among the isolated strains of environmental samples (water and sediment), two of them were explored in this work regarding the resistance and capacity of copper biosorption, because they were abundant and tolerant to concentrations up to $400 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Cu}^{++}$. These strains were identified as *Enterobacter cloacae* and *Rhodococcus erythropolis* by MALDI-TOF and 16S gene sequencing, and showed maximum copper biosorption capacities of approximately 122.0 mg.g^{-1} and 370.0 mg.g^{-1} for *R. erythropolis* and *E. cloacae*, respectively, in the better conditions studied, according to kinetic parameters of biosorption isotherms, through the Langmuir model. The best conditions for the copper biosorption process were 28°C , 180 rpm and 0.1 g.L^{-1} of biomass for both, and pH of 5 and 6, respectively, for *R. erythropolis* and *E. cloacae*. Bioaccumulation data were also observed, suggesting a mechanism of cellular efflux for both bacteria and presenting data of maximum copper uptake of 210 mg.g^{-1} , for *R. erythropolis* and 20 mg.g^{-1} , for *E. cloacae*. Different cultivation conditions were also evaluated to obtain a higher bacterial biomass, achieving a cellular yield increase of up to 7 times for *R. erythropolis* and 3 times for *E. cloacae*.

Keywords: Metal biosorption. Copper biosorption. Bioaccumulation.

LISTA FIGURAS

Figura 1 – Imagens da Mina Sossego, em Canaã dos Carajás.	28
Figura 2 - Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF	31
Figura 3 – Principais interações entre micro-organismos e metais.	34
Figura 4 - Estrutura das paredes celulares de Gram-positivas e Gram-negativas.	42
Figura 5 - Influência do pH no processo de sorção e dessorção de metais.	44
Figura 6 – Comparativo teórico de máxima captação de metal para dois sorventes diferentes.	45
Figura 7 - Local de coleta das amostras, em Canaã dos Carajás.	51
Figura 8 - Esquema ilustrando a obtenção de micro-organismos a partir de amostras da Mina Sossego	52
Figura 9 - Esquema ilustrando o isolamento seletivo e a obtenção de colônias puras de bactérias.	52
Figura 10 - Esquema ilustrativo do preparo de amostras pra identificação por MALDI-TOF utilizando colônias crescidas em placas de meio sólido.	54
Figura 11 – Esquema de extração de proteínas para identificação de micro-organismos por MALDI-TOF.....	54
Figura 12 - Esquema representativo dos ensaios de MIC.	55
Figura 13 - Biorreator utilizado nos ensaios de otimização das condições de cultivo celular, da marca Infors HT, modelo Labfors 5.	57
Figura 14 - Esquema dos ensaios de bioacumulação de cobre.	59
Figura 15 - Sistema de filtração a vácuo para obtenção de curva de massa seca.	59
Figura 16 - Diagrama ilustrando as etapas de preparo da biomassa, i - viável e ii - inviável...	61
Figura 17 - Etapas dos ensaios de biossorção	62
Figura 18 - Localização exata das coletas de amostras da Mina Sossego, segundo coordenadas de GPS.....	64
Figura 19 - Dados de representatividade dos micro-organismos encontrados durante as coletas <i>in situ</i>	66
Figura 20 - Placa de cultivo de <i>E. cloacae</i> (à esquerda) e <i>R. erythropolis</i> (à direita), em meio LB sólido.....	67

Figura 21 - Espectro de proteínas fornecido por MALDI TOF para identificação de <i>Enterobacter cloacae</i>	68
Figura 22 - Espectro de proteínas fornecido por MALDI TOF para identificação de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	68
Figura 23 - Ensaio de mínima concentração inibitória de Cu ⁺⁺ para <i>Rhodococcus erythropolis</i>	71
Figura 24 - Dados de MIC de Cu ⁺⁺ para <i>Rhodococcus erythropolis</i> , após 4 dias de cultivo.....	71
Figura 25 - Dados de MIC de Cu ⁺⁺ para <i>Enterobacter cloacae</i> , após 4 dias de cultivo.....	72
Figura 26 - Cinética de crescimento de <i>R. erythropolis</i> , a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	74
Figura 27 - Cinética de crescimento de <i>R. erythropolis</i> , a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	74
Figura 28 - Cinética de crescimento de <i>R. erythropolis</i> , a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	74
Figura 29 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>R. erythropolis</i> , a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	75
Figura 30 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>R. erythropolis</i> , a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	75
Figura 31 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>R. erythropolis</i> , a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	75
Figura 32 - Curva de correlação entre dados de biomassa e dados absorbância a 600 nm de <i>R. erythropolis</i>	76
Figura 33 - Cinética de crescimento de <i>E. cloacae</i> , a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	76
Figura 34 - Cinética de crescimento de <i>E. cloacae</i> , a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	77
Figura 35 - Cinética de crescimento de <i>E. cloacae</i> , a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.	77
Figura 36 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>E. cloacae</i> , a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.....	77
Figura 37 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>E. cloacae</i> , a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.....	78
Figura 38 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>E. cloacae</i> , a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.....	78

Figura 39 - Curva de correlação entre dados de biomassa e dados absorbância a 600 nm de <i>E. cloacae</i>	79
Figura 40 - Comparativo entre os dados de produção celular de <i>R. erythropolis</i> para as variações de rotação (150, 350 e 550 rpm) e pH (6, 7 e 8).	81
Figura 41 - Comparativo entre os dados de produção celular de <i>E. cloacae</i> para as variações de rotação (150, 350 e 550 rpm) e pH (6, 7 e 8).	82
Figura 42 - Cinética de crescimento celular de <i>Rhodococcus erythropolis</i> em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (azul) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L ⁻¹ de Cu ⁺⁺ (vermelho).....	85
Figura 43 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>Rhodococcus erythropolis</i> em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (azul) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L ⁻¹ de Cu ⁺⁺ (vermelho).	85
Figura 44 - Cinética de crescimento celular de <i>Enterobacter cloacae</i> em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (azul) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L ⁻¹ de Cu ⁺⁺ (vermelho).....	86
Figura 45 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de <i>Enterobacter cloacae</i> em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (vermelho) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L ⁻¹ de Cu ⁺⁺ (azul).....	86
Figura 46 - Dados de remoção de cobre no processo de bioacumulação para <i>Rhodococcus erythropolis</i>	87
Figura 47 - Dados de remoção de cobre no processo de bioacumulação para <i>Enterobacter cloacae</i>	87
Figura 48 - Dados de porcentagem de remoção de Cu ⁺⁺ de <i>R.erythropolis</i> , em ensaio sem controle de pH, onde [Cu ⁺⁺] = 100 mg.L-1, [biomassa] = 1,0 g.L ⁻¹ e valores de pH = 4, 5 e 6. .	90
Figura 49- Dados de porcentagem de remoção de Cu ⁺⁺ de <i>R. erythropolis</i> , em ensaio com controle de pH, onde [Cu ⁺⁺] = 100 mg.L ⁻¹ , [biomassa] = 1,0 g.L ⁻¹ e valores de pH = 4, 5 e 6. .	90
Figura 50 - Dados de porcentagem de remoção de Cu ⁺⁺ de <i>E. cloacae</i> , em ensaio sem controle de pH, onde [Cu ⁺⁺] = 100 mg.L ⁻¹ , [biomassa] = 1,0 g.L ⁻¹ e valores de pH = 4, 5 e 6. .	91
Figura 51 - Dados de porcentagem de remoção de Cu ⁺⁺ de <i>E. cloacae</i> , em ensaio com controle de pH, onde [Cu ⁺⁺] = 100 mg.L ⁻¹ , [biomassa] = 1,0 g.L ⁻¹ e valores de pH = 4, 5 e 6. .	91
Figura 52 - Ensaio de biossorção de Cu ⁺⁺ de <i>R. erythropolis</i> e <i>E. cloacae</i> comparados com ensaio controle a pH 5.....	92

Figura 53 - Ensaio de bioissorção de Cu^{++} de <i>R. erythropolis</i> e <i>E. cloacae</i> comparados com ensaio controle a pH 6.....	92
Figura 54 - Solução aquosa de 100 mg.L^{-1} de Cu^{++} a pH 6 sem indícios visuais de precipitação.	93
Figura 55 - Dados comparativos de % remoção de Cu^{++} entre ensaios de pH controlado e não controlado de <i>R. erythropolis</i> . ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6.)	93
Figura 56 - Dados comparativos de % remoção de Cu^{++} entre ensaios de pH controlado e não controlado de <i>E. cloacae</i> ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6).....	94
Figura 57 - Efeito da concentração de biomassa na bioissorção de cobre ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. pH 6. $t_{\text{contato}} = 120$ minutos).....	95
Figura 58 - Efeito do tratamento da biomassa de <i>R. erythropolis</i> na bioissorção de cobre ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - biomassa viável).....	96
Figura 59 - Efeito do tratamento da biomassa de <i>R. erythropolis</i> na bioissorção de cobre ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - biomassa inviável)	96
Figura 60 - Diferença visual entre as biomassas (0,5 g) de <i>R. erythropolis</i> : i) inviável e ii) viável.....	97
Figura 61 - Efeito do tratamento da biomassa de <i>E. cloacae</i> na bioissorção de cobre ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - Biomassa viável)	97
Figura 62 - Efeito do tratamento da biomassa de <i>E. cloacae</i> na bioissorção de cobre ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - biomassa inviável)	98
Figura 63 - Diferença visual entre as biomassas (0,5 g) de <i>E. cloacae</i> : i) inviável e ii) viável..	98
Figura 64 - Interação biomassa-meio acrescido com cobre. i) biomassa viável. ii) biomassa inviável.....	100
Figura 65 - Capacidade de bioissorção da biomassa de <i>R. erythropolis</i> inviável (autoclavada) e viável (não autoclavada), nos valores de pH 4, 5 e 6 ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$).	101
Figura 66 - Capacidade de bioissorção da biomassa de <i>E. cloacae</i> inviável (autoclavada) e viável (não autoclavada), nos valores de pH 4, 5 e 6 ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$).	101

Figura 67 - Dados de q_e e % remoção de Cu^{++} para <i>R. erythropolis</i> correspondentes para a variação de concentração metálica. ([biomassa] = 0,1 g.L ⁻¹ . 28°C. 150 rpm).....	102
Figura 68 - Dados de q_e e % remoção de Cu^{++} para <i>E. cloacae</i> correspondentes para a variação de concentração metálica. ([biomassa] = 0,1 g.L ⁻¹ . 28°C. 150 rpm).....	102
Figura 69 - Dados de bioissorção de <i>R. erythropolis</i> aplicados ao modelo de Langmuir linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L ⁻¹ . pH controlado. 28°C e 150 rpm.	104
Figura 70 - Dados de bioissorção de <i>R. erythropolis</i> aplicados ao modelo de Freundlich linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L ⁻¹ . pH controlado. 28°C e 150 rpm.	104
Figura 71 - Dados de bioissorção de <i>E. cloacae</i> aplicados ao modelo de Langmuir linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L ⁻¹ . pH controlado. 28°C e 150 rpm.....	104
Figura 72 - Dados de bioissorção de <i>E. cloacae</i> aplicados ao modelo de Freundlich linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L ⁻¹ . pH controlado. 28°C e 150 rpm.....	105
Figura 73 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para <i>R. erythropolis</i> a pH 5.....	106
Figura 74 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para <i>R. erythropolis</i> a pH 6.....	106
Figura 75 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para <i>E. cloacae</i> a pH 5.	106
Figura 76 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para <i>E. cloacae</i> a pH 6.	107
Figura 77 - Isotermas experimentais obtidas para <i>Rhodococcus erythropolis</i> em pH 5 e 6. .	107
Figura 78 - Isotermas experimentais obtidas para <i>Enterobacter cloacae</i> em pH 5 e 6.	108

LISTA TABELAS

Tabela 1 - Valores de concentração máxima permitida de alguns metais, segundo resolução CONAMA, 2011.....	23
Tabela 2 - Dados da literatura para biossorção de cobre.	41
Tabela 3 - Principais diferenças entre os processos independentes do metabolismo e os processos dependentes do metabolismo.	47
Tabela 4 - Principais vantagens e desvantagens dos métodos convencionais mais utilizados.	48
Tabela 5 - Variáveis estudadas no processo de otimização de cultivo bacteriano.	57
Tabela 6 - Matriz de planejamento para ensaios de otimização de cultivo.....	58
Tabela 7 - Resultados de identificação realizada por MALDI-TOF para os micro-organismos encontrados nas coletas realizadas <i>in situ</i>	66
Tabela 8 - Dados de sequências obtidas na amplificação do gene 16S.	69
Tabela 9 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) nas diferentes condições para <i>Rhodococcus erythropolis</i>	80
Tabela 10 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) nas diferentes condições para <i>Enterobacter cloacae</i>	80
Tabela 11 - Resultados obtidos para todos os ensaios de otimização de cultivo de <i>Rhodococcus erythropolis</i>	84
Tabela 12 - Resultados obtidos para todos os ensaios de otimização de cultivo de <i>Enterobacter cloacae</i>	84
Tabela 13 - Dados de bioacumulação metálica por células vivas	88
Tabela 14 - Dados das constantes das isotermas dos modelos de Langmuir e Freundlich e o coeficiente de regressão linear nas condições estudadas, para <i>R. erythropolis</i> e <i>E.cloacae</i> .105	
Tabela 15 – Tabela comparativa entre os valores encontrados na literatura para captação de Cu^{++} e o presente trabalho	109

SUMÁRIO

1.	Revisão Bibliográfica.....	20
1.1	Introdução.....	20
1.2	Disponibilidade metálica em corpos de água	23
1.3	O Cobre, seu processo de obtenção e a questão ambiental e toxicológica.....	25
1.4	Local de estudo: A Mina Sossego.....	27
1.5	Biotecnologia aplicada ao tratamento de ambientes contaminados por metais	28
1.6	Utilização da microbiota nativa	30
1.7	Técnicas de identificação dos micro-organismos	31
1.7.1	Espectrometria de massas - MALDI TOF - Biotyper.....	31
1.7.2	Amplificação de gene 16S.....	32
1.8	Principais interações entre micro-organismos e os metais: mecanismos dependentes do metabolismo e mecanismos independentes do metabolismo.....	33
1.8.1	Dependentes do metabolismo	34
1.8.1.1	Bioacumulação.....	35
1.8.1.2	Complexação.....	35
1.8.1.3	Bioprecipitação	36
1.8.1.4	Sideróforos.....	37
1.8.1.5	Oxirredução (processos redox).....	37
1.8.1.6	Biometilação	37
1.8.1.7	Metalotioneínas.....	38
1.8.1.8	Biolixiviação	38
1.8.2	Independentes do metabolismo	39
1.8.2.1	Biossorção	40
1.9	Isotermas de Adsorção	46
1.10	Mecanismos independentes do metabolismo x dependentes do metabolismo ..	47

1.11	Processos convencionais de descontaminação metálica x Bioprocessos.....	48
1.12	Micro-organismos utilizados neste trabalho	48
2.	Justificativa	49
3.	Objetivo	50
4.	Metodologia	51
4.1	Coleta e Caracterização das amostras <i>in situ</i>	51
4.2	Isolamento dos micro-organismos	51
4.3	Identificação dos micro-organismos.....	53
4.3.1	Espectrometria de Massas – Maldi – TOF – Biotyper	53
4.3.2	Sequenciamento do fragmento 16S.....	54
4.4	Ensaio de resistência	55
4.5	Melhoramento das condições de cultivo para maior obtenção de biomassa	56
4.5.1	Preparação do Inóculo bacteriano	56
4.5.2	Condições experimentais	56
4.6	Ensaio de bioacumulação.....	58
4.6.1	Quantificação da biomassa bacteriana	59
4.6.2	Quantificação da captação metálica	60
4.7	Ensaio de biossorção	60
4.7.1	Preparação da biomassa.....	60
4.7.2	Condições experimentais	61
4.7.2.1	Influência dos valores de pH.....	62
4.7.2.2	Influência da concentração de biomassa	62
4.7.2.3	Influência da concentração metálica.....	62
4.7.2.4	Isotermas de Langmuir e Freundlich	62
4.8	Preparação da solução metálica e quantificação do cobre disponível	63
5.	Resultados e discussão	64

5.1	Coleta e caracterização das amostras	64
5.2	Isolamento e identificação dos micro-organismos.....	65
5.3	Mínima concentração inibitória (MIC).....	70
5.4	Análise de diferentes condições de cultivo para maior obtenção de biomassa	73
5.4.1	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	73
5.4.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	76
5.5	Bioacumulação.....	84
5.6	Ensaio de bioabsorção	89
5.6.1	Influência do pH.....	89
5.6.2	Influência da concentração de biomassa	94
5.6.3	Influência do preparo da biomassa	95
5.6.4	Influência da concentração metálica.....	102
5.7	Isotermas	103
6.	Conclusão.....	111
7.	Referências	112

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Introdução

A história da civilização humana está intimamente ligada com o crescimento da manipulação de recursos hídricos e utilização de água fresca. As primeiras comunidades dependiam da ocorrência de chuvas e os avanços da engenharia vieram com a construção de barragens simples e canais de irrigação que permitiam maior produção e estações de cultivos mais longas. Assim também, com a expansão das áreas urbanas tornou-se necessário o desenvolvimento de tubulações e dutos para levar águas aos usuários, bem como sistemas de remoção de resíduos, alguns dos quais começaram a ser instalados há muitos anos atrás (Crouch, 1993; Landels, 2000).

Durante a revolução industrial e a explosão populacional dos séculos XIX e XX, a demanda por água aumentou muito. A construção de milhares de projetos de engenharia para utilização dirigida das águas, além de proteger fontes limpas de água, fornece água para irrigação ou hidrelétricas, o que trouxe grandes benefícios para milhões de pessoas. Graças aos sistemas de esgoto improvisados, as doenças relacionadas com a água, como cólera e febre tifóide, uma vez endêmicas em todo o mundo, foram em grande parte controladas nas nações mais industrializadas. Grandes cidades sobrevivem com água trazida de centenas e até milhares de quilômetros de distância. A produção de alimentos para satisfazer as necessidades de mais de seis bilhões de pessoas é agora, em grande parte, dependente de sistemas de irrigação artificial. Quase um quinto de toda a eletricidade produzida no mundo é produzida por turbinas hidrelétricas (Landels, 2000).

Nesse contexto, planejadores e gerentes de água estão à beira de uma mudança fundamental no pensamento sobre a água - uma mudança de um foco em novas construções para um foco em avaliar a melhor forma de satisfazer as necessidades e desejos humanos. Estão agora começando a prestar mais atenção ao outro lado da equação - como a sociedade usa a água (Gleick, 2003).

Na questão de legislação ambiental, que vem aumentando seu rigor, a preocupação ambiental vem ao foco. A sociedade então passa a cobrar dos setores públicos e privados por mudanças na forma de manejo e gerenciamento de resíduos, bem como a implantação de programas que visem o desempenho ambiental adequado (Souza, Vargas, Saueressig, & Luchese, 2016). Portanto, o aumento da preocupação com a escassez da água leva ao

aumento de demanda pelo tratamento de águas residuais (Garrido-Baserba, Reif, Hernández, & Poch, 2012).

A redução de volume de efluentes, seguida pelo aproveitamento do efluente tratado são questões fundamentais nos atuais sistemas de gestão ambiental em diversos setores, no sentido de contribuir para redução dos impactos no meio ambiente (Continental, 2011).

A ecoeficiência, considerada como a coerência entre eficiência econômica e ecológica visando a redução de custos empresariais e de impactos ambientais negativos, é uma ferramenta de apoio a tomada de decisões nas organizações (Souza *et al.*, 2016).

A qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido alterada em diferentes escalas nas últimas décadas. Fator este, desencadeado pela complexidade dos usos múltiplos da água pelo homem, os quais acarretam em degradação ambiental significativa e diminuição considerável na disponibilidade de água de qualidade, produzindo inúmeros problemas ao seu aproveitamento. A água pode ter sua qualidade afetada pelas mais diversas atividades do homem, sejam elas domésticas, comerciais ou industriais. Cada uma dessas atividades gera poluentes característicos que têm uma determinada implicação na qualidade do corpo receptor.

Um dos principais problemas da sociedade no século XXI é a poluição ambiental e dentre os principais poluentes estão os metais, a quantidade dos quais aumenta permanentemente no ambiente como o resultado do aumento da atividade industrial e depósitos subterrâneos de metais. Uma vez que os metais tóxicos estão presentes no ambiente, passam por ciclos entre sua forma abiótica e biótica, aumentando a toxicidade no último grupo. Uma vez que é impossível degradar esses poluentes por qualquer meio (Chandrasekhar *et al.*, 2004; Fu & Wang, 2011; Oves, Khan, & Zaidi, 2013), a única maneira de removê-los do meio ambiente é excluí-los de ciclo, com uma possível recuperação e reutilização (Bohumil Volesky, 2003).

Os impactos sobre os recursos hídricos da atividade de mineração está relacionado com a substância mineral a ser beneficiada e além dessas, existem os impactos comuns para todas as atividades de mineração, como por exemplo a construção de barragens, desmatamento e desencadeamento de processos erosivos.

As atividades que o homem exerce atualmente acrescentam ao meio ambiente, através de despejos não controlados, quantidades de metais que se somam às resultantes do intemperismo natural de rochas. Esta crescente contaminação foi ignorada até o trágico

evento de Minamata em 1956, no Japão, onde centenas de pessoas morreram envenenadas com metil-mercúrio e dezenas de mulheres tiveram seus fetos não desenvolvidos adequadamente devido ao descarte inadequado do efluente industrial da fabricação de acetaldeído (Fu & Wang, 2011; Harada, 1995; Oyetibo, Ilori, Obayori, & Amund, 2015). O metal se acumulou nos peixes da região e conseqüentemente chegou à população. A partir daí, pode-se observar um maior interesse na quantificação da contaminação metálica. A maior preocupação com os metais é a bioacumulação destes pela flora e fauna aquática que acaba atingindo o homem, produzindo efeitos subletais e letais, decorrentes de disfunções metabólicas.

Nesse contexto, a presença de íons metálicos em efluentes industriais finais é extremamente indesejável, já que eles são tóxicos para organismos inferiores e superiores. Metais como Cobre, Níquel, Cobalto e Zinco são de sérias preocupações devido ao uso extensivo e níveis crescentes no ambiente, (Brown & Ahsanullah, 1971; B. Volesky, 2001) enquanto que os metais Cádmio, Cromo, Mercúrio, Níquel, Chumbo e também, em menor grau o Cobre, destacam-se por sua toxicidade (Fu & Wang, 2011).

Na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, leis ambientais mais severas no que diz respeito à contaminantes oriundos de descargas industriais foram introduzidas, obrigando as indústrias a desenvolver instalações para minimizar as concentrações de contaminantes em seus próprios efluentes, reduzindo então as concentrações desses contaminantes para limites aceitáveis, antes da sua descarga (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

No Brasil, o limite de concentrações de metais em efluentes foi estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, Ministério do Meio Ambiente), na resolução de número 430 de 2011, a qual complementa a resolução de número 357 de 2005, e alguns estão listados abaixo, na tabela 1.

Essas concentrações visam minimizar os efeitos deletérios causados no meio ambiente exposto por esses contaminantes.

Tabela 1 - Valores de concentração máxima permitida de alguns metais, segundo resolução CONAMA, 2011.

Metal	Concentração máxima (mg.L⁻¹)
Cádmio	0,2
Chumbo	0,5
Cobre	1,0
Cromo hexavalente	0,1
Cromo trivalente	1,0
Mercúrio	0,0
Níquel	2,0
Zinco	5,0

Fonte: Conama, 2011.

Este trabalho versa sobre a problemática causada especificamente por contaminação de cobre, que se encontra na classe de poluentes inorgânicos, como um metal tóxico que representa.

1.2 Disponibilidade metálica em corpos de água

A presença de espécies metálicas em águas naturais exerce um papel determinante na função biológica de muitos organismos. Alguns metais podem apresentar toxicidade elevada para muitas formas de vida, enquanto outros são considerados essenciais, porém, podem ser tóxicos quando presentes em concentrações elevadas (Bruins, Kapil, & Oehme, 2000; Lewinson, Lee, & Rees, 2009). Os efeitos de uma espécie metálica sobre a biota dependem fortemente das formas físicas e químicas do metal no sistema, ou seja, sua especiação (Dumestre, Sauvé, McBride, Baveye, & Berthelin, 1999). Por exemplo, o cromo trivalente é considerado um elemento essencial para o controle do metabolismo da glicose, enquanto que o cromo hexavalente é extremamente tóxico para sistemas biológicos (Kotaś & Stasicka, 2000; Ramirez, Pereira da Silva, Ferreira, & Vasco, 2007). Entretanto, a especiação não se restringe apenas à diferenciação entre estados de oxidação, mas também à distribuição de um elemento entre compostos orgânicos e inorgânicos de forma que possa afetar seu transporte, biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua toxicidade (Templeton *et al.*, 2000). Desta maneira, o conhecimento da especiação de um metal representa o

instrumento que mais subsidia a avaliação da toxicidade destas espécies (Sodré & Grassi, 2005).

A biodisponibilidade dos metais pode ser afetada devido à forte interação com a matéria orgânica dissolvida, que pode, inclusive, alterar sua especiação.

Um estudo de McGeer, Szebedinszky, McDonald, & Wood, 2002 mostrou a redução da biodisponibilidade de cobre devido a complexação do metal com substâncias húmicas, reduzindo a toxicidade para os peixes, a qual está fortemente relacionada com a concentração do íon de cobre livre. A toxicidade do íon de cobre já foi demonstrada há muitos anos nos estudos de Pagenkopf, Russo, & Thurston, 1974 e Sunda, 1975, que a compararam com a toxicidade da concentração de cobre total.

Nesse contexto, o estudo de Sébastien Meylan, Renata Behra, & Sigg, 2003 avaliou o acúmulo de cobre com diferentes especiações por algas, o qual concluiu que há variação na acumulação intracelular de acordo com a especiação do metal.

Portanto, estudos mais recentes vêm evidenciando que a especiação de metais é uma questão da maior relevância uma vez que seu conhecimento pode ter implicações diretas sobre aspectos ecotoxicológicos.

Devido à importância do conhecimento da especiação de metais em águas naturais, os padrões de qualidade de água nos Estados Unidos são baseados, há muitos anos, na fração solúvel do metal, e não em sua concentração total. No Brasil, apenas recentemente os padrões de qualidade de água para corpos receptores, relacionados às espécies metálicas, foram estabelecidos com base na concentração total ou solúvel do metal na água (Conama, 2005). Antes disto, os padrões de qualidade de água eram fundamentados apenas na concentração total do metal (Conama, 1986).

Os metais diferem das outras substâncias potencialmente tóxicas pelo fato de não serem produzidos ou destruídos pelo homem (Chandrasekhar *et al.*, 2004, Fu & Wang, 2011, Oves *et al.*, 2013) e existe um aumento considerável no aporte de espécies metálicas em águas naturais a partir de atividades antrópicas. Todavia, o desenvolvimento e utilização de novas tecnologias estão diminuindo o tempo de permanência natural de metais em suas fontes majoritárias e, conseqüentemente, alterando a distribuição desses elementos no planeta.

1.3 O Cobre, seu processo de obtenção e a questão ambiental e toxicológica

Com o ininterrupto aumento dos setores produtivos, houve por consequência o aumento da necessidade de água nos processos industriais e assim, aumentou também a quantidade e complexidade dos resíduos gerados, que podem conter metais resultantes, por exemplo, de atividades agrícolas e indústrias de mineração (Vegliò, Esposito, & Reverberi, 2003). Dentre esses metais presentes em resíduos, o elemento cobre apresenta grande potencial de contaminação do solo e da água (Andreazza *et al.*, 2010).

O elemento químico cobre é um metal de cor avermelhada, de número atômico 29, peso atômico 63,54 g, dureza 2,5 a 3,0, ponto de fusão 1.023°C, brilho metálico, ótimo condutor de calor e eletricidade, dúctil e maleável. Apresenta elevada resistência à tensão física e à corrosão. Possui propriedade não magnética e é de fácil formação de ligas com outros metais que lhe conferem excelentes propriedades químicas e físicas (DNPM, 2001).

O cobre nativo, que é o cobre em seu estado puro, raramente é encontrado na natureza. Geralmente está associado à outros elementos químicos formando diversos minerais com proporções estequiométricas definidas. Esses minerais podem ser divididos em dois grupos principais: os primários ou sulfetados, que possuem maior teor em cobre e são esses os mais importantes: a calcopirita, a calcocita, a bornita, a covellita e a enargita. e os secundários ou oxidados, que possuem menor teor em cobre e são estes os mais comuns: cuprita, e a tenorita. os carbonatados malaquita, e a azurita e os silicatados crisocola (Aurélio Ramalho Rocio Marcelo Machado da Silva Pedro Sergio Landim de Carvalho José Guilherme da Rocha Cardoso, 1998).

As minas de cobre são classificadas de acordo com o sistema de exploração: minas à céu aberto, as quais cujo mineral se encontra próximo da superfície e minas subterrâneas, aquelas em que o mineral se encontra em profundidade. Ambas necessitam de explosivos para sua extração. Da mina sai o minério contendo de 1% a 2% de cobre. Depois de extraído, britado e moído, o minério passa por células de flotação que separam a sua parte rica em cobre do material inerte, convertendo-o à um concentrado, cujo teor médio de cobre é de 30%. Este concentrado é fundido em um forno onde ocorre a oxidação do ferro e do enxofre, chegando-se a um produto intermediário chamado matte, com 60% de cobre. O matte líquido passa por um conversor e, através de um processo de oxidação (insufla oxigênio para a purificação do metal), é transformado em cobre blister, com 98,5% de cobre, que contém ainda impurezas como resíduos de enxofre, ferro e metais preciosos. O cobre

blister, ainda no estado líquido, passa por processo de refino e, ao seu final, é moldado, chegando ao ânodo com 99,5% de cobre. Após resfriados, os ânodos são colocados em células de eletrólise e são então intercalados por finas chapas de cobre eletrolítico, denominadas chapas de partida. Aplicando-se uma corrente elétrica, o cobre se separa do ânodo e segue através do eletrólito até depositar-se nas placas iniciadoras, constituindo-se o catodo de cobre, com pureza superior a 99,99% (Aurélio Ramalho Rocio Marcelo Machado da Silva Pedro Sergio Landim de Carvalho José Guilherme da Rocha Cardoso, Luiz, Júnior, & Cobre, 1988).

A questão ambiental é um ponto preocupante no processo de extração do cobre, já que a poluição na indústria do cobre pode ser observada em quase toda a cadeia produtiva, sendo que um dos principais impactos da mineração de cobre ocorrem no solo e nas águas superficiais e subterrâneas. No solo, o cobre ataca fortemente a matéria orgânica, impede o crescimento da vegetação e é uma via para a acumulação em animais. Porém, devido as suas características físico-químicas, a contaminação em solos é próxima à fonte, não percorrendo grandes distâncias.

A grande maioria dos íons metálicos são carregados positivamente ocasionando uma forte interação com os grupos funcionais negativamente carregados presentes, por exemplo, em: superfícies celulares, que são geralmente aniônicas a um pH entre 4 e 8; superfícies com hidróxidos residuais (OH^-) ou tiol (SH^-); sais aniônicos, tais como PO_4^- e SO_4^- , e ácidos húmicos e minerais de argila (Roane, Rensing, Pepper, & Maier, 2009). As estruturas celulares por vezes não podem diferenciar a interação entre um íon metálico essencial de um íon metálico deletério, ocasionando a desestabilização de estruturas e biomoléculas (enzimas, DNA e RNA), induzindo a erros de replicação e consequente mutagênese, distúrbios genéticos hereditários e câncer (Aquino, Barbieri, & Oller Nascimento, 2011).

A toxicidade de metais está, portanto, relacionada com a concentração do íon nos organismos. O cobre, por exemplo, é um micronutriente essencial para todos os seres vivos (Avanzi *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2015), mas acima das concentrações fisiológicas necessárias causa sérios danos, desde bloqueio de reações bioquímicas importantes (Pino, 2005; Vullo, 2003) até cânceres em seres humanos.

Para plantas e micro-organismos, altas concentrações de cobre promovem pressão de seleção, sobrevivendo somente os organismos resistentes.

1.4 Local de estudo: A Mina Sossego

A exploração do minério de cobre pela Vale, em Canaã dos Carajás, começou na mina do Sossego, localizada a aproximadamente 70 km de Carajás, descoberta em 1997 e implementada a partir de 2002 (VALE, 2010). A mina, hoje, tem importância estratégica no suporte a outros empreendimentos de cobre na região, como Salobo, Alemão e Cristalino.

O depósito da mina do Sossego compreende os corpos denominados Sossego e Sequeirinho. A Vale começou a operar uma usina de beneficiamento de cobre no local, em abril de 2004, com capacidade instalada de produção de 540 mil toneladas anuais de concentrado, com 30% de cobre e 8 gramas por tonelada de ouro. A usina tem capacidade para processar 41 mil toneladas de minério por dia, o que equivale a 15 milhões de toneladas por ano, lavradas de cavas a céu aberto (Bergerman, Delboni, & Nankran, 2009).

Após o processo de beneficiamento, o minério, que sai da mina com teor médio de 1% de cobre, alcança uma concentração de 30%. A produção é transportada por caminhão até o Armazém de Cobre, em Parauapebas, depois segue pela Estrada de Ferro Carajás até o Terminal Marítimo de São Luís, no Maranhão, onde é embarcado para os mercados interno e externo (HB, 2009).

A mina Sossego (Figura 1) possui uma lagoa de rejeitos com concentrações baixas de resíduos metálicos de cobre, a qual ocasiona um impacto ambiental. Este impacto poderia ser diminuído através de processos de biorremediação, utilizando-se principalmente da microbiota local. Com a aplicação desta tecnologia, parte deste rejeito poderia ser adsorvido e recuperado pela biomassa microbiana.

Figura 1 – Imagens da Mina Sossego, em Canaã dos Carajás.

Fonte: Adaptado de Google Earth.

1.5 Biotecnologia aplicada ao tratamento de ambientes contaminados por metais

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais complexos e frequentes, principalmente devido ao desmedido crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial. Sendo assim, os problemas devido à ação antrópica têm atingido dimensões catastróficas, podendo ser observados por meio de alterações na qualidade do solo, do ar e da água (Kunz & Peralta-Zamora, 2002). As atividades industriais atraíram novos problemas devido à eliminação de rejeitos tóxicos provenientes de subprodutos gerados pelas indústrias. A eliminação desses produtos é, atualmente, um dos mais importantes assuntos em controle de poluição, o que tem levado os pesquisadores a buscarem novas técnicas e ferramentas mais poderosas que visem à remoção desses compostos do ambiente (Ambiental *et al.*, 2012).

Biorremediação é uma ferramenta da biotecnologia, que pode ser definida como o uso de micro-organismos, sejam eles puros ou em consórcio, para remediação de ambientes contaminados, através das suas versatilidades metabólicas.

Cada processo de biorremediação é particular e quase sempre necessita de adequação e otimização específica para a aplicação em diferentes locais afetados, requerendo sempre uma análise integrada de parâmetros físicos, químicos e biológicos.

Nesse sentido, os fatores que poderão influenciar na reposta microbiológica ao processo, serão fatores físicos e químicos, os quais vão compor da matriz do ambiente, como pH, salinidade, potencial redox, fatores extrínsecos (temperatura, umidade) e fatores relacionados ao poluente (estrutura química, presença de outros compostos, biodisponibilidade).

As águas residuais são um problema há muitos anos, sendo seus tratamentos limitados a relação custo-eficácia dos processos físico-químicos mais comuns, como oxidação e redução, precipitação química, filtração, tratamento eletroquímico, evaporação, troca iônica e osmose reversa (El Baz *et al.*, 2015; Khan, Husain, & Hejazi, 2004; Oyetibo *et al.*, 2015; Vijayaraghavan, Palanivelu, & Velan, 2006). Requisitos elevados de reagentes e remoção imprevisível de íons metálicos são algumas outras desvantagens associadas a tais técnicas. Além disso, reagentes fortes e também contaminantes são utilizados para a descontaminação metálica, resultando em lodo tóxico e poluição ambiental secundária.

Rotas biotecnológicas podem ter sucesso nessas áreas e são projetadas para cobrir esses nichos. Os micro-organismos desenvolveram várias maneiras de responder ao estresse ocasionada pelo metal através de processos metabólicos como o transporte através da membrana celular, a bioissorção às paredes celulares e o aprisionamento em cápsulas extracelulares, a precipitação, a complexação e as reações de oxidação-redução. Eles têm comprovada capacidade para absorver metais a partir de soluções aquosas, especialmente quando as concentrações de metais no efluente variam de menos de 1 a cerca de 20 mg.L⁻¹ (Malik, 2004; Wang & Chen, 2009). Outros autores como Gavrilescu, 2004; Lemos, Carlos, & Farias, 2008; B. Volesky, 2001 e Zouboulis, Loukidou, & Matis, 2004 defendem que a técnica é ideal para concentrações de até 100 mg.L⁻¹ de metal.

Vários estudos têm sido conduzidos com o objetivo de melhorar a resistência e / ou a capacidade de os micro-organismos acumularem íons de metais, os quais analisam diversos parâmetros como: pH (Naeem, Woertz, & Fein, 2006), temperatura, diferentes concentrações de metais e biomassa (Kim, Lee, Wilson, & Kim, 2005; Soares, Hebbelinck, & Soares, 2003), a competitividade dos íons de diferentes elementos, tempo de contato entre micro-organismo e metal (Kotrba & Ruml, 2000), composição do meio de cultura (Ghosh, Chaudhuri, Gachhui, Mandal, & Ghosh, 2007), bioaugmentação / bioestimulação (Roane *et al.*, 2009), resistência à toxicidade de metais de bactérias Gram-positivas / Gram-negativas (Samuelson, Wernérus, Svedberg, & Ståhl, 2000), bioacumulação intracelular / extracelular,

células viáveis / não viáveis, células livres / imobilizadas, processos biológicos por micro-organismos aeróbios / anaeróbios (Wang & Chen, 2006; Xu, Liu, & Tay, 2006), dentre outros.

Além disso, a flexibilidade para lidar com a gama de parâmetros físico-químicos nos efluentes e a rentabilidade são algumas vantagens adicionais das técnicas de limpeza biológica de metais. Esses fatores têm promovido ampla pesquisa sobre os métodos biológicos de remoção de metal.

1.6 Utilização da microbiota nativa

Micro-organismos como bactérias, algas, fungos, etc., possuem a capacidade de remover metais do meio ambiente e essa capacidade pode variar muito de acordo com a espécie microbiana ou até mesmo com o tipo de material biológico utilizado, que podem ser diversos como produtos excretados, parede celular, polissacarídeos, etc.

Como existem restrições à introdução de micro-organismos no ambiente, é necessário estabelecer o potencial de biorremediação inerente às espécies nativas de um determinado local. Por isso, faz-se necessário estudar os processos de biodegradação ou biotransformação de compostos de interesse e a biodiversidade das comunidades microbianas responsáveis no meio ambiente ao qual já estão adaptadas.

Segundo Pümpel *et al.*, 2001, o isolamento e a seleção de cepas resistentes aos metais devem ser um aspecto crucial para ultrapassar a principal restrição de utilização de sistemas de células vivas, a resistência microbiana frente ao metal. Espera-se que as células resistentes se liguem a mais metais, o que por sua vez é um pré-requisito para uma melhor bio-precipitação e/ou acumulação intracelular e desenvolvimento de um processo eficiente. Em vez de depender de uma única espécie, uma outra abordagem poderia ser a concepção de um consórcio de cepas com alta capacidade de bioissorção, bioacumulação e bioprecipitação de metais.

Além desses fatores citados, escolher uma biomassa para aplicação em escala industrial, por exemplo, requer preocupação com disponibilidade da cepa e menor custo. Nesse sentido, cepas isoladas do próprio efluente problema estão disponíveis e são de fácil obtenção, além de poderem ser cultivadas mais facilmente na presença do contaminante (B Volesky & Holan, 1995).

Como alternativa eficiente para tratar problemas ambientais, a biorremediação compreende técnicas e processos, como uso e aplicação de micro-organismos, que podem

oferecer soluções práticas em função da alta especificidade, custos reduzidos e uso em larga escala *in situ* e *ex situ*. Para tal aplicação biotecnológica, identificar e explorar o potencial dos micro-organismos frente ao metal se faz necessário.

1.7 Técnicas de identificação dos micro-organismos

1.7.1 Espectrometria de massas - MALDI TOF - Biotyper

A necessidade de novas técnicas de identificação e classificação de micro-organismos vêm crescendo a fim de agilizar os resultados, diminuir custos e obter identificações mais detalhadas do que os métodos convencionais. Como alternativa, surge a espectrometria de massas (EM), uma ferramenta já bastante utilizada nas áreas de física e química, e que vem avançando na área de microbiologia.

A base teórica da EM já foi estabelecida ao longo de um século de estudos (Briffith *et al.*, 2008) e para identificação e classificação de micro-organismos, o que mais se tem utilizado são espectrômetros do tipo MALDI-TOF, representado na Figura 2.

Figura 2 - Espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF

Fonte: highresbio.com

A tradução que mais esclarece a sigla MALDI seria processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, ou seja, a matriz é um ácido orgânico a qual fornece um próton para o processo de ionização da amostra. Ao mesmo tempo, tem a capacidade de absorver a energia emitida por um *laser* (light amplification stimulated energy radiation) e desencadear um processo de dessorção, o qual possibilita a passagem da amostra em estado

sólido para o estado gasoso. Já a sigla TOF (Time of Flight) caracteriza o tempo de voo da amostra ionizada em um tubo de vácuo até que esta atinja o detector. A metodologia em foco baseia-se no perfil de proteínas extraídas da bactéria inteira. No entanto, estudos já mostraram que a maioria das proteínas cujo sinal é detectado é de origem ribossomal mas podem, eventualmente, aparecer proteínas que possivelmente estão presentes em maior abundância (Fenselau*, 2001).

Diversas moléculas estão presentes na amostra e são analisadas pelo espectrômetro de massas, porém a quantidade de proteínas ribossomais é tão maior diante dos outros analitos, que estas acabam mascarando o sinal dos demais analitos. No caso de proteínas ribossomais, a abundância é explicada pelo número de ribossomos. Por exemplo, uma *Escherichia coli* em fase de duplicação pode apresentar cerca de 20.000 ribossomos o que reflete 25% do peso seco dessa bactéria, sendo que 65% do ribossomo é composto por RNA ribossomal e 35% por proteínas. Essas proteínas ribossomais são bastante conservadas geneticamente e tem como função, auxiliar na conformação tridimensional do ribossomo, de forma que este exerça sua função (Uhlik *et al.*, 2011).

1.7.2 Amplificação de gene 16S

Através da amplificação de determinados genes e subsequente análise genética dos fragmentos, podem ser obtidas informações da filogenia e da sistemática microbiana, de uma maneira rápida e eficiente.

Micro-organismos são diferenciados primeiramente de acordo com semelhanças e diferenças em suas características fenotípicas, possibilitando então a classificação em vários reinos, filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies. A invenção da PCR (polimerase chain reaction) e do sequenciamento automatizado do DNA há algumas décadas e o trabalho ininterrupto de sequenciamento do gene 16S rDNA de bactérias, levou à geração de uma grande quantidade de dados de sequências sobre os genes de rDNA da menor subunidade dos ribossomos em um grande número de organismos vivos. A comparação destas sequências mostrou que as sequências de genes de rDNA são altamente conservadas dentro de organismos vivos do mesmo gênero e espécie, mas que diferem entre organismos de outros gêneros e espécies, permitindo a identificação segura a nível de espécie para as bactérias (Woo, Lau, Teng, Tse, & Yuen, 2008).

Utilizando as seqüências de 16S rDNA, muitos gêneros e espécies bacterianos foram reclassificados e renomeados e a classificação de bactérias incultiváveis foi possível. Foram então estabelecidas relações filogenéticas, facilitando a descoberta e classificação de novas espécies bacterianas (Snel, Bork, & Huynen, 1999).

1.8 Principais interações entre micro-organismos e os metais: mecanismos dependentes do metabolismo e mecanismos independentes do metabolismo

A ação dos micro-organismos sobre os metais tem sido objeto de numerosos estudos em virtude do seu potencial de aplicação, tanto para a detoxificação quanto para a recuperação de metais nas atividades da indústria de mineração (Schenberg, 2010).

Na presença de concentrações tóxicas, vários mecanismos de resistência microbiana são ativados, como por exemplo: a produção de peptídeos da família de proteínas ligantes de metais, tais como metalotioneínas (MTs); a regulação da concentração intracelular de metais, com expressão de proteínas transportadoras de complexos ligante-metal do citoplasma para o interior de vacúolos; e efluxo de íons metálicos por canais iônicos presentes na parede celular. Em bactérias, estes mecanismos de tolerância são frequentemente codificados por plasmídeos, o que facilita a sua dispersão de célula para célula (Valls, De Lorenzo, Gonzàlez-Duarte, & Atrian, 2000).

Sendo assim, os micro-organismos desenvolveram mecanismos de tolerância à metais ao longo de suas adaptações, mecanismos esses que são ativados quando o sistema é exposto ao metal, que permitem seu pleno desenvolvimento mesmo na presença de altas concentrações.

Além desses mecanismos desenvolvidos, os micro-organismos conseguem interagir com metal de acordo com as características físico-químicas de suas próprias biomassas, ainda que não sejam células viáveis. A figura 3 apresenta o resumo das interações entre micro-organismos e os metais.

Figura 3 – Principais interações entre micro-organismos e metais.

FONTE: Adaptado de (Geoffrey M. Gadd & White, 1993)

Em resumo, esses mecanismos de interação célula-metal podem ser: dependentes ou independentes do metabolismo.

1.8.1 Dependentes do metabolismo

Segundo Gaur, Flora, Yadav, & Tiwari, 2014, as interações dependentes do metabolismo celular implicam em utilização de células viáveis e que desenvolvam mecanismos vitais de defesa aos metais. Esses mecanismos são precedidos de dois passos, geralmente, que são i) a ligação metabolismo-independente na parede celular e ii) a captura

intracelular do metal, também chamado de bioacumulação. Segundo Chojnacka, 2010, no primeiro contato do metal com o micro-organismo ocorre o fenômeno de bioissorção para então em seguida ocorrer o fenômeno de bioacumulação intracelular, ocasionando o aumento da concentração metálica no interior da célula.

Abaixo, alguns mecanismos de respostas microbiológicas de células vivas frente à exposição metálica.

1.8.1.1 Bioacumulação

A bioacumulação trata-se do processo de transporte de cátions metálicos através da membrana celular, podendo ocasionar em acumulação intracelular e formação de compostos organometálicos, sendo, portanto, este mecanismo dependente do metabolismo ativo e com gasto de energia, em células vivas (Gavrilescu, 2004; Lemos *et al.*, 2008; Bohumil Volesky, 2007).

O transporte de metais através das membranas de células microbianas pode ser mediado pelo mesmo mecanismo utilizado para transportar íons metabolicamente importantes, tais como potássio, magnésio e sódio. Os sistemas de transporte de metais podem tornar-se confusos pela presença de íons de metais com a mesma carga e o mesmo raio iônico associado a íons essenciais (Aquino *et al.*, 2011).

A bioacumulação de metais é usualmente mais lenta que a adsorção passiva, porém, maiores quantidades de metal podem ser acumuladas dentro das células (Geoffrey Michael Gadd, 2009). Os autores até agora citados neste item concordam que, de forma geral, em um primeiro instante há o predomínio da bioissorção (rápida), seguida ou não pelos mecanismos de bioacumulação.

O processo de bioacumulação é complexo e depende de vários fatores (que são bem parecidos com os fatores que influenciam o cultivo de um organismo): a composição do meio de crescimento, o pH, a temperatura, a presença de outros poluentes (que podem ser inibidores do crescimento) ou outros inibidores, agentes tensoativos, etc.

1.8.1.2 Complexação

Esse fenômeno, também chamado de complexação extracelular ou coordenação, resulta de interações eletrostáticas entre íons metálicos e agentes quelantes ou polímeros excretados pelos micro-organismos, estando eles viáveis ou não. Algumas dessas moléculas quelantes podem ser os biosurfactantes, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Esses

agentes quelantes possuem pares de elétrons que ocasionam atrações eletrostáticas e ao interagir com os íons metálicos, não há transferência de elétrons. A estrutura final tem a carga elétrica da soma das cargas individuais dos participantes do complexo (Davis, Volesky, & Mucci, 2003; Veglio' & Beolchini, 1997). Quando este sistema de desintoxicação / complexação está sobrecarregado, ocorre "estresse oxidativo" da célula (Gavrilescu, 2004).

As espécies reativas de oxigênio são uma das principais causas de estresse oxidativo celular, levando a efeitos deletérios (danos na membrana ou outras estruturas lipídicas celulares, modificação de proteínas, fragmentação e reticulações, mudanças no DNA que podem induzir mutações ou ser reparados por mecanismos de reparação). Por conseguinte, os íons de metais causam danos oxidativos, tanto diretamente, através da produção dessas espécies reativas de oxigênio, como indiretamente, inativando o sistema antioxidante celular, conduzindo assim a danos nas células (Liu, Zhang, Huang, & Song, 2005; Mannazzu, Guerra, Ferretti, Pediconi, & Fatichenti, 2000).

A complexação foi o único mecanismo responsável pela acumulação de Cálcio, Magnésio, Cádmio, Zinco, Cobre e Mercúrio por *Pseudomonas syringae*. Os micro-organismos podem também produzir ácidos orgânicos (por exemplo, ácidos cítrico, oxálico, glutônico, fumárico, láctico e málico), que podem quelar metais tóxicos, resultando assim na formação de moléculas metalo-orgânicas. Estes ácidos orgânicos ajudam na solubilização de compostos metálicos e lixiviação de suas superfícies. Os metais também podem ser bioissorvidos ou complexados por grupos carboxilo encontrados em polissacarídeos microbianos e outros polímeros (Aquino *et al.*, 2011).

1.8.1.3 Bioprecipitação

A precipitação pode ser dependente do metabolismo celular ou independente do mesmo. No primeiro caso, a remoção de metal das soluções está frequentemente associada com o sistema de defesa ativo dos microrganismos. Eles reagem na presença desses compostos tóxicos produzindo moléculas que favorecem o processo de precipitação. No caso de precipitação que não é dependente do metabolismo celular, pode ser uma consequência da interação química entre o metal e a superfície celular.

Os precipitados podem ser formados e permanecer em contato com a célula ou até se acumularem no interior das mesmas, ou podem ser independentes da fase sólida da

célula microbiana. O termo precipitação refere-se na maioria dos casos à formação de metal inorgânico insolúvel, o qual precipita no meio.

1.8.1.4 Sideróforos

Alguns tipos de micro-organismos possuem moléculas de baixo peso molecular captadoras de ferro, chamadas sideróforos. Quando estes micro-organismos são cultivados em um meio deficiente em ferro, produzem quelantes específicos de ferro, os chamados sideróforos. Eles desempenham um papel importante na complexação de metais tóxicos e radionuclídeos, aumentando sua solubilidade (Aquino *et al.*, 2011). Os sideróforos têm os compostos do catecolato, fenolato ou hidroxamato como seus grupos de ligação. Muitas bactérias, como *Actinomyces*, *Azotobacter* e as do gênero *Pseudomonas*, sintetizam essas substâncias para capturar os íons de ferro necessários para sua atividade metabólica ou para a bioabsorção (Pattus & Abdallah, 2000).

1.8.1.5 Oxirredução (processos redox)

Os micro-organismos podem mobilizar ou imobilizar íons metálicos, metalóides e compostos organometálicos, promovendo assim processos redox. Somente os procariotos são capazes de oxidar metais como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu , AsO_3^{2-} , Se^0 ou SeO_3^{2-} , ou reduzir Mn^{4+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , AsO_4^{2-} , SeO_4^{2-} ou SeO_3^{2-} , obtendo energia a partir dessas reações (Gavrilescu, 2004). Quando, por exemplo, o íon Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} , ou o íon Mn^{4+} é reduzido a Mn^{2+} , há um aumento na solubilidade destes metais. As espécies microbianas podem ainda imobilizar eficientemente os metais através da sua capacidade de reduzir os seus íons, reduzindo-os a um estado de oxidação mais baixo e dando origem a elementos metálicos (carga zero) menos bioativos (Valls *et al.*, 2000).

1.8.1.6 Biometilação

Micro-organismos podem transformar íons metálicos de uma forma mais tóxica para uma menos tóxica através do mecanismo de biometilação. Os íons de Mercúrio, Arsênio, Cádmio, Selênio, Estrôncio, Telúrio e Chumbo podem ser metilados por uma variedade de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sob condições aeróbicas e/ou anaeróbicas, o que resulta em maior mobilidade e também na sua adequação ao envolvimento em processos que resultam numa diminuição das suas toxicidades. Este mecanismo enzimático envolve uma transferência do grupo metilo (CH_3) para metais e metalóides. Os compostos metilados

formados diferem na sua solubilidade, volatilidade e toxicidade (Geoffrey M. Gadd, 2004; Roane *et al.*, 2009). Por exemplo, o metil e o dimetilmercúrio são mais tóxicos do que os íons inorgânicos de Hg, no entanto, estas são formas intermediárias de processamento para Hg^0 . As formas inorgânicas de As são mais tóxicas do que as espécies metiladas (ácidos, metil-As e dimetil-As), já ambas de Se e Cd são altamente tóxicas (Roane *et al.*, 2009).

1.8.1.7 Metalotioneínas

As metalotioneínas (MTs) são um grupo de estruturas bem preservadas de proteínas que atuam como antioxidantes, e são distribuídas entre todos os organismos vivos. Elas têm baixo peso molecular e são ricas em resíduos de cisteína. A presença de grupos tiol (SH) na estrutura química de cisteínas permite a captura de íons metálicos, tais como Cd^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} . As MTs são compostas por dois domínios separados, o domínio β na região N-terminal e o domínio α na região C-terminal. O domínio β possui nove resíduos de cisteína ligando três íons divalentes, já o domínio α possui onze resíduos de cisteína e liga quatro íons, resultando então a um total de sete íons ligados por molécula de cisteína (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Thirumoorthy, Manisenthil Kumar, Shyam Sundar, Panayappan, & Chatterjee, 2007). As MTs têm várias funções, incluindo a desintoxicação de metais tóxicos e proteção contra a presença de espécies reativas de oxigênio. Assim, MTs são responsáveis pela redução do efeito do estresse oxidativo causado por esses íons, bem como também são responsáveis pela manutenção do balanço homeostático. De acordo com essas características, conclui-se que a síntese dessas proteínas é induzida por metais (Cobbett & Goldsbrough, 2002; Smith, Sumner, & Avery, 2007).

1.8.1.8 Biolixiviação

De forma geral, biolixiviação é um processo que pode ser descrito como a dissolução de metais de recursos minerais pela ação natural de micro-organismos ou a conversão de um metal sólido à sua forma iônica solúvel em água. Existem outros termos que podem ser utilizados como biomineração, bioextração e biorecuperação metálica que também descrevem a mobilização de elementos do material sólido mediado por micro-organismos.

Segundo Rohwerder, Gehrke, Kinzler, & Sand, 2003, durante os últimos 40 anos, processos comerciais que empregam micro-organismos para recuperação de minerais progrediram de lixiviação de rejeito de cobre não controlada para oxidação mineral e

lixiviação em biopilhas projetados para oxidação de minérios de ouro refratários e para recuperação de cobre.

As aplicações comerciais da biohidrometalurgia têm avançado devido à economia de processo favorável e, em alguns casos, reduziram os problemas ambientais em comparação com os processos convencionais de recuperação de metais como a fundição (Rohwerder *et al.*, 2003).

Após a descoberta de que os micro-organismos desempenharam um papel na produção da drenagem ácida de mina, isolou-se e descreveu-se a primeira bactéria acidófila de ferro e de oxidação de enxofre, *T. ferrooxidans*. Não demorou muito para que o papel microbiano na oxidação de minerais sulfúricos fosse investigado a partir de uma perspectiva metalúrgica extrativa.

Os sulfetos de metais, tais como Zinco, Cobre, Níquel, Cobalto são quase insolúveis em água, mas os sulfatos destes metais são facilmente solúveis. Quando o sulfeto de metal é oxidado para se obter seu sulfato, o metal é lixiviado para a solução de onde pode ser extraído. Esta estratégia para a recuperação do metal é conhecido como biolixiviação porque o metal é solubilizado no processo.

1.8.2 Independentes do metabolismo

As interações entre micro-organismos e os metais não dependentes do metabolismo ocorrem através de interações físico-químicas entre os metais e os grupos funcionais presentes na superfície celular. Baseiam-se em adsorção física e troca iônica, fenômenos estes que podem ser realizados com biomassa morta, já que independem do metabolismo ativo (Aquino *et al.*, 2011). Os fenômenos de captação metálica por micro-organismos independentes do metabolismo são frequentemente chamados de bioissorção.

O fenômeno de bioissorção ocorre, principalmente, de acordo com duas interações. Podem ser elas: I) Adsorção física, a qual é um processo em que o íon metálico em soluções se liga a polieletrólitos presentes na parede celular microbiana através de interações eletrostáticas, forças de Van Der Waals, ligação covalente, interação redox e biomineralização para alcançar eletroneutralidade. Este processo é independente do metabolismo, é reversível e muito promissor, pois apresenta muitas vantagens, especialmente para o tratamento de grandes volumes de águas residuais com baixas concentrações de contaminantes (Ahluwalia & Goyal, 2007; Kuroda & Ueda, 2010; Nishitani,

Shimada, Kuroda, & Ueda, 2010). E II) Troca-iônica, já que as paredes celulares de micro-organismos contêm polissacarídeos e os íons metálicos bivalentes trocam com os contra-íons dos polissacarídeos. Por exemplo, os alginatos de algas marinhas (refere-se a uma substância presente na parede celular de algas marinhas pardas do Filo Phaeophyta e na cápsula celular de algumas bactérias, em que desempenha funções primariamente estruturais) ocorrem como sais de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Esses íons podem trocar com CO_2^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+} , resultando na captação biosorptiva de metais (Kratochvil & Volesky, 1998).

Abaixo, o tópico de biossorção descreverá melhor o que pode ocorrer nesse fenômeno e os principais fatores influenciáveis desse processo.

1.8.2.1 Biossorção

A biossorção pode ser definida como um processo onde se utiliza biomassa microbiana na retenção, remoção ou recuperação de *metais* de um ambiente líquido (B. Volesky, 2001). Outra definição mais abrangente pode ser a ligação de metais por materiais biológicos, tais como algas, leveduras, fungos e bactérias (Veglio' & Beolchini, 1997). Pode ser então associada à células mortas ou inviáveis e células vivas, já que trata-se de um processo independente do metabolismo (Malik, 2004).

O processo de biossorção permite que os metais adsorvidos sejam recuperados por tratamento ácido, com agentes quelantes, ou, ainda, por incineração dos micro-organismos. Nesse contexto, bactérias, fungos e leveduras, que constituem rejeitos de fermentações industriais, podem servir como um material barato para esse processo, bem como para a recuperação desses metais (Schenberg, 2010).

Na literatura é possível encontrar trabalhos de biossorção de metais com alguns gêneros bacterianos como *Bacillus* (Iwabuchi, Sunairi, Anzai, Morisaki, & Nakajima, 2003; Tunali, Çabuk, & Akar, 2006a), *Pseudomonas* (Chang, Law, & Chang, 1997; Uslu & Tanyol, 2006), *Streptomyces*, etc. A Tabela 2 apresenta alguns resultados de adsorção de cobre por algumas bactérias reportados na literatura:

Tabela 2 - Dados da literatura para bioadsorção de cobre.

Micro-organismo	Adsorção Cu ⁺² (mg/g biomassa)	Referência
<i>Bacillus sp.</i> (ATS-1)	16,30	Tunali <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus subtilis</i> IAM 1026	20,80	Nakajima <i>et al.</i> , 2003
<i>Cupriavidus metallidurans</i>	38,72	Fan. Okayak. Rodrigues, 2014
<i>Enterobacter aerogenes</i>	25,12	Huang. Chen. Xu, 2005
<i>Pseudomonas putida</i>	6,60	Pardo <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas stutzeri</i> IAM 12097	22,90	Nakajima <i>et al.</i> , 2001
<i>Sphaerotilus natans</i>	5,40	Beolchini <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptomyces coelicolor</i>	66,70	Ozturkel <i>et al.</i> , 2004

FONTE: (Vijayaraghavan & Yun, 2008)

O acúmulo de metais, por mecanismos independentes do metabolismo celular, além de ocorrer por interação com os constituintes da parede celular, pode ocorrer também através de interações com exopolissacarídeos e outros materiais associados à face externa da membrana celular. A parede celular bacteriana proporciona integridade estrutural à célula, mas difere de todos os outros organismos devido à presença de peptidoglicano (poli-N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico), que é localizada imediatamente do lado de fora da membrana citoplasmática. O peptidoglicano é responsável pela rigidez da parede celular bacteriana, e determina a forma da célula. Também é relativamente poroso e considerado como uma barreira de impermeabilidade aos pequenos substratos (Vijayaraghavan & Yun, 2008, Vollmer, Blanot, & De Pedro, 2008).

As paredes celulares das bactérias não são idênticas e a composição da parede da célula é um dos mais importantes fatores na análise e diferenciação de bactérias. Existem dois tipos: Gram-positivas e Gram-negativas (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010.).

Bactérias Gram-positivas possuem parede celular constituída por uma camada espessa de peptidoglicano ligados por pontes de aminoácidos. Embutidos na parede celular de Gram-positivas estão polialcoois, conhecidos como ácidos teicóicos, alguns dos quais são ligantes lipídicos para formar ácidos lipoteicóicos, os quais são responsáveis por ligar o peptidoglicano à membrana citoplasmática. Essas moléculas de peptidoglicanos formam uma espécie de rede que cobre toda a célula como uma grade e representam cerca de 90%

da composição da parede celular da célula Gram-positiva. Os ácidos teicóicos dão carga global negativa à parede celular Gram-positiva, devido à presença de ligações fosfodiéster (Silhavy *et al.*, 2010.).

A parede celular de Gram-negativas possui composição diferente. É muito mais fina e composta por cerca de 10-20% de peptidoglicano (Beveridge & Koval, 1981). No entanto, a parede celular contém uma membrana externa adicional composta por fosfolipídios e lipopolissacarídeos. A natureza altamente carregada dos lipopolissacarídeos confere carga negativa global sobre a parede celular dos micro-organismos Gram-negativos (Silhavy *et al.*, n.d.).

A figura 4 ilustra as principais diferenças na composição das paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

FONTE: (Vijayaraghavan & Yun, 2008)

Em testes bioquímicos, o mecanismo da coloração de Gram se refere à composição da parede celular. Durante o processo de coloração, o tratamento com álcool-acetona extrai os lipídeos, daí resultando em uma porosidade ou permeabilidade aumentada da parede celular das bactérias Gram-negativas.

Assim, o complexo cristal violeta-iodo (CVI) pode ser retirado e as bactérias Gram-negativas são descoradas. A parede celular das bactérias gram-positivas, em virtude de sua

composição diferente, torna-se desidratada durante o tratamento com álcool-acetona, a porosidade diminui, a permeabilidade é reduzida e o complexo CVI não pode ser extraído.

Outra explicação baseia-se também em diferenças de permeabilidade entre os dois grupos de bactérias. Nas Gram-positivas, o complexo CVI é retido na parede após tratamento pelo álcool-acetona, o que causa, provavelmente, uma diminuição do diâmetro dos poros da camada de glicopeptídeo ou peptidoglicano da parede celular. A parede das bactérias Gram-negativas permanece com porosidade suficientemente grande, mesmo depois do tratamento com álcool acetona, possibilitando a extração do complexo CV-I (Pelczar Jr, M. J.. Chan, E. C. S.. Krieg, N. R., 1993).

Em resumo, Sherbert e colaboradores mostraram que os grupos funcionais aniônicos presentes nos peptidoglicanos, ácidos teicóicos e teicurônicos de bactérias Gram-positivas, e o peptidoglicano, fosfolipídios e lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas são os principais componentes responsáveis pelo caráter aniônico e, por consequência, pela capacidade da parede celular captar metais. Como exemplos atuais na literatura, os trabalhos de Amirnia, 2015 e Bueno e colaboradores, 2008a indicaram que os grupos carboxílicos, hidroxílicos e amina presentes na parede celular microbiana foram responsáveis pela ligação e captura de cobre.

Estudos mostram que a captura de cátions metálicos pela massa microbiana decresce muito com o decaimento dos valores de pH, especificamente na faixa de valores de pH entre 1,5 e 4,0, como mostra o gráfico abaixo (figura 5), em um estudo publicado por Kratochvil & Volesky, 1998. Como para valores de pH maiores que 6,0 pode ocorrer a precipitação da maioria dos metais, alguns estudos sugerem que valores altos de pH (>6,0) podem estar associados a fenômenos de acumulação intracelular e mecanismos combinados de sorção-microprecipitação na parede celular.

Figura 5 - Influência do pH no processo de sorção e dessorção de metais.

FONTE: Adaptado de (Kratochvil & Volesky, 1998)

Ensaio de bio-sorção mostram que a captação de metais é influenciada pelo pH do meio e que, de forma geral, valores maiores de pH aumentam o caráter negativo da superfície celular, favorecendo atrações eletroquímicas e então a adsorção de cátions. Nesse sentido, valores mais baixos de pH favorecem adsorção de ânions, já que tendem a tornar o caráter da superfície celular positivo, protonando seus grupos funcionais (VIJAYARAGHAVAN e YUN, 2008).

Grupos amina também são bem conhecidos como sequestradores de íons metálicos e, não somente para íons catiônicos como para aniônicos através de interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. O estudo de Kang, Lee, & Kim, 2007 mostrou que grupos amina protonados a pH 3 atraem íons cromatos negativamente carregados através de interações eletrostáticas.

Sendo assim, reitera-se a influência dos valores de concentração hidrogeniônica em processos de bio-sorção. Sabe-se que além de o pH determinar a especiação dos íons metálicos, bem como sua solubilidade, ele também pode afetar as propriedades da biomassa (Ofomaja & Ho, 2007; Xu *et al.*, 2006), influenciando na carga global da sua superfície. O controle e o estudo dos valores ótimos de pH são muito importantes devido ao fato de que os sítios de ligação da biomassa estão disponíveis para a captura metálica

apenas em estado desprotonado e, dependendo da composição da superfície da biomassa, esse valor de pH pode variar.

A remoção de metais empregando micro-organismos selecionados tem se tornado bastante promissora, já que apresenta como principais vantagens alta seletividade e taxa de remoção, baixo custo, minimização do volume de lama química, tratamento de grandes volumes de efluente e alta eficiência ao tratar efluentes diluídos (Ranjan, Srivastava, Talat, & Hasan, 2009; Schiewer & Balaria, 2009). Seu emprego também apresenta a vantagem da reutilização do biosorvente, possibilitando a reutilização em novas etapas de remoção, após a recuperação do metal captado.

O processo de biossorção envolve uma fase sólida (sorvente, neste caso massa celular) e uma fase líquida (neste caso água) que contém determinada concentração dissolvida de íons a serem adsorvidos, como por exemplo, íons de cobre. Devido à alta afinidade entre o sorvente e estes, essas espécies serão atraídas umas pelas outras por diferentes mecanismos em um processo contínuo até que o equilíbrio seja alcançado.

Segundo Kratochvil & Volesky, 1998, não é simples determinar bons sorventes, uma vez que ao comparar dois sorventes diferentes, eles podem apresentar resultados melhores de acordo com a concentração metálica utilizada, conforme mostra a figura 6, lembrando que a comparação entre dois sorventes só pode ser considerada quando os processos são realizados sob mesmas condições de equilíbrio.

Figura 6 – Comparativo teórico de máxima captação de metal para dois sorventes diferentes.

FONTE: Adaptado de (Kratochvil & Volesky, 1998)

Uma das aplicações dos mecanismos de bioadsorção são os processos de leito fixo, que consiste em capturar os íons metálicos presentes em uma solução por uma biomassa presente em recheios de colunas de processos.

O desempenho geral dos processos baseados no modo de operação leito fixo é julgado pelo tempo de funcionamento da coluna (até que a capacidade de sorção da coluna é esgotada), caracterizado pela concentração de metal determinada na saída da coluna. Uma vez que a coluna de leito fixo é saturada, um arranjo de processo é muitas vezes utilizado pelo qual uma coluna está em operação de sorção ativa enquanto uma outra está sendo preparada (regenerada e limpa) durante o seu período de *stand-by*. Essa preparação da coluna geralmente consiste de eluição do íon sequestrado com simultânea regeneração do sorvente, limpeza e lavagem (B. Volesky, 2001). Uma das variáveis desse processo é a capacidade de regeneração do sorvente, uma vez que ela resulta em uma melhoria na economia de processo.

Para a obtenção de dados de eficiência da bioadsorção, isotermas de adsorção são utilizadas. Os modelos clássicos para esse tipo de estudo são os modelos de Langmuir e Freundlich.

1.9 Isotermas de Adsorção

Para tornar o processo de bioadsorção aplicável e vantajoso industrialmente, é preciso propor uma descrição matemática para o fenômeno.

Para a modelagem de bioadsorção, as equações utilizadas são mais de caráter empírico do que teórico (Chojnacka, 2010), já que esses modelos são baseados em trabalhos de adsorção por carbono ativo.

Embora os dois modelos mais utilizados de isotermas sejam de Langmuir e Freundlich, o modelo de Langmuir ainda é mais utilizado, já que um platô claro pode ser distinguido, indicando que a maioria dos sorventes tem um número finito de sítios de sorção, sendo possível definir a capacidade máxima de bioadsorção do micro-organismo. Nesse sentido, ambas as equações são capazes de fornecer os dados de curvas experimentais.

Isotermas de Langmuir (Langmuir, 1918) utiliza-se de duas constantes muito simples de serem interpretadas, que são q_{max} , que corresponde a maior taxa de captação metálica e, coeficiente b , que relaciona a afinidade entre o sorvente e o metal. Baixos valores de b

indicam alta afinidade, portanto, bons sorventes apresentam altos valores de $q_{\max}$ e baixos valores de coeficiente b (Kratochvil & Volesky, 1998). O modelo de Langmuir considera que todos os locais de adsorção (i) são idênticos, (ii) cada local retém uma molécula do composto dado e (iii) todos os locais são energeticamente e estericamente independentes da quantidade adsorvida (Limousin *et al.*, 2007).

A isoterma de Freundlich (Freundlich, 1906) é a relação conhecida mais antiga que descreve a adsorção não ideal e reversível, não restrita à formação de monocamada. Este modelo empírico pode ser aplicado à adsorção multicamadas, com distribuição não-uniforme sobre a superfície heterogênea. Historicamente, é desenvolvido para a adsorção de carvão animal, demonstrando que a proporção do adsorvato sobre uma dada massa de adsorvente para o soluto não era uma constante em diferentes concentrações de solução (Ahmaruzzaman, 2008). Nesta perspectiva, a quantidade adsorvida é a soma da adsorção em todos os sítios (cada uma tendo uma energia), com os sítios de ligação mais fortes são ocupados primeiro, até que a energia de adsorção seja diminuída exponencialmente após a conclusão do processo de adsorção (Foo & Hameed, 2010).

Ambos os modelos terão suas equações exploradas na sessão de metodologia.

1.10 Mecanismos independentes do metabolismo x dependentes do metabolismo

A Tabela 3 resume as principais diferenças entre os processos biológicos de captação de metais: independentes do metabolismo e dependentes do metabolismo.

Tabela 3 - Principais diferenças entre os processos independentes do metabolismo e os processos dependentes do metabolismo.

Independentes do metabolismo	Dependentes do metabolismo
Processo passivo	Processo ativo
Biomassa morta	Biomassa viva
Metais são ligados na superfície celular	Metais são ligados na superfície e acumulados no meio intracelular
Processo reversível	Processo parcialmente reversível
Não requer nutrientes	Requer nutrientes
Toxicidade é irrelevante	Toxicidade relevante
Interação rápida	Interação lenta

1.11 Processos convencionais de descontaminação metálica x Bioprocessos

Alguns dos processos convencionais estão listados na Tabela 4, a qual apresenta as principais vantagens e desvantagens de cada técnica utilizada.

Tabela 4 - Principais vantagens e desvantagens dos métodos convencionais mais utilizados.

Método	Desvantagens	Vantagens
Precipitação química e filtração	Para altas concentrações; Não efetivo; Geração de lodo.	Simples; Baixo custo
Oxidação e redução química	Utiliza produtos químicos; Sensível ao meio.	Mineralização.
Tratamento eletroquímico	Para altas concentrações; Alto custo.	Recuperação do metal.
Troca iônica	Sensível a particulados; Resinas muito caras.	Efetivo; Efluente puro; Recuperação do metal.
Adsorção	Mais aplicável para orgânicos.	Sorventes convencionais (carvão).
Evaporação	Alta energia; Alto custo; Geração de lodo.	Efluente puro e reciclável.

Em contrapartida estão os bioprocessos discutidos, que apresentam como principais vantagens o baixo custo, a eficiência para baixas concentrações, tecnologia limpa, processos cíclicos e além de tudo o próprio ambiente a ser tratado oferece os micro-organismos mais capacitados para o processo.

1.12 Micro-organismos utilizados neste trabalho

As espécies bacterianas empregadas neste trabalho tiveram procedência do isolamento microbiológico realizado na lagoa de rejeitos em Canaã dos Carajás, Pará.

Portanto, trata-se de espécies não patogênicas, isoladas do meio ambiente, que serão apresentadas resumidamente em resultados e discussão.

2. Justificativa

Uma vez que os metais são um recurso valioso para diferentes aplicações industriais, a sua recuperação e reciclagem assume uma importância ainda maior. Além disso, regulamentações ambientais rigorosas obrigam as indústrias a adotarem métodos de produção mais limpos, exigindo o desenvolvimento de uma técnica de tratamento ambientalmente amigável, de baixo custo e eficiente para efluentes ricos em metais.

Dentro do cenário apresentado, desenvolver e aprofundar tecnologias que permitam a reutilização do metal, reduzindo então a necessidade de exploração de grandes minas se faz importante, bem como a redução da contaminação já existente no meio ambiente.

Portanto, a descoberta e a exploração das interações entre micro-organismos e metais é determinante, bem como a otimização das condições de cultivo celular, o qual influencia diretamente no tratamento e recuperação dos resíduos metálicos presentes no meio, visto a importância do micro-organismo na tomada de um ambiente apropriado para todas as formas de vida.

3. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi o estudo da capacidade de captação de cobre por bactérias isoladas da Mina Sossego e o melhoramento das suas condições de cultivo visando melhores resultados. Para tal, o trabalho teve como objetivos específicos:

- I. Isolamento e identificação de bactérias presentes na Mina Sossego com potencial para biossorção de cobre;
- II. Estabelecimento da Mínima Concentração Inibitória (MIC) destas bactérias na presença de cobre;
- III. Estudo de diferentes condições de cultivo desses micro-organismos;
- IV. Estudo da capacidade de bioacumulação;
- V. Estudo comparativo da capacidade de biossorção de cobre entre células viáveis e inviáveis.

4. Metodologia

4.1 Coleta e Caracterização das amostras *in situ*

Foram coletadas amostras de sedimento e água da lagoa de rejeitos da mina de Sossego, as quais foram acondicionadas em frascos devidamente esterilizados, identificadas e estocadas. Foram realizadas quatro coletas, em diferentes épocas do ano, as quais foram utilizadas para o isolamento de micro-organismos. A localização aproximada da região de coleta do material é mostrada na figura 7.

Figura 7 - Local de coleta das amostras, em Canaã dos Carajás.

FONTE: Google Earth

As amostras coletadas *in situ* foram submetidas à análises utilizando a técnica de espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), de forma a quantificar as concentrações de cobre e outros metais.

Para isto, as amostras foram previamente digeridas em forno micro-ondas da marca CEM, modelo Mars Xpress, antes de serem analisadas no espectrômetro. O procedimento de digestão foi realizado conforme descrito na norma EPA 3015. Na sequência, a amostra foi filtrada com membrana Millipore 0,45 µm e transferida para frasco de análise.

4.2 Isolamento dos micro-organismos

A seleção de micro-organismos com potencial para biossorção de cobre foi realizada através do inóculo de uma amostra de 1g de solo ou 1 mL de efluente em meio “MJS”

adaptado de (Valls *et al.*, 2000), o qual consiste em 12,5 mM HEPES, 50 mM NaCl, 20 mM NH_4Cl , 1 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0,05 mM MnCl_2 , 0,8% casaminoácido, 0,005% tiamina, 0,10% de glicose, 0,50% de glicerol e $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de anfotericina B, à 28°C e 180 rpm.

A avaliação do crescimento celular foi feita após 3 dias (72 h), conforme mostra a figura 8.

Figura 8 - Esquema ilustrando a obtenção de micro-organismos a partir de amostras da Mina Sossego

FONTE: Acervo pessoal

Após observação de crescimento celular, 1 mL deste “pré-inóculo” foi incubado novamente sob mesmas condições e então crescido em meio de cultura sólido para obtenção de colônias puras (figura 9).

Figura 9 - Esquema ilustrando o isolamento seletivo e a obtenção de colônias puras de bactérias.

FONTE: Acervo pessoal

Dentre as linhagens isoladas, duas delas foram utilizadas nos ensaios de resistência e biossorção, os quais envolveram: crescimento celular e quantificação do metal residual no meio de cultivo. Cada amostra de micro-organismo foi estocada utilizando 1 mL do cultivo acrescido de 1 mL de uma solução 60% de glicerol em freezer -80 °C, para análises posteriores.

4.3 Identificação dos micro-organismos

4.3.1 Espectrometria de Massas – Maldi – TOF – Biotyper

As linhagens bacterianas isoladas das amostras ambientais com potencial para biorremediação de efluentes contaminados por cobre foram submetidas à identificação utilizando a técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser por matriz assistida – Espectrômetro de massas MALDI-TOF, modelo Microflex LT, marca Bruker Daltonics.

Para a identificação das bactérias, as amostras foram analisadas de duas maneiras: 1) utilizando colônias crescidas em um período de 24 horas em meio nutriente sólido e, 2) pela extração de proteínas contidas em 1 mL de cultivo retirados no momento de sua fase exponencial de crescimento.

A análise das colônias foi realizada pela coleta das mesmas com o auxílio de um palito esterilizado. Estas colônias foram então aplicadas diretamente na placa do espectrômetro de massas e à elas foi adicionado 1µL de solução matriz, composta por ácido *alfa-ciano-4*-hidroxicinamínico saturado em 2,5 % de ácido trifluoracético 99%, 47,5 % de acetonitrila e 50% de água purificada, conforme mostra a figura 10. Após a secagem da amostra, esta foi submetida à análise, gerando espectros de massas de proteínas que é característico de cada espécie.

Figura 10 - Esquema ilustrativo do preparo de amostras pra identificação por MALDI-TOF utilizando colônias crescidas em placas de meio sólido.

Fonte: (Clark, Kaleta, Arora, & Wolk, 2013)

A extração de proteínas foi realizada de acordo como protocolo de extração fornecido pela Bruker, no qual utiliza-se basicamente de extração por ácido e solvente, conforme passo a passo representado na figura 11.

Figura 11 – Esquema de extração de proteínas para identificação de micro-organismos por MALDI-TOF.

FONTE: Acervo pessoal

4.3.2 Sequenciamento do fragmento 16S

O DNA gênomico das bactérias isoladas foi extraído com kit Illustra bactéria genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8%.

A amplificação do gene de DNAr 16S foi realizada utilizando o volume final de 25 µl contendo iniciadores F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e R1492 (5'-

TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')(0,2uM), trifosfato de desoxirribonucleotideo (0,5mM de cada), tampão de PCR, Taq polimerase (1 U), $MgCl_2$ (1,5mM), molde de DNA (20 ng) e água Milli-Q. A amplificação de DNA foi realizada em um termociclador Eppendorf Master cycler utilizando as seguintes condições: 7 min 94°C 25 ciclos de 30s 94°C. 30s 55°C. 1 min 72°C. final 5 min 72°C e 10°C ∞.

A sequência obtida foi analisada utilizando o banco de dados NCBI.

4.4 Ensaios de resistência

Os ensaios de resistência foram realizados para determinação da MIC (mínima concentração inibitória) para diferentes concentrações de cobre ($CuCl_2$). As concentrações testadas foram de até 400 $mg.L^{-1}$ do íon Cu^{+2} .

Os testes foram realizados em erlenmeyer de 25 mL através de um inóculo bacteriano com absorbância inicial de aproximadamente 0,1 ($\lambda = 600$ nm) em um volume total de ensaio de 10 mL composto por meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Bertani, 1951) suplementado com concentrações de Cu^{++} de 50 $mg.L^{-1}$, 100 $mg.L^{-1}$, 200 $mg.L^{-1}$, 300 $mg.L^{-1}$ e 400 $mg.L^{-1}$. As condições de cultivo foram 28°C, 180 RPM em incubadora de bancada da Infors HT, modelo Multitron pro, conforme mostra o esquema na figura 12.

As medidas de crescimento bacteriano foram realizadas após 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, através da medida de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis da marca Eppendorff, modelo Biophotometer D30, em comprimento de onda (λ) igual a 600 nm.

Figura 12 - Esquema representativo dos ensaios de MIC.

4.5 Melhoramento das condições de cultivo para maior obtenção de biomassa

Os ensaios foram feitos em biorreatores, onde as condições ótimas (maior atividade metabólica dos micro-organismos) foram estudadas. O biorreator utilizado foi um do tipo agitado mecanicamente, que é um dos mais estudados e utilizados industrialmente. A condução do bioprocessos foi batelada simples, onde o meio de cultivo é adicionado e esterilizado junto ao biorreator. Posteriormente foi adicionada então a suspensão celular e o processo transcorreu sem adição nem retirada de meio.

4.5.1 Preparação do Inóculo bacteriano

Para cada cultivo em reator, o inóculo foi realizado através do crescimento de um pré inóculo, partindo de uma cultura pura previamente estocada, em frasco erlenmeyer de 50 mL com 20 mL de meio LB, 180 RPM a 28°C em incubadora com agitação orbital. A cultura foi repicada no momento de fase logarítmica em frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio LB, sob as mesmas condições. Após essa etapa de ativação celular, o inóculo foi realizado no biorreator, com o auxílio de uma seringa estéril, iniciando os ensaios de cinética com absorbâncias iniciais de aproximadamente 0,1.

4.5.2 Condições experimentais

Utilizou-se o biorreator da marca Infors HT, modelo Labfors 5 (Infors, Basel, Suíça) de capacidade volumétrica de 3,6 L (Figura 13). As condições fixas utilizadas foram: Meio de cultura Luria-Bertani (LB); volume de ensaio igual a 1,5 L; temperatura de 28°C; ajuste de pH utilizando soluções de NaOH e HCl, ambas a 10%; e tempo de cultivo para análise dos resultados de até 24 horas, coletando amostras a cada hora até 12h de ensaio e posteriormente no tempo de 24h.

Figura 13 - Biorreator utilizado nos ensaios de otimização das condições de cultivo celular, da marca Infors HT, modelo Labfors 5.

FONTE: Acervo pessoal

As variáveis estudadas no processo de otimização estão representadas pelo planejamento experimental mostrado na tabela 5 abaixo, o qual resultou em 3 níveis (superior (+), central (0) e inferior (-) e 2 fatores (agitação e pH):

Tabela 5 - Variáveis estudadas no processo de otimização de cultivo bacteriano.

		-	0	+
A	Agitação	150	350	550
B	pH	6	7	8

Logo, o planejamento experimental em questão totalizou 9 condições experimentais diferentes. Estas condições experimentais estão representadas na tabela 6:

Tabela 6 - Matriz de planejamento para ensaios de otimização de cultivo.

Ensaio	A (agitação)	B (pH)
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	0
6	0	+1
7	+1	-1
8	+1	0
9	+1	+1

Os cultivos foram realizados até que o valor de absorbância, medido por espectrofotômetro ($\lambda = 600$ nm), indicasse que a fase estacionária do crescimento microbiano havia sido atingida, o que correspondeu a intervalos entre 7 e 24 horas, variando entre os micro-organismos estudados.

As cinéticas de crescimento foram avaliadas de acordo com as taxas de $u_{\text{máx}}$ de crescimento e produção celular.

4.6 Ensaios de bioacumulação

Os ensaios de bioacumulação foram realizados em biorreator da marca Infors HT, modelo Labfors 5 de capacidade volumétrica de 3,6 L. As condições dos ensaios foram: meio de cultura LB suplementado com 100 mg.L^{-1} de cobre (Cu^{++}), volume total de ensaio igual a 1,5 L, agitação de 350 rpm, temperatura de 28°C e pH igual a 7,00 controlado com soluções de NaOH e HCl, ambas a 10%. Ambas as bactérias foram inoculadas para iniciarem o experimento com uma leitura de absorbância a 600 nm correspondente a 0,1. Amostras foram coletadas a cada hora de ensaio durante 12h e em tempo de 24h e analisadas com relação ao crescimento bacteriano, por espectrofotometria, e posteriormente foram filtradas em filtro Millipore $0,22 \mu\text{m}$ para análises de teor de cobre no meio, por espectroscopia de emissão atômica (ICP-OES). Quando necessário, as amostras analisadas no espectrofotômetro foram diluídas para obtenção dos resultados adequados, bem como as amostras analisadas no ICP-OES foram previamente digeridas seguindo protocolo EPA 3015.

A figura 14 ilustra as etapas dos ensaios de bioacumulação.

Figura 14 - Esquema dos ensaios de bioacumulação de cobre.

FONTE: Acervo pessoal

4.6.1 Quantificação da biomassa bacteriana

Para quantificação de biomassa, foram filtrados entre 5 mL e 10 mL de cultivo celular com diferentes medidas de absorbância em membrana Millipore 0,22 μm , utilizando um sistema de filtração à vácuo (figura 15). As membranas foram previamente secas em micro-ondas de uso doméstico durante 5 minutos e ao serem retiradas, foram resfriadas em dessecador por 10 minutos para então serem pesadas em balança analítica. Esse mesmo procedimento de secagem foi realizado após a filtração.

Figura 15 - Sistema de filtração a vácuo para obtenção de curva de massa seca.

FONTE: Adaptado de Google imagens.

A concentração celular foi determinada através da equação 1:

$$C_{\text{cel}} = \frac{m_{\text{final}} - m_{\text{inicial}}}{V_{\text{filtrado}}} \quad [1]$$

onde: C_{cel} é a concentração celular em miligramas por mililitros; m_{final} e m_{inicial} correspondem à massa pesada depois da filtração e antes da filtração, respectivamente, em miligramas; e V_{filtrado} corresponde ao volume filtrado em mililitros.

Foi realizada então uma curva de correlação entre os dados de absorção obtidos em $\lambda = 600 \text{ nm}$ e os dados de massa seca.

4.6.2 Quantificação da captação metálica

A quantificação da captação metálica foi avaliada através da porcentagem de remoção do metal do meio ($R(\%)$) e através do cálculo da capacidade de captação metálica (q_e), dados estes calculados respectivamente de acordo com as equações [2] e [3]:

$$R(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad [2]$$

onde, R é a porcentagem de remoção do metal do meio; C_i é a concentração inicial em (mg.L^{-1}) e C_f é a concentração final em (mg.L^{-1}); e:

$$q_e = \frac{C_i - C_e}{m} \times V \quad [3]$$

onde, q_e é a capacidade de captação metálica ($\text{mg}_{\text{metal}}/\text{g}_{\text{biossorvente}}$); C_i é a concentração metálica inicial (mg.L^{-1}); C_e é a concentração metálica no sistema em equilíbrio (mg.L^{-1}); m é a massa (g) de biossorvente utilizado; V é o volume do ensaio em litros.

4.7 Ensaios de bioadsorção

4.7.1 Preparação da biomassa

A biomassa foi obtida a partir do cultivo em biorreator após a determinação das condições ideais de crescimento, conforme descrito no item 2.5 deste trabalho.

Para tal, o cultivo celular foi centrifugado (centrífuga Hitachi, modelo CR22N), a 10000 g, por 5 minutos. Essa biomassa então foi lavada por 3 vezes, com solução salina ($\text{NaCl } 0,9 \text{ g.L}^{-1}$), e para cada uma dessas lavagens o procedimento de centrifugação foi o mesmo. Após a terceira lavagem, a biomassa foi submetida a: i) ao processo de liofilização, em liofilizador da marca Liotop, modelo L101, e neste caso considerada biomassa viável e ii) ao processo de liofilização seguida de autoclavagem por 20 min a 121°C , e neste caso considerada biomassa inviável.

A biomassa submetida ao processo de autoclavagem foi seca posteriormente em estufa à 105°C, *overnight*, para então ser submetida ao processo de bioissorção. Abaixo, o diagrama ilustrativo das etapas de preparação da biomassa (i e ii) para ensaios de bioissorção (figura 16).

Figura 16 - Diagrama ilustrando as etapas de preparo da biomassa, i - viável e ii - inviável.

FONTE: Acervo pessoal

4.7.2 Condições experimentais

Os ensaios de bioissorção foram realizados em erlenmeyer de 125 mL, em incubadoras de agitação orbital, sob condições fixas de temperatura e agitação, sendo elas 28°C e 150 rpm, respectivamente. O volume de todos os ensaios de bioissorção foi de 50 mL.

Para todos os ensaios de bioissorção, a biomassa foi colocada em contato com o Cu^{++} em soluções aquosas durante um período de 2 horas, ou até o sistema atingir o equilíbrio. Para o controle de pH, foram utilizadas soluções de NaOH e HCl, ambas a 10%.

A eficiência da bioissorção foi avaliada monitorando a concentração do cobre no sobrenadante, através de análises por ICP-OES, nos tempos de 0 min, 1 min, 5 min, 20 min, 60 min, 90 min e 120 min. A figura 17 ilustra as etapas dos ensaios de bioissorção.

Figura 17 - Etapas dos ensaios de biossorção

FONTE: Acervo pessoal

A eficiência do processo de biossorção foi avaliada sob a influência dos seguintes parâmetros: pH, concentração de biomassa e concentração metálica.

4.7.2.1 Influência dos valores de pH

Os ensaios para determinação da influência dos valores de pH foram realizados com concentrações de 100 mg.L^{-1} de Cu^{++} (CuCl_2) e 1 g.L^{-1} de biomassa. Foram realizados: i) ensaios sem controle de pH durante todo o processo e, ii) ensaios com controle de pH durante todo o processo. Os valores de pH avaliados foram 4,0, 5,0 e $6,0 \pm 0,15$.

4.7.2.2 Influência da concentração de biomassa

Os ensaios para avaliação da influência da concentração da biomassa no processo de biossorção foram realizados com concentrações de 100 mg.L^{-1} de Cu^{++} e concentrações de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. O pH utilizado nos ensaios foi o pH 6.

4.7.2.3 Influência da concentração metálica

Os ensaios para avaliação da influência da concentração metálica no processo de biossorção foram realizados com concentrações de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa e concentrações de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$, 10 mg.L^{-1} , 50 mg.L^{-1} , 100 mg.L^{-1} , 200 mg.L^{-1} e 300 mg.L^{-1} . Os valores de pH utilizados nos ensaios foram de 5,0 e 6,0.

4.7.2.4 Isotermas e Langmuir e Freundlich

O capacidade de adsorção metálica da biomassa bacteriana foi avaliada através de isotermas de adsorção. O gráfico obtido para essa avaliação correlaciona os valores de

concentração metálica residual e o peso de bioissorvente utilizado. Os modelos mais utilizados e reportados na literatura são os modelos de Langmuir e Freundlich.

O modelo de Freundlich correlaciona a capacidade de captação metálica q_e (em mg.g^{-1}) da biomassa e a concentração residual de metal C_e (mg.L^{-1}) no meio através da equação geral de Freundlich apresentada na equação 4:

$$q_e = k_f C_e^{1/n} \quad [4]$$

E sua forma linearizada, na equação 5

$$\log q_e = \log k_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad [5]$$

Onde $\log k_f$ é a medida da capacidade do bioissorvente e $1/n$ é a intensidade de adsorção.

A equação geral de Langmuir pode ser apresentada pela equação 6:

$$q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad [6]$$

E a sua forma linearizada utilizada, na equação 7

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_{\max} b} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad [7]$$

Onde q_e é a captação metálica no equilíbrio (mg.g^{-1}), C_e é a concentração do metal no equilíbrio (mg.L^{-1}), e $q_{\max}$ (mg.g^{-1}) e b (L/mg) são constantes de Langmuir relacionadas com a capacidade de adsorção e afinidade, respectivamente.

4.8 Preparação da solução metálica e quantificação do cobre disponível

Todas as soluções metálicas utilizadas e todas as soluções suplementadas com cobre foram preparadas a partir de uma solução estoque de cloreto de cobre de concentração igual a 10 g.L^{-1} . Essa solução foi preparada e teve seu valor de pH acertado para 3,00 para evitar possíveis micro-precipitações de cobre em outras formas.

As concentrações de cobre foram monitoradas por espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Para tal, foi realizada uma curva específica de calibração do equipamento a cada experimento analisado, na mesma matriz da amostra, assegurando que as concentrações trabalhadas estavam dentro dos valores de calibração. A preparação da amostra (digestão) foi realizada conforme protocolo da norma EPA 3015.

A quantificação da captação metálica foi realizada de acordo com o item 4.6.2.

5. Resultados e discussão

5.1 Coleta e caracterização das amostras

As amostras foram coletadas pelo grupo de pesquisa responsável, ao longo de toda a mina, seguindo critérios estabelecidos pelo grupo. A figura 18 representa a imagem de satélite no Google Earth e indica a localização exata de cada amostra coletada.

Figura 18 - Localização exata das coletas de amostras da Mina Sossego, segundo coordenadas de GPS.

FONTE: Google Earth

Foram analisadas um total de 58 amostras com relação a composição dos metais presentes. Além de cobre, os metais encontrados nas amostras sólidas foram: Arsênio (até 35 mg.kg^{-1}), Cromo (até 3 mg.kg^{-1}), Ferro (até 1400 mg.kg^{-1}), Manganês (até 15 mg.kg^{-1}), Níquel (até 10 mg.kg^{-1}), Chumbo (até 1 mg.kg^{-1}) e Zinco (até 5 mg.kg^{-1}). Para amostras líquidas, as maiores concentrações encontradas para esses metais foram: Ferro (até $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$), Manganês (até 1 mg.L^{-1}), Níquel (até $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), Chumbo (até $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$) e Zinco (até $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$). Arsênio e Cromo não foram detectados em amostras líquidas e os outros metais que não foram listados ou não foram analisados, ou não foram detectados.

As concentrações de cobre encontradas nas amostras líquidas da Mina Sossego foram bem inferiores quando comparadas com as concentrações encontradas nas amostras

de sedimento, apresentando concentrações na faixa de 0,40 a 90 mg.L⁻¹ do metal, e variaram de acordo com os valores de pH encontrados, que foram 5 e 7. Já as amostras sólidas apresentaram teor de cobre muito maior, dentro da faixa de 600 e 7000 mg.kg⁻¹.

Os pontos em que o valor de pH da lagoa era 5 apresentaram concentrações de cobre maiores que os pontos em que o valores de pH da lagoa era 7. Segundo estudos de Albrecht, Addai-Mensah, & Fornasiero, 2011, a formação de espécies insolúveis de cobre, como hidróxidos, ocorre em valores de pH a partir de 7, e pode ocorrer, dependendo das concentrações utilizadas, em valores de pH a partir de 5. Isso pode explicar a diferença entre as concentrações de cobre de acordo com os dados de pH das amostras líquidas.

Com relação às concentrações encontradas nas amostras de sedimento, as quais são dezenas de vezes maiores que as concentrações encontradas nas amostras líquidas, na literatura há registros de diversos trabalhos que mostram que o metal pode sofrer grande retenção nos solos por principais 3 maneiras. Podem ser elas: adsorção nas superfícies das partículas minerais, complexação por substâncias húmicas e por precipitação (Yin, Impellitteri, You, & Allen, 2002). Nesse contexto, a disponibilidade do cobre no meio diminui principalmente com o aumento do pH do solo (a partir de 7), o que pode ocasionar depósitos metálicos por formação de hidróxidos, bem como através da complexação do metal com a matéria orgânica disponível nos solos (Bertoncini & Mattiazzo, 1999. Yin *et al.*, 2002).

5.2 Isolamento e identificação dos micro-organismos

A partir das amostras de quatro coletas, realizadas nos anos de 2012 e 2013, foi possível a obtenção de um total de 82 isolados bacterianos que foram previamente separados por morfologia, cor e aspecto da colônia para posteriormente serem submetidos à identificação por MALDI-TOF- Biotyper. A tabela 7 mostra os resultados obtidos:

Tabela 7 - Resultados de identificação realizada por MALDI-TOF para os micro-organismos encontrados nas coletas realizadas *in situ*

Total de isolados		82
Micro-organismo identificado	n° de cepas	Representatividade (%)
<i>Bacillus cereus</i>	9	10,98
<i>Acinetobacter pitii</i>	8	9,76
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	5	6,10
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	12,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36	43,90
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	10	12,20
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4	4,88

Como pode ser observado na Figura 19, os micro-organismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae* foram os mais representativos nas coletas, com valores de 43,90%, 12,20%, 12,20%, respectivamente. *Pseudomonas aeruginosa* foi escolhida como alvo de estudos de outro grupo que participa deste mesmo projeto e, portanto, *Enterobacter cloacae* e *Rhodococcus erythropolis* foram selecionadas para realização de estudos iniciais de resistência e potencial para bio-sorção de cobre, devido suas altas taxas de representatividade.

Figura 19 - Dados de representatividade dos micro-organismos encontrados durante as coletas *in situ*.

Rhodococcus erythropolis pertence ao gênero *Rhodococcus*, que está naturalmente presente em diversas áreas contaminadas. A presença de ácido micólico na parede celular lhes confere caráter hidrofóbico sendo esse gênero muito interessante para biorremediação de áreas contaminadas por compostos orgânicos, além de algumas cepas já apresentarem capacidade de bioacumulação de metais, incluindo os radioativos. Estudos de Kerrar-Djefal *et al.*, 2014, mostram dados de bioissorção de chumbo e mercúrio em concentrações de 10 mg.L⁻¹ com resultados de remoção de 78% e 85% de remoção com *R. erythropolis*.

Enterobacter cloacae também já apresentou potencial para remediação de efluentes contaminados por metais, segundo dados da literatura. Estudos de KUMAR *et al.*, 2011, mostram resultados de bioissorção para *E. cloacae* com cerca de 55% de remoção de Cu⁺⁺, utilizando concentração de 100 mg.L⁻¹ do íon.

Portanto, estudos recentes têm demonstrado o interesse nessa tecnologia alternativa, bem como a confirmação do potencial desses micro-organismos para a remediação da contaminação por metais.

Todos os micro-organismos isolados foram identificados por espectrometria de massas MALDI-Biotyper. Os micro-organismos selecionados para a continuação deste trabalho foram devidamente identificados, com pontuação 2,43 e 2,04, respectivamente, como *Enterobacter cloacae* e *Rhodococcus erythropolis* utilizando placas de cultivo em meio LB sólido, mostradas na figura 20, bem como por extração de proteínas de amostras retiradas diretamente de cultivo líquido. Essas pontuações, segundo o fabricante Bruker-Daltonics, são confiáveis para identificação de espécies.

Figura 20 - Placa de cultivo de *E. cloacae* (à esquerda) e *R. erythropolis* (à direita), em meio LB sólido.

FONTE: Acervo pessoal

A utilização de MALDI-TOF é considerada revolucionária na identificação de micro-organismos, já que a utilização de células intactas para espectrometria de massas produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, adquiridos e mostrados nas figuras 21 (*Enterobacter cloacae*) e 22 (*Rhodococcus erythropolis*). Esses espectros obtidos para cada espécie funcionam como uma impressão digital ("*fingerprinting*"), os quais podem ser comparados aos espectros previamente identificados e depositados em bancos de dados (Claydon, Davey, Edwards-Jones, & Gordon, 1996. Vargha, Takáts, Konopka, & Nakatsu, 2006. Walker, Fox, Edwards-Jones, & Gordon, 2002). Desta forma, diferentes micro-organismos apresentam diferentes espectros de massas e ainda, um mesmo micro-organismo apresenta o mesmo perfil de espectro de massas independente da condição de cultivo (Assis, Juliano, & Juliano, 2011).

Figura 21 - Espectro de proteínas fornecido por MALDI TOF para identificação de *Enterobacter cloacae*.

Figura 22 - Espectro de proteínas fornecido por MALDI TOF para identificação de *Rhodococcus erythropolis*.

Rhodococcus são actinobactérias aeróbias estritas, Gram-positivas, com ciclo de vida alternante entre as formas cocos e bastonetes, algumas vezes mostrando projeções filamentosas (Finnerty, 1998). Não produzem esporos, são imóveis e suas colônias apresentam aspecto mucóide. Podem ser encontradas em solo, rochas, águas subterrâneas, sedimentos marinhos, excreções de animais, intestinos de insetos e em plantas (Bell, Philp, Aw, & Christofi, 1998). Os *Rhodococci* têm ampla diversidade catabólica e capacidades enzimáticas únicas. A sua capacidade para transformar ou degradar uma vasta gama de produtos químicos levanta a potencial utilidade dos *Rhodococci* na biotecnologia ambiental ou industrial (Bell *et al.*, 1998. De Carvalho & Da Fonseca, 2005).

Enterobacter cloacae é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastão pertencente à família Enterobacteriaceae e o seu tamanho pode variar de 0,3-0,6 x 0,8-2,0 µm. Vive em ambiente mesófilo com sua temperatura ideal a 37 °C, estando presente em ambientes terrestres e aquáticos (água, esgoto, solo e alimento). A espécie ocorre como microflora dos tratos intestinais de seres humanos e animais e também é patógeno em plantas e insetos. Esta diversidade de habitats é espelhada pela variedade genética de *E. cloacae* (Mezzatesta, Gona, & Stefani, 2012).

A fim de confirmar a identificação dos micro-organismos, a identificação molecular por amplificação do gene 16S gerou uma sequência com similaridade de 97% para *Enterobacter cloacae* e 99 % para *Rhodococcus erythropolis*, quando comparadas com o banco de dados NCBI, conforme mostra a tabela 8:

Tabela 8 - Dados de sequências obtidas na amplificação do gene 16S.

Micro-organismo	Sequência obtida	Similaridade
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	CATTCGGCTGCTACCATGCACTGAGCGGTAAGGCTTTTCGGCGTCACCACTCCGAACGG GTGAGTAACACGTGCATGATCTGCCCTGCATTCGGGATAAGCCTGGTTAACTGGGTCTAAT ACCGGATATGACCTCCTATCGCATGGTGGGTGGTGGAAAGATTTATCGGTGCAGGATGGGC CCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGCGTACTGGCCTACCGCGCCAGCACGGGTGCCGAT CTGAGAGAGTCAACCCCTATACTGGGACTGAGACAAGGCCACGATACCTACGGGAGGCAG CAGTGGGGAATATTGCAACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGA CGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGA AGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGTCC GGAATTACTGGGCGTAAAGAGTTCTGAGGCGGTTTGTGCGTCGTTTGTGAAAACAGCAG CTCAACTGCTGGCTTGACGGCGATACGGGCGAGACTTGAGTACTCGCAGGGGAGACTGGAAT TCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGGCAGATATCAGGGAGGAACACCGGGTGGGCGAAGGG CGGGTCTTCTGCGGCAGTAACCTGA	99%
<i>Enterobacter cloacae</i>	AAAAACCAGCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTAC TTTCAGCGGGGAGGAGGCGACTGGTTAATAACACAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGA AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGG AATTACTGGGCGTATACTGACGAGGAAAGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGC TCAACCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGAGAGGGGGGTAGAAAT CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCC CTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCC GGTAGAATGCCTAAAAAATGTATAGTCATAGAGGCTTTTTTACAGGCTTAGGCCCCCCC CCCCCCTTTTTTTTTTTTGGTGGG	97%

A técnica de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, fornece identificações de gênero e espécies para os isolados que não se encaixam nos perfis bioquímicos reconhecidos, para as estirpes que geram apenas uma "baixa probabilidade" ou identificação "aceitável" de acordo com os sistemas comerciais, ou para as cepas que são raramente associadas a doenças infecciosas humanas. Os resultados cumulativos de um número

limitado de estudos sugerem que o sequenciamento do gene 16S rRNA fornece a identificação do gênero, na maioria dos casos onde há uma similaridade maior que 90% (Janda & Abbott, 2007), mas no que diz respeito a espécies pode ser confiável em faixas a partir de 97 %.

Há pouco tempo a metodologia por espectrometria de massas era muito mais utilizada na identificação de micro-organismos na área clínica. Porém, nos últimos anos a aplicação voltada para área ambiental tem sido muito explorada e vem trazendo resultados tão seguros quanto às metodologias tradicionais, como a biologia molecular. As comparações dos resultados dessas identificações já estão reportadas na literatura, como por exemplo, no trabalho de Avanzi *et al.*, 2016.

5.3 Mínima concentração inibitória (MIC)

Segundo Andrews & Andrews, 2001, a mínima concentração inibitória é definida como a menor concentração de algum composto/molécula que pode inibir o crescimento do micro-organismo depois de um tempo adequado de incubação. A determinação deste valor se faz importante porque as bactérias são micro-organismos muito versáteis, capazes de se adaptarem a ambientes muito hostis e trocarem informações genéticas entre si através de plasmídeos, ocasionando diferentes resultados de resistência para uma mesma espécie, muitas vezes. Determinar o MIC é importante também para garantir uma margem de trabalho com as concentrações metálicas ideais, de forma a não prejudicar o desempenho do processo.

A figura 23 ilustra o início e o final do ensaio de MIC para *Rhodococcus erythropolis*.

Figura 23 - Ensaio de mínima concentração inibitória de Cu^{++} para *Rhodococcus erythropolis*.

FONTE: Acervo pessoal

A figura 24 representa o gráfico com os dados de crescimento celular de *R. erythropolis* para todas as concentrações ensaiadas, de 0 mg.L^{-1} a 400 mg.L^{-1} de Cu^{++} .

Figura 24 - Dados de MIC de Cu^{++} para *Rhodococcus erythropolis*, após 4 dias de cultivo.

Como podemos observar, *R.erythropolis* se mostrou altamente tolerante para concentrações de até 200 mg.L^{-1} de Cu^{++} . Os resultados mostram que o Cu^{++} não apresentou toxicidade nestas concentrações, quando comparados com o crescimento celular sem adição

de cobre. O recente trabalho de El Baz *et al.*, 2015 apresenta o resultado de tolerância de algumas cepas de actinobactérias isoladas de 4 minas diferentes e para todas elas a mínima concentração inibitória (MIC) alcançada para o cobre foi de 100 mg.L⁻¹. Outro estudo também apresentou dados de MIC com valor máximo de 80 mg.L⁻¹ de cobre, dessa vez para actinobactéria isolada de sedimento contaminado por cobre (Albarracín, Amoroso, & Abate, 2005). Nesse contexto, *R.erythropolis* isolada neste trabalho apresentou maior adaptação e resistência ao metal, quando comparadas com cepas de actinobactérias isoladas de outros ambientes contaminados com cobre.

Por outro lado, *E. cloacae*, mostrou-se ainda mais resistente ao Cu⁺⁺. O crescimento celular ocorreu até concentrações da ordem de 400 mg.L⁻¹. A Figura 25 representa os dados de MIC para *E.cloacae*.

Figura 25 - Dados de MIC de Cu⁺⁺ para *Enterobacter cloacae*, após 4 dias de cultivo.

Segundo Muñoz *et al.*, 2006, as bactérias as quais são continuamente expostas ao metal, tem mecanismos de adaptação para esses e responde a esse stress de diversas maneiras metabólicas. Isso explica porque algumas bactérias de mesmo gênero, e até espécie, podem ter resultados diferentes com relação a MIC. Por exemplo, no seu estudo, Abbas, Rafatullah, Ismail, & Lalung, 2014 apresenta dados de MIC de 450 mg.L⁻¹ de Cádmio para *Enterobacter mori* e 500 mg.L⁻¹ de Cadmio para *Enterobacter sp.*

O estudo de Arredendo & Núñez, 2005 diz que as células procarióticas são mais resistentes e toleram elevadas concentrações de cobre no meio e então, por este motivo, é possível supor que o uso de micro-organismos tolerantes ao cobre e dos genes envolvidos

nesta resistência a altas concentrações possam ser úteis para o estabelecimento de estratégias para a remoção deste metal.

O presente estudo apresentou bons resultados de resistência ao cobre também para *E.cloacae*, o qual apresentou valor de MIC de 500 mg.L⁻¹, sinalizando toxicidade para a concentração de 400 mg.L⁻¹.

Parte do processo de tolerância/resistência do micro-organismo frente ao metal é suportado por síntese de proteínas de baixo peso molecular, metalotioneínas, que são ricas em grupos tiol, ligando-se aos metais na forma que não é biologicamente ativo e, assim, excluindo-os a partir de reações metabólicas. Estas proteínas ligam-se a íons metálicos e são frequentemente sintetizadas como a resposta a presença desses íons no meio de crescimento, sendo induzidas pela presença destes poluentes (Martín-González, Díaz, Borniquel, Gallego, & Gutiérrez, 2006). Este fato explica por que muitos relatórios mostram que bioacumulação por micro-organismos adaptados é mais eficiente do que por não adaptados (Koçberber & Dönmez, 2007), casos reportados por este trabalho.

5.4 Análise de diferentes condições de cultivo para maior obtenção de biomassa

Os ensaios com diferentes condições de cultivo foram planejados e realizados a fim de obter-se o máximo de rendimento em produto, que no caso é a própria massa celular. Por ser um procedimento exaustivo e que envolve um grande número de experimentos, bem como uma grande demanda de tempo, optou-se por uma combinação estatística entre as variáveis estudadas, as quais permitem visualizar a resposta microbiana frente a estas variáveis fundamentais do cultivo, e, com um número relativamente pequeno de experimentos.

Inicialmente são mostrados todos os dados obtidos para ambas as bactérias e então em seguida será feita a discussão após a compilação de todas as observações importantes.

5.4.1 *Rhodococcus erythropolis*

Os primeiros ensaios foram realizados com valor de pH 7, neutro, tendo como variação os valores de agitação. Os ensaios posteriores foram realizados de forma aleatória com a finalidade de não induzir qualquer resistência ao micro-organismo. A seguir seguem as curvas de crescimento obtidas para os diferentes valores de pH, variando o parâmetro de agitação, ilustradas nas figuras 26, 27 e 28.

Figura 26 - Cinética de crescimento de *R. erythropolis*, a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 27 - Cinética de crescimento de *R. erythropolis*, a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 28 - Cinética de crescimento de *R. erythropolis*, a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

A seguir, os gráficos para obtenção dos dados cinéticos ($\mu_{\text{máx}}$) de *R. erythropolis* para essas mesmas condições. Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (velocidade máxima de crescimento) correspondem à máxima inclinação obtida na parte linear da curva de crescimento, como ilustram as figuras 29, 30 e 31.

Figura 29 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *R. erythropolis*, a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 30 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *R. erythropolis*, a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 31 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *R. erythropolis*, a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Os valores mínimos e máximos de absorvância, ou crescimento, alcançados por *R. erythropolis*, no período de 24 horas, correspondem às concentrações celulares de aproximadamente $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,00 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Esses dados de massa foram

obtidos pela correlação de dados entre o peso seco da bactéria e a absorbância correspondente, dados esses que forneceram o gráfico de correlação (figura 32).

Figura 32 - Curva de correlação entre dados de biomassa e dados absorbância a 600 nm de *R. erythropolis*.

A equação linear que representa este gráfico de correlação de dados de *R. erythropolis* foi obtida com um R^2 de 0,9933, mostrando um bom ajuste dos dados.

5.4.2 *Enterobacter cloacae*

Os ensaios de otimização das condições de cultivo de *E. cloacae* forneceram as curvas de crescimento representadas nas figuras 33, 34 e 35, abaixo.

Figura 33 - Cinética de crescimento de *E. cloacae*, a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 34 - Cinética de crescimento de *E. cloacae*, a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 35 - Cinética de crescimento de *E. cloacae*, a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

As figuras 36, 37 e 38 ilustram os gráficos para obtenção dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ dos ensaios realizados para *E. cloacae*.

Figura 36 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *E. cloacae*, a pH 6, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 37 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *E. cloacae*, a pH 7, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Figura 38 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *E. cloacae*, a pH 8, com rotações de 150, 350 e 550 rpm.

Para *E. cloacae*, a menor e a maior concentração celular de biomassa obtida nos ensaios foi de aproximadamente $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, também calculados a partir de uma curva de correlação entre massa celular seca e dados de absorbância (figura 39).

Figura 39 - Curva de correlação entre dados de biomassa e dados absorbância a 600 nm de *E. cloacae*.

A equação linear que representa este gráfico de correlação de dados de *E. cloacae* também apresentou bom ajuste de dados, obtida com um R^2 de 0,9993.

Os dados obtidos nos ensaios foram avaliados principalmente quanto à produção celular e dados de velocidade máxima de crescimento, o $\mu_{\text{máx}}$, o qual reflete diretamente no tempo de geração celular, que também foi avaliado.

Em um cultivo celular, existe um período em que o micro-organismo tem a sua taxa de multiplicação aumentada até chegar a um valor máximo, fase essa conhecida também como fase exponencial de crescimento celular. Nessa fase, os micro-organismos produzem moléculas essenciais para o seu desenvolvimento, estando dentre estas moléculas os aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos (Bastos, 2016).

A habilidade com que os micro-organismos realizam esse processo, reproduzindo-se, pode ser interpretada através da sua velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$). De forma geral, maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ representam velocidades maiores de crescimento, e por consequência, maior adaptação ao meio e habilidade no processo de reprodução. Esse comportamento microbiano também pode ser avaliado pelo tempo de geração, que nada mais é que o tempo necessário para o micro-organismo se duplicar ou reproduzir.

As tabelas 9 e 10 apresentam os valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos nos ensaios para *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente.

Tabela 9 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) nas diferentes condições para *Rhodococcus erythropolis*.

<i>Rhodococcus erythropolis</i>			
	150 rpm	350 rpm	550 rpm
pH 6	0,1103	0,3021	0,3045
pH 7	0,1450	0,3934	0,3342
pH 8	0,1966	0,3742	0,3379

Tabela 10 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}) nas diferentes condições para *Enterobacter cloacae*.

<i>Enterobacter cloacae</i>			
	150 rpm	350 rpm	550 rpm
pH 6	0,6803	1,0285	0,9376
pH 7	0,9975	0,9995	0,9393
pH 8	1,0584	0,6236	0,7870

O valor do pH do meio de cultura é parâmetro de fundamental importância e também deve ser estudado, de forma a proporcionar um bom crescimento celular e elevados rendimentos em produto. Estudos devem ser conduzidos previamente a fim de se eleger as condições ótimas para a catálise enzimática.

Os dados de $\mu_{\text{máx}}$ mostram que *E. cloacae* é um micro-organismo mais adaptado do que *R. erythropolis*, às condições propostas. O menor valor de velocidade de crescimento apresentado por *E. cloacae* foi $0,6236 \text{ h}^{-1}$, nas condições de pH 8 e 350 rpm, contra $0,1103 \text{ h}^{-1}$, nas condições de pH 6 e 150 rpm, para *R. erythropolis*. Já os maiores valores de velocidade de crescimento para *E. cloacae* foram de 1,0584 e 1,0285, nas condições de pH 8 e 150 rpm e pH 6 e 350 rpm, respectivamente. Observou-se também que em pH 7, *E. cloacae* apresentou valores de velocidade máxima de crescimento constantes (na média de $0,9887 \text{ h}^{-1}$) para todos os valores de agitação, sugerindo assim, ser um valor de pH ótimo de trabalho, o ideal para a bactéria.

Já o maior valor de velocidade máxima de crescimento apresentado por *R. erythropolis* foi de 0,3934, na condição de pH 7 e 350 rpm de agitação, notando que, para todos os valores de pH nas duas maiores rotações não houve mudança importante nos dados de $\mu_{\text{máx}}$, demonstrando o mesmo desempenho fisiológico das bactérias para essas condições.

Outra observação importante foi que *R. erythropolis* apresentou uma fase lag de aproximadamente 5 horas para todos os ensaios, exceto para os ensaios de rotação de 150 rpm. A fase lag corresponde a uma fase de adaptação do micro-organismo à composição do meio, bem como às condições de cultivo propostas. *E. cloacae* apresentou fase lag apenas no ensaio de pH 8 e 550 rpm de agitação, no qual necessitou de maior adaptação metabólica.

Uma das consequências dessa fase lag de *R. erythropolis* foi o tempo total de cultivo, até chegar na fase estacionária de crescimento. Os ensaios de otimização de cultivo de *Rhodococcus erythropolis* duraram 24 horas, e foram analisados a cada hora durante 12 horas, para obtenção dos dados cinéticos, os quais são coletados em fase exponencial de crescimento. Já para *E. cloacae*, os ensaios tiveram duração de 8 horas, no máximo.

As figuras 40 e 41 compilam os dados obtidos nos ensaios obtidos nas variações das condições de rotação e pH, para ambas as bactérias, ilustrando a diferença de resposta no crescimento celular de *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae*, respectivamente.

Figura 40 - Comparativo entre os dados de produção celular de *R. erythropolis* para as variações de rotação (150, 350 e 550 rpm) e pH (6, 7 e 8).

Figura 41 - Comparativo entre os dados de produção celular de *E. cloacae* para as variações de rotação (150, 350 e 550 rpm) e pH (6, 7 e 8).

Como é possível observar, a rotação de 150 rpm não favoreceu o crescimento celular de ambas as bactérias. Para ambas também, o melhor pH de trabalho foi o pH 7, que para *Rhodococcus erythropolis* apresentou uma diferença significativa no rendimento celular quando comparado com outros valores, na melhor condição de agitação, que foi 350 rpm.

E. cloacae não apresentou diferenças significativas nos rendimentos celulares para os diferentes valores de pH. Apenas os valores de agitação influenciaram na produção celular de *E. cloacae*.

O pH tem influência na atividade enzimática, interferindo na estabilidade de grupos ionizáveis de enzimas, seus sítios ativos e na conformação tridimensional das moléculas. O fornecimento do pH adequado permite que as enzimas fiquem em suas formas químicas adequadas permitindo portanto uma maior atividade (Bastos, 2016). Em geral, enzimas são ativas em uma faixa limitada de pH e na grande maioria dos casos existe um valor ótimo, porém, o efeito do pH na atividade enzimática é geralmente analisado experimentalmente, como foi feito neste trabalho.

Para ambas as bactérias, não se justifica o uso da agitação de 550 rpm, já que para *R. erythropolis* houve uma ligeira queda no rendimento celular e para *E. cloacae* o rendimento não foi significativamente maior. O uso da agitação de 550 rpm então, nestes casos, apenas acrescentaria custos ao processo, já que demandam grande aporte de energia para a agitação mecânica.

O objetivo principal de um sistema de agitação é fazer com que o oxigênio da fase gasosa passe para a fase líquida, chegando assim nas células em suspensão. A importância bioquímica do oxigênio é vital, uma vez que ele é o aceptor final de elétrons da cadeia

respiratória, principal gerador de energia celular das células aeróbias, permitindo o armazenamento de energia pela formação de moléculas de ATP, além de reoxidar coenzimas importantíssimas para o funcionamento do metabolismo celular (Bastos, 2016).

Os processos aerados são aqueles que acontecem com absorção de oxigênio livre, podendo ser realizados com aeração natural ou forçada. Este trabalho desenvolveu o processo aerado da primeira modalidade, onde o oxigênio necessário ao cultivo provém do ar ambiente.

Ainda que os resultados da otimização apenas dos parâmetros de pH e agitação tenham surtido grande diferença nos rendimentos celulares, o oxigênio é pouco solúvel em água, sendo o valor da sua concentração de saturação da ordem de alguns miligramas por litro. Em virtude disto, é muito difícil fornecer de uma só vez todo o oxigênio necessário a uma cultura em desenvolvimento, sendo ideal o aporte do mesmo ao sistema.

De acordo com Bastos, 2016, a primeira mudança de escala que um bioprocessamento experimental é quando se passa da etapa de investigação em frascos agitados a uma que envolve biorreatores pequenos de laboratório. As condições estabelecidas em frascos agitados são, em geral, de difícil reprodução em escalas maiores.

Nesse contexto, observa-se que a agitação de 350 rpm é o suficiente para a transferência do oxigênio vindo da aeração natural do processo, atingindo o seu nível máximo de solubilidade do meio. Agitação de 550 rpm não é capaz de melhorar essa transferência e no caso de *R. erythropolis*, pode ainda ter dificultado a assimilação do oxigênio pelo micro-organismo.

Neste trabalho, a otimização apenas dos parâmetros de agitação e pH foi suficiente para aumentar o rendimento celular de *Rhodococcus erythropolis* em aproximadamente 7 vezes e o rendimento celular de *Enterobacter cloacae* em aproximadamente 1,7 vez, entre as melhores e piores condições.

A otimização de cultivo visando à produção de biomassa para aplicações ambientais vêm crescendo, já que a biotecnologia aplicada à recuperação de áreas degradadas vem ganhando força como tecnologia alternativa aos processos convencionais. Alguns estudos de otimização do cultivo de *R. erythropolis* e *E. cloacae* já estão reportados na literatura. O trabalho de De Carvalho, 2012 apresenta parâmetros ótimos para crescimento de *R. erythropolis* em condições extremas e Gier *et al.*, 2014, apresenta um estudo de otimização das condições de cultivo analisando a composição do meio de cultura, temperatura e

agitação. Já o trabalho de Al-jumaily & Al-, 2012 apresentou aumento de rendimento celular de *Enterobacter cloacae* de 1,7 vezes quando analisadas a composição do meio de cultura e as velocidades de agitação de 150 rpm, 200 rpm e 250, sendo a de 250 rpm a melhor entre elas.

As tabelas 11 e 12 apresentam os valores de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e produção celular (P) para *Rhodococcus erythropolis* e *Enterobacter cloacae*, respectivamente.

Tabela 11 - Resultados obtidos para todos os ensaios de otimização de cultivo de *Rhodococcus erythropolis*.

	A (Agit)	B (pH)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	P (g.L ⁻¹)
1	-1 (150 rpm)	-1 (6,00)	0,1103	0,15
2	-1 (150 rpm)	0 (7,00)	0,1450	0,14
3	-1 (150 rpm)	+1 (8,00)	0,1966	0,16
4	0 (350 rpm)	-1 (6,00)	0,3021	0,54
5	0 (350 rpm)	0 (7,00)	0,3934	1,00
6	0 (350 rpm)	+1 (8,00)	0,3742	0,55
7	+1 (550 rpm)	-1 (6,00)	0,3045	0,56
8	+1 (550 rpm)	0 (7,00)	0,3342	0,71
9	+1 (550 rpm)	+1 (8,00)	0,3379	0,41

Tabela 12 - Resultados obtidos para todos os ensaios de otimização de cultivo de *Enterobacter cloacae*.

	A (Agit)	B (pH)	$\mu_{\text{máx}}$	P (g.L ⁻¹)
1	-1 (150 rpm)	-1 (6,00)	0,6803	1,62
2	-1 (150 rpm)	0 (7,00)	0,9975	1,62
3	-1 (150 rpm)	+1 (8,00)	1,0584	1,74
4	0 (350 rpm)	-1 (6,00)	1,0285	2,41
5	0 (350 rpm)	0 (7,00)	0,9995	2,50
6	0 (350 rpm)	+1 (8,00)	0,6236	2,30
7	+1 (550 rpm)	-1 (6,00)	0,9376	2,62
8	+1 (550 rpm)	0 (7,00)	0,9393	2,74
9	+1 (550 rpm)	+1 (8,00)	0,7870	2,50

5.5 Bioacumulação

O fenômeno de bioacumulação é caracterizado por dependência do metabolismo celular, portanto em células vivas. Os ensaios de bioacumulação foram realizados sob as

melhores condições de crescimento de ambas as bactérias, determinadas com os resultados anteriores de melhoramento das condições de crescimento e produção celular. A figura 42 apresenta o gráfico de crescimento celular de *Rhodococcus erythropolis* em meio de cultura LB e meio de cultura LB suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cobre (Cu⁺⁺), e a figura 43 apresenta o gráfico para obtenção de dados de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) nas duas condições.

Figura 42 - Cinética de crescimento celular de *Rhodococcus erythropolis* em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (azul) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L⁻¹ de Cu⁺⁺ (vermelho).

Figura 43 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *Rhodococcus erythropolis* em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (azul) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L⁻¹ de Cu⁺⁺ (vermelho).

Os mesmos dados foram fornecidos pelos gráficos representados nas figuras 44 e 45, para *Enterobacter cloacae*.

Figura 44 - Cinética de crescimento celular de *Enterobacter cloacae* em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (azul) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L⁻¹ de Cu⁺⁺ (vermelho).

Figura 45 - Dados de $\mu_{\text{máx}}$ de *Enterobacter cloacae* em meio LB sob condições de 28°C, agitação de 350 rpm e pH 7 (vermelho) e sob mesmas condições com suplementação de 100 mg.L⁻¹ de Cu⁺⁺ (azul).

Nota-se que para ambas as bactérias não houve alteração relevante nos dados de velocidade máxima de crescimento, comprovando a alta resistência celular das cepas estudadas para a concentração de 100 mg.L⁻¹ de Cu⁺⁺. É possível notar também que para *Rhodococcus erythropolis*, a partir de 10 horas de cultivo, o crescimento alcança a fase estacionária no ensaio suplementado com cobre, ocasionando um menor rendimento celular ao final do experimento quando comparado com o meio sem cobre. Partindo do princípio de que a fase estacionária pode ser caracterizada pela limitação de nutrientes ou pelo aumento de toxicidade do meio, uma das hipóteses levantadas para entender o resultado obtido é de que a partir de determinado tempo, o excesso de cobre para *R. erythropolis* pode inibir a duplicação celular por toxicidade ou acúmulo intracelular.

Apesar de *R.erythropolis* apresentar esse comportamento, um estudo de Abbas *et al.*, 2014 defende que a toxicidade de Cadmio é menor em células Gram-positivas do que

em células Gram-negativas devido ao fato da parede celular de bactérias Gram-positivas serem mais espessas que a parede de células de bactérias Gram-negativas, e que isso pode ser mostrado também através de crescimento celular. Nesse mesmo estudo, os autores afirmam que bactérias Gram-positivas necessitam de um tempo maior para alcançar a fase estacionária de crescimento quando comparadas com as células Gram-negativas. Esse mesmo comportamento bacteriano é encontrado nesse estudo, quando comparamos os dados de crescimento de *E. cloacae* e *R. erythropolis*.

As figuras 46 e 47 representam os gráficos de bioacumulação de cobre para *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente.

Figura 46 - Dados de remoção de cobre no processo de bioacumulação para *Rhodococcus erythropolis*.

Figura 47 - Dados de remoção de cobre no processo de bioacumulação para *Enterobacter cloacae*.

Como podemos observar, os valores de remoção de cobre por *R. erythropolis* e *E. cloacae* foram de aproximadamente 8% e 25%, respectivamente. Embora esses dados mostrem que *R. erythropolis* removeu cerca de 3 vezes menos cobre que *E. cloacae*, esses

valores de remoção quando relacionados com a massa celular presente no meio podem ser melhor interpretados. *R. erythropolis* mostrou uma capacidade máxima de bioacumulação de aproximadamente 210 mg Cu⁺⁺.g⁻¹ de biomassa, enquanto que *E. cloacae* mostrou uma capacidade de aproximadamente 20 mg Cu⁺⁺.g⁻¹ de biomassa. Essa discrepância ocorre devido ao fato de as características das biomassas serem bastante diferentes e apresentarem massas celulares entre 0,04 g e 0,7 g no cultivo para *R. erythropolis*, enquanto que para *E. cloacae* os valores foram de 1,5 g e 3,5 g, ambas para leituras de absorbância na faixa de 0,1 e 1,8. Esse dado de capacidade de bioacumulação de *Rhodococcus erythropolis* é bastante animador, já que na literatura não há trabalhos de bioacumulação reportados para *R. erythropolis* e quando comparado com os dados de outras bactérias, comprova o potencial de *R. erythropolis* para processos que envolvem bioacumulação celular.

A Tabela 13 apresenta alguns dados da literatura para bioacumulação em micro-organismos.

Tabela 13 - Dados de bioacumulação metálica por células vivas

Micro-organismo	Metal	Captação metálica mg.g ⁻¹	Autor
<i>Pseudomonas sp</i>	Ni	74,9	Ghozlan <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i>	Ni	10,2	Hernandez <i>et al.</i> , 1998
<i>E. cloacae</i>	Ni	6,9	Karna <i>et al.</i> , 1996
<i>A. niger</i>	Cu	15,6	Dursun <i>et al.</i> , 2003
<i>P. aeruginosa</i>	Pb	110	Chang <i>et al.</i> , 1997
<i>P. aeruginosa</i>	Cu	23,3	Chang <i>et al.</i> , 1997

É raro encontrar dados recentes de bioacumulação por micro-organismos na literatura, talvez pelo fato de os últimos estudos mostrarem a maior eficiência nos dados de bioabsorção, quando comparados com os dados obtidos em bioacumulação. Além disso, muitos estudos apresentam os dados de bioacumulação através de dados de remoção de metal no meio, não correlacionando com quantidade de biomassa utilizada.

Por exemplo, o trabalho de Das & Kumari, 2016 apresenta estudos de bioacumulação. Este trabalho apresentou uma remoção de chumbo de 65 % de uma concentração de 200 mg.L⁻¹, por bioacumulação, para *Enterobacter sp*.

Outro fenômeno bem evidente apresentado nos gráficos é o de aumento e decaimento dos valores de cobre removido. O estudo de Nies & Herzberg, 2013 investigou o mecanismo celular de Enterobactérias na presença de cobre. O estudo diz que devido à sua alta afinidade com grupos tiol, os íons de cobre se ligam a proteínas e inativam os aglomerados de ferro-enzofre (Chillappagari *et al.*, 2010. Macomber & Imlay, 2009). Assim, as bactérias Gram-negativas têm de evitar a acumulação de íons de cobre "livres" no citoplasma e no periplasma. E para tal, o estudo afirma que um dos mecanismos de defesa dessas bactérias é por bombas de efluxo, onde o sistema de efluxo é capaz de transportar íons de cobre do periplasma para o exterior (Franke, Grass, Rensing, & Nies, 2003. Grass & Rensing, 2001). Quando a bactéria é exposta ao cobre, mRNAs específicos para *copA* são imediatamente produzidos com uma concentração máxima de 350 cópias por célula após 2 min em condições aeróbias (Thieme, Neubauer, Nies, & Grass, 2008). Após 2 min, o conteúdo celular deste mRNA diminui novamente, indicando que o cobre já foi removido do citoplasma pela bomba de efluxo de *CopA* recentemente produzida.

Outro trabalho também reporta esse comportamento. De acordo com Arredondo & Núñez, 2005, células procarióticas possuem um mecanismo de resistência ao cobre (homeostase do cobre), e pode ser controlada pela atividade de metalotioneínas e chaperonas, que retém o cobre no citosol.

5.6 Ensaios de bioissorção

Os ensaios de bioissorção foram realizados para ambas as bactérias com a finalidade de avaliar a influência dos parâmetros de pH, concentração celular e concentração metálica na eficiência do processo de bioissorção celular, o qual impacta nos resultados de biorremediação de ambientes contaminados com baixas concentrações metálicas, bem como nos processos de recuperação metálica.

Abaixo serão expostos os resultados obtidos nos ensaios de bioissorção, separados por cada bactéria e por tópicos específicos. Após a exposição dos dados, a compilação dos resultados será realizada para a discussão mais completa.

5.6.1 Influência do pH

A primeira avaliação realizada no processo de bioissorção foi o valor de pH.

Já é bastante documentado na literatura que os valores de pH são determinantes no processo de bioissorção (Albrecht *et al.*, 2011. Das & Kumari, 2016. Kulkarni & Kaware,

2014. Ofomaja & Ho, 2007. Oves *et al.*, 2013. Prithviraj *et al.*, 2014), portanto, para avaliar este efeito, alguns ensaios foram realizados.

As figuras 48 e 49 mostram os dados de porcentagem de remoção de Cu^{++} , em 2 condições, respectivamente: sem controle de pH (pH foi acertado no início, porém não foi controlado durante todo o processo) e com controle de pH (o pH foi controlado durante todo o processo), para *R. erythropolis*.

Figura 48 - Dados de porcentagem de remoção de Cu^{++} de *R.erythropolis*, em ensaio sem controle de pH, onde $[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6.

Figura 49- Dados de porcentagem de remoção de Cu^{++} de *R. erythropolis*, em ensaio com controle de pH, onde $[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6.

As Figuras 50 e 51 ilustram os gráficos obtidos nos ensaios de *E.cloacae* para avaliação do pH no processo de biossorção, nas mesmas condições realizadas para *R. erythropolis* acima.

Figura 50 - Dados de porcentagem de remoção de Cu^{++} de *E. cloacae*, em ensaio sem controle de pH, onde $[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6.

Figura 51 - Dados de porcentagem de remoção de Cu^{++} de *E. cloacae*, em ensaio com controle de pH, onde $[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6.

Os dados apresentados evidenciam a dependência do pH no processo de bioabsorção de ambas as bactérias, mostrando que para os ensaios sem controle, os valores de remoção de cobre para ambas as bactérias é praticamente o mesmo, cerca de 20%, o qual não sofre influência nos valores de pH, pois, como não há controle do pH durante o ensaio, foi observado que o sistema tende a manter o valor de pH entre 4,0 e 5,0.

Embora existam trabalhos publicados com estudos de bioabsorção de cobre a pH 6 (Andreazza *et al.*, 2010. Bueno *et al.*, 2008a. Journal, Yilmaz, Tay, Kivanc, & Turk, 2010), alguns autores defendem que em pH 6 há formação de precipitados de cobre, em formas insolúveis, tornando-o indisponível no meio e assim podendo interferir nos resultados.

Portanto, um ensaio de controle de pH 5 e 6 com concentração metálica de 100 mg.L^{-1} foi realizado de modo a garantir que toda a concentração de cobre estivesse solubilizada ou biodisponível. As Figuras 52 e 53 mostram os gráficos com os dados de

bioissorção de *R. erythropolis* e *E. cloacae* nos valores de pH 5 e 6 juntamente com o ensaio controle (sem adição de biomassa) para ambas as cepas.

Figura 52 - Ensaio de bioissorção de Cu^{++} de *R. erythropolis* e *E. cloacae* comparados com ensaio controle a pH 5.

Figura 53 - Ensaio de bioissorção de Cu^{++} de *R. erythropolis* e *E. cloacae* comparados com ensaio controle a pH 6.

Como mostram os gráficos, a solubilidade do Cu^{++} não foi comprometida para os valores de pH 5 e 6, na concentração estudada, confirmando a eficiência aumentada do processo de bioissorção no valor de pH igual a 6.

Além dessa questão de solubilidade ter sido monitorada por análises quantitativas, houve a preocupação da análise de aspecto visual, a qual não apresentou qualquer indício de formação de precipitados de cobre, conforme pode ser observado na figura 54.

Figura 54 - Solução aquosa de 100 mg.L^{-1} de Cu^{++} a pH 6 sem indícios visuais de precipitação.

FONTE: Acervo pessoal

Nesse contexto, os gráficos representados nas figuras 55 e 56 comparam os resultados obtidos para os ensaios de pH controlado e não controlado, para as bactérias *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente.

Figura 55 - Dados comparativos de % remoção de Cu^{++} entre ensaios de pH controlado e não controlado de *R. erythropolis*. ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e valores de pH = 4, 5 e 6.)

Figura 56 - Dados comparativos de % remoção de Cu^{++} entre ensaios de pH controlado e não controlado de *E. cloacae* ([Cu^{++}] = 100 mg.L^{-1} , [biomassa] = 1,0 g.L^{-1} e valores de pH = 4, 5 e 6).

Os dados mostram que para ensaio controlado em pH 5, o aumento de bioadsorção para ambas as bactérias é menor que 5%. Já para valores de pH 6, a diferença passa a ser bem significativa, representando cerca de 40% a mais de eficiência para *R. erythropolis* e 17% a mais de eficiência para *E. cloacae*. Esses valores representam um aumento de 3 vezes na bioadsorção de *R. erythropolis* e 1,9 vez na bioadsorção de *E. cloacae*.

Segundo Bueno *et al.*, 2008a. Naja & Volesky, 2008, geralmente o aumento do pH ocasiona a desprotonação dos sítios de ligação de metais expostos na superfície celular, enquanto que a diminuição do pH ocasiona a competitividade entre prótons e metais positivamente carregados. Ahemad & Kibret, 2013 é mais enfático e afirma que a captação de cátions de *metais* pela maioria dos tipos de biomassa diminui drasticamente à medida que o pH das soluções de metal diminui de pH 6,0 para 2,5. Portanto, o pH influencia na magnitude das cargas negativas na superfície da biomassa através da protonação ou desprotonação dos sítios de ligação metálica (Ofomaja & Ho, 2007) e esse comportamento refletiu adequadamente nos resultados obtidos.

5.6.2 Influência da concentração de biomassa

A Figura 57 ilustra os dados de capacidade de bioadsorção de cobre (q_e) para a variação de concentração de biomassa de 0,1 g.L^{-1} , 0,5 g.L^{-1} , 1,0 g.L^{-1} e 2,0 g.L^{-1} , para *R. erythropolis* e *E. cloacae*.

Figura 57 - Efeito da concentração de biomassa na bioissorção de cobre ($[Cu^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, pH 6, $t_{\text{contato}} = 120$ minutos)

Como pode ser observado, conforme a concentração da biomassa é aumentada, a capacidade de bioissorção é reduzida. A capacidade de bioissorção da concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ é cerca de 3,3 vezes maior para *R. erythropolis* e até 6 vezes para *E. cloacae*, quando comparada com a concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Melhores resultados de bioissorção com menores concentrações de biomassa já foram reportados na literatura por alguns autores (Sethuraman e Dharmendira Kumar, 2011. Bueno, Torem, Molina, & de Mesquita, 2008a).

Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento da superfície de contato da biomassa, aumentando o número de sítios expostos ao processo de adsorção. Em contrapartida, o aumento excessivo da concentração de biomassa pode atrapalhar o processo de bioissorção pelo efeito de agregação da biomassa, prejudicando a disponibilidade de sítios para processos de adsorção (Bueno *et al.*, 2008a).

5.6.3 Influência do preparo da biomassa

Como o potencial de bioissorção depende de vários aspectos da composição química da biomassa, qualquer fator que possa modificar essa composição poderá causar efeito no processo de bioissorção.

Estão reportados na literatura alguns estudos comparativos entre diversos pré-tratamentos de biomassas. Os mais estudados são entre biomassa inviável e biomassa viável. Entende-se por biomassa inviável a biomassa que foi esterilizada, não retomando seu crescimento após qualquer estímulo, e, biomassa viável a biomassa que não é esterilizada, podendo retornar ao crescimento com algum estímulo. Estudos de Sar, Kazy, Asthana, & Singh, 1999 mostrou aumento na capacidade de bioissorção de biomassa inviável

(autoclavada) de *Pseudomonas aeruginosa*, contra biomassa viável. Outro trabalho mais recente, de Salvadori, Lepre, Ando, Oller Do Nascimento, & Corrêa, 2013 também mostrou um aumento na eficiência de 1,8 vezes com a utilização de biomassa morta, contra biomassa viável, dessa vez por fungo.

As figuras 58 e 59 apresentam os dados de capacidade de bioissorção (q_e) de *R. erythropolis* para biomassa viável (liofilizada) e inviável (liofilizada e autoclavada), respectivamente.

Figura 58 - Efeito do tratamento da biomassa de *R. erythropolis* na bioissorção de cobre ($[Cu^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[biomassa] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - biomassa viável)

Figura 59 - Efeito do tratamento da biomassa de *R. erythropolis* na bioissorção de cobre ($[Cu^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[biomassa] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - biomassa inviável)

Conforme apresentado, a eficiência da bioissorção é maior em biomassa inviável. No melhor pH de trabalho, que foi o pH 6, a porcentagem de remoção de cobre do meio com biomassa de *R. erythropolis* viável foi de cerca de 35% com q_e de aproximadamente 38 mg.g^{-1} , enquanto que com a biomassa inviável essa porcentagem de remoção aumentou para

cerca de 60 % de remoção e a q_e para aproximadamente 67 mg.g^{-1} . Para os valores de pH 4 e 5 não houve diferença na capacidade de captação metálica (q_e) dentre as biomassas utilizadas, alcançando valores de aproximadamente 15 mg.g^{-1} e 20 mg.g^{-1} em pH 4 e 5, respectivamente.

A Figura 60 mostra a diferença visual entre as biomassas de *Rhodococcus erythropolis*: i) inviável e ii) viável.

Figura 60 - Diferença visual entre as biomassas (0,5 g) de *R. erythropolis*: i) inviável e ii) viável.

FONTE: Acervo pessoal

As Figuras 61 e 62 apresentam os mesmos dados, porém, para *E. cloacae*.

Figura 61 - Efeito do tratamento da biomassa de *E. cloacae* na bio sorção de cobre ($[\text{Cu}^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[\text{biomassa}] = 1 \text{ g.L}^{-1}$ - Biomassa viável)

Figura 62 - Efeito do tratamento da biomassa de *E. cloacae* na bioissorção de cobre ($[Cu^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$, $[biomassa] = 1 \text{ g.L}^{-1}$, biomassa inviável)

Como mostram os gráficos acima, o mesmo efeito de pré-tratamento é observado para *E. cloacae*, que apresentou melhores resultados para pH 6 e biomassa inviável. A porcentagem de remoção de cobre do meio, nesse pH, para biomassa de *E. cloacae* viável foi de cerca de 25% com q_e de aproximadamente 26 mg.g^{-1} , enquanto que para biomassa inviável foi de cerca de 40% de remoção e a q_e de aproximadamente 40 mg.g^{-1} . Para *E. cloacae*, a diferença entre os dados obtidos de q_e nos outros valores de pH foram bem significativos quando comparados os dois tipos de biomassa. Os valores de q_e para pH 4 foram 4 mg.g^{-1} e 12 mg.g^{-1} para biomassas viável e inviável, respectivamente. Para pH 5 os valores foram 11 mg.g^{-1} e 23 mg.g^{-1} .

A Figura 63 mostra a diferença de aspectos entre as biomassas de *E. cloacae* com os diferentes pré tratamentos.

Figura 63 - Diferença visual entre as biomassas (0,5 g) de *E. cloacae*: i) inviável e ii) viável.

O processo de bioadsorção de metais por biomassa, como dito, depende de vários fatores como o número de sítios disponíveis para o metal ser bioadsorvido, a acessibilidade dos sítios, o estado químico do local (isto é, disponibilidade) e a afinidade entre sítio e metal (isto é, força de ligação) (Vieira & Volesky, 2000). Métodos envolvidos no pré-tratamento incluem tratamento térmico, lavagem com detergente, uso de ácidos, álcalis, enzimas, etc. O tratamento térmico e lavagem com detergente revelam ligações adicionais de metal (Gadd *et al.*, 1988). Enzimas destroem componentes indesejados e aumentam a eficiência da adsorção (Ting e Teo, 1994). Estudos mostram que no caso do pré-tratamento alcalino, a capacidade de adsorção da biomassa de *Mucor rouxii* foi significativamente maior em comparação com a autoclavagem, enquanto o pré-tratamento de biomassa com ácido resultou em diminuição da bioadsorção de metais (Kapoor & Viraraghavan, 1998). Segundo Karnika Alluri, Reddy Ronda, Saradhi Settalluri, & Singh Bondili, 2007, esse resultado pode ser atribuído à ligação de íons H^+ à biomassa após o tratamento ácido, resultando em adsorção reduzida de metais.

A Figura 64 mostra que a diferença de pré-tratamento da biomassa de ambas as bactérias não ocasiona apenas a diferença no aspecto visual da biomassa, obviamente, bem como na interação da biomassa com o meio. A biomassa viável (i) apresenta um ensaio de bioadsorção de aspecto turvo, apresentando uma certa solubilidade com o meio acrescido de cobre, enquanto que, com a biomassa inviável (ii) o ensaio apresenta um sistema totalmente heterogêneo (sólido-líquido), onde a biomassa aparentemente não apresenta altos índices de solubilidade com o meio.

Figura 64 - Interação biomassa-meio acrescido com cobre. i) biomassa viável. ii) biomassa inviável.

FONTE: Acervo pessoal

O processo de autoclavagem é um dos mais efetivos métodos de esterilização microbiológica, atuando basicamente com a formação de vapor de água sob pressão como o agente de esterilização. Altas pressões permitem que o vapor atinja altas temperaturas, aumentando assim o seu conteúdo de calor e a capacidade de esterilização. A morte celular ocorre devido ao fato de que as proteínas quando são submetidas à elevação de temperatura, nesse caso, sofrem alterações na sua configuração espacial, perdendo assim sua atividade biológica. Esse processo chama-se desnaturação proteica, rompendo ligações originais das proteínas, que sofrem novas dobras ao acaso, inespecificamente. Uma das evidências dessa desnaturação ter ocorrido no processo de tratamento da biomassa autoclavada (biomassa inviável) é que, geralmente, as proteínas se tornam insolúveis quando se desnaturam, e como podemos observar nos ensaios, o índice de solubilidade da biomassa no meio é bem menor com o pré-tratamento de autoclavagem.

Nos últimos anos, o interesse no aumento da capacidade de sorção da biomassa tem chamado a atenção dos pesquisadores. Vários tipos de biomassa, consideradas resíduos industriais que constituem determinados processos, possuem baixa capacidade de adsorção. Como a sorção ocorre principalmente na superfície da biomassa, aumentar e/ou ativar os

locais de ligação na superfície passa a ser uma abordagem importante para melhorar a capacidade de bioissorção celular (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

Os gráficos apresentados nas Figuras 65 e 66 comparam a eficiência de bioissorção entre as biomassas viáveis e inviáveis das bactérias *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente.

Figura 65 - Capacidade de bioissorção da biomassa de *R. erythropolis* inviável (autoclavada) e viável (não autoclavada), nos valores de pH 4, 5 e 6 ($[Cu^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[biomassa] = 1 \text{ g.L}^{-1}$).

Figura 66 - Capacidade de bioissorção da biomassa de *E. cloacae* inviável (autoclavada) e viável (não autoclavada), nos valores de pH 4, 5 e 6 ($[Cu^{++}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$. $[biomassa] = 1 \text{ g.L}^{-1}$).

Os dados comprovam a grande influência que o pré-tratamento da biomassa tem na obtenção de maiores taxas de bioissorção, corroborando com a literatura disponível.

Os gráficos mostram que a biomassa de *E. cloacae* foi mais sensível ao processo de autoclavagem, melhorando os resultados de bioissorção em até 3,0 vezes para pH 4 e 2,1 e 1,6 vezes para valores de pH de 5 e 6, respectivamente. Já *R. erythropolis* apresentou um

melhoramento na eficiência de bioissorção de cerca de 1,3 e 1,8 vezes, nos valores de pH 5 e 6, respectivamente.

5.6.4 Influência da concentração metálica

Considerando que a concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa apresentou melhores resultados na capacidade de bioissorção celular de ambas as bactérias, os próximos experimentos foram realizados com essa concentração de biomassa.

Conforme mostram as figuras 67 (*R. erythropolis*) e 68 (*E. cloacae*), ambas as bactérias apresentaram decaimento na porcentagem de remoção conforme o aumento da concentração de metal no meio.

Figura 67 - Dados de q_e e % remoção de Cu^{++} para *R. erythropolis* correspondentes para a variação de concentração metálica. ($[\text{biomassa}] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$. 28°C . 150 rpm).

Figura 68 - Dados de q_e e % remoção de Cu^{++} para *E. cloacae* correspondentes para a variação de concentração metálica. ($[\text{biomassa}] = 0,1 \text{ g.L}^{-1}$. 28°C . 150 rpm).

As maiores taxas de remoção alcançadas por *R. erythropolis* foram de aproximadamente 35% a pH 5 e 40 % a pH 6, enquanto que as taxas de *E.cloacae* foram de 35% a pH 5 e 50% a pH 6.

Em contrapartida, os dados de q_e para ambas as bactérias aumentam conforme a concentração inicial de metal é aumentada. Os maiores valores aproximados de q_e alcançados por *R. erythropolis* foram de 84 mg.g⁻¹ a pH 5 e 102 mg.g⁻¹ a pH 6, enquanto que para *E. cloacae* foram de 334 mg.g⁻¹ a pH 5 e 353 mg.g⁻¹ a pH 6, nas condições ensaiadas.

Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que quando a concentração de Cu⁺⁺ na solução é baixa para a mesma concentração de biomassa, a captação é alta quando comparada com a concentração inicial do metal. Isso faz com que a porcentagem de remoção decaia conforme o aumento de concentração metálica. Em contrapartida, com o aumento da concentração metálica no meio, mais íons estão disponíveis para que ocorra o fenômeno de biossorção, aumentando os dados de captação de metal por biomassa (q_e) até a saturação do biossorvente, representado graficamente por um platô. Esse mesmo comportamento de biossorção frente ao aumento da concentração metálica no meio já é bastante reportado na literatura, por exemplo, nos trabalhos de Huang *et al.*, 2013, Lu, Shi, Wang, & Chang, 2006, Pahlavanzadeh, Keshtkar, Safdari, & Abadi, 2010, Pahlavanzadeh *et al.*, 2010 e Sukumar, Janaki, Vijayaraghavan, Kamala-Kannan, & Shanthi, 2016, entre outros.

5.7 Isotermas

Os dados experimentais obtidos nos ensaios de biossorção foram explorados utilizando isotermas de adsorção, mais especificamente os modelos de Langmuir e Freundlich.

As figuras 69 e 70 apresentam os gráficos com os dados linearizados para o modelo de Langmuir e Freundlich, respectivamente, para *Rhodococcus erythropolis*, em pH 5 e em pH 6.

Figura 69 - Dados de bioissorção de *R. erythropolis* aplicados ao modelo de Langmuir linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L⁻¹. pH controlado. 28°C e 150 rpm.

Figura 70 - Dados de bioissorção de *R. erythropolis* aplicados ao modelo de Freundlich linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L⁻¹. pH controlado. 28°C e 150 rpm.

Os dados linearizados para *E.cloacae* estão representados nas figuras 71 e 72, para os modelos de Langmuir e Freundlich, respectivamente.

Figura 71 - Dados de bioissorção de *E.cloacae* aplicados ao modelo de Langmuir linearizado, sob condições de [biomassa inviável] = 0,1 g.L⁻¹. pH controlado. 28°C e 150 rpm.

Figura 72 - Dados de bio sorção de *E. cloacae* aplicados ao modelo de Freundlich linearizado, sob condições de [biomassa invível] = 0,1 g.L⁻¹. pH controlado. 28°C e 150 rpm.

E na Tabela 14 estão os parâmetros encontrados para cada um dos modelos, para *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente, nos dois valores de pH.

Tabela 14 - Dados das constantes das isothermas dos modelos de Langmuir e Freundlich e o coeficiente de regressão linear nas condições estudadas, para *R. erythropolis* e *E. cloacae*.

<i>Rhodococcus erythropolis</i>						
	Langmuir			Freundlich		
	b (L/mg)	Q _{max} (mg.g ⁻¹)	R ²	K _F	1/n	R ²
pH 5	0,0333	121,95	0,9913	4,7951	0,5879	0,9393
pH 6	0,0939	68,03	0,9964	4,8787	0,6279	0,9639

<i>Enterobacter cloacae</i>						
	Langmuir			Freundlich		
	b (L/mg)	Q _{max} (mg.g ⁻¹)	R ²	K _F	1/n	R ²
pH 5	0,0206	238,10	0,9975	5,144	0,7954	0,9651
pH 6	0,0128	370,37	0,9991	6,8707	0,8184	0,9278

Entende-se que os coeficientes de regressão linear acima de 0,9 fornecem ajustes aceitáveis para os modelos. Como podemos observar através dos dados obtidos, ambos os modelos apresentaram-se adequados, porém, para ambas as bactérias, o modelo que se mostrou ligeiramente mais adequado foi o de Langmuir. Abaixo, as figuras 73, 74, 75 e 76 apresentam os gráficos das isothermas obtidas e ajustadas, nos dois valores de pH, para *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente.

Figura 73 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para *R. erythropolis* a pH 5.

Figura 74 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para *R. erythropolis* a pH 6.

Figura 75 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para *E. cloacae* a pH 5.

Figura 76 - Comparação entre a isoterma obtida experimentalmente e as isotermas ajustadas de Langmuir, Freundlich, para *E. cloacae* a pH 6.

Embora Isotermas de Langmuir não correspondam ao fenômeno de bioissorção, ela é a mais utilizada, proporcionando bons comparativos com a literatura disponível. Nesse sentido, de acordo com os parâmetros obtidos para o modelo de Langmuir, *R. erythropolis* obteve uma $q_{\max} = 121,95 \text{ mg.g}^{-1}$ em pH 5, e $q_{\max} = 68,03 \text{ mg.g}^{-1}$ em pH 6, sugerindo então o pH 5 como o melhor pH para o fenômeno ocorrer. Porém, contrariando os dados previstos pelo modelo de Langmuir, a figura 78 abaixo representa o gráfico com isotermas obtidas experimentalmente para *Rhodococcus erythropolis* nos valores de pH 5 e 6, as quais mostram melhores resultados para fenômeno de bioissorção em pH 6.

Figura 77 - Isotermas experimentais obtidas para *Rhodococcus erythropolis* em pH 5 e 6.

Os valores mostram que a biomassa de *R. erythropolis* é um bom bioissorvente para captação de íons bivalentes de cobre. Não há registro na literatura para bioissorção de *R. erythropolis*, porém, há dados reportados de bioissorção para bactérias do mesmo gênero,

ou seja, *Rhodococcus*. O trabalho de Bueno, Torem, Molina, & de Mesquita, 2008b apresentou $q_{\max} = 32,2 \text{ mg.g}^{-1}$ para cobre utilizando *Rhodococcus opacus*, também a pH 6. Outro trabalho de Silvas e colaboradores, 2011 apresentou $q_{\max} = 48,2 \text{ mg.g}^{-1}$ para uma solução multi-elementar, na somatória de todos os metais adsorvidos, também para *Rhodococcus opacus*, e o trabalho de Cayllahua & Torem, 2010 apresentou $q_{\max} = 41,59 \text{ mg.g}^{-1}$ para alumínio, com *R. opacus*. Já para chumbo, a mesma bactéria apresentou $q_{\max} = 95,2 \text{ mg.g}^{-1}$ no trabalho de Bueno, Torem, De Carvalho, Pino, & De Mesquita, 2011. Esses dados comprovam a grande eficiência da biomassa de *Rhodococcus erythropolis*, nas condições ensaiadas.

Para *E. cloacae* já existem alguns dados reportados na literatura para bioissorção de cobre e outros metais. Como por exemplo, o trabalho de Lu *et al.*, 2006 apresenta dados de bioissorção de cobre de $q_{\max} = 32,5 \text{ mg.g}^{-1}$, e para Chumbo e Cadmio os dados são de 50 mg.g^{-1} e $46,2 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente. Outro trabalho de Sethuraman & Kumar, 2011., *E. cloacae* apresentou dados de $q_{\max} = 13,09 \text{ mg.g}^{-1}$. Outros gêneros também são reportados, como por exemplo no trabalho de Yilmaz *et al.*, 2010, que utilizou *Enterococcus faecium* liofilizada e obteve um $q_{\max} = 106,4 \text{ mg.g}^{-1}$.

Este trabalho apresentou dados de $q_{\max} = 238,10 \text{ mg.g}^{-1}$ e $370,37 \text{ mg.g}^{-1}$ para valores de pH 5 e 6 respectivamente, para *E. cloacae*.

O gráfico comparativo das isotermas obtidas experimentalmente para os valores de pH 5 e 6, representado na figura 78, corroboram com os dados previstos pelo modelo de Langmuir que sugere o melhor pH de trabalho é o pH 6.

Figura 78 - Isotermas experimentais obtidas para *Enterobacter cloacae* em pH 5 e 6.

Quanto aos parâmetros encontrados para as isotermas de Freundlich, o valor de K_f sugere alta adsorção de cobre e indica grande capacidade do bioissorvente em reter o metal. Ainda, segundo Febrianto *et al.*, 2009, valores de $1/n$ podem demonstrar se o processo de adsorção é favorável (valores entre 0 e 1) ou desfavorável. No caso das biomassas em estudo, todos os valores de $1/n$ ficaram dentro da faixa favorável, podendo-se considerar que a adsorção do cobre, segundo o modelo de Freundlich, também foi eficiente.

A tabela 15 apresenta alguns dados da literatura para bioissorção de cobre e os resultados obtidos neste trabalho.

Tabela 15 – Tabela comparativa entre os valores encontrados na literatura para captação de Cu^{++} e o presente trabalho

Micro-organismo	Captação metálica (mg.g^{-1})	Referência
<i>Enterobacter cloacae</i>	370,37	este trabalho
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	121,95	este trabalho
<i>Enterococcus faecium</i>	106,4	(Journal <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	66,7	Ozturk 2004
<i>Pseudomonas cepacia</i>	65,3	Savvaidis, 2003
<i>Sphaerotilus natans</i>	60,0	Beolchini, 2006
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	39,8	Liu, 2004
<i>Micrococcus luteus</i>	33,5	Nakajima <i>et al.</i> , 2001
<i>Enterobacter sp</i>	32,5	(Lu <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhodococcus opacus</i>	32,2	(Bueno <i>et al.</i> , 2008a)
<i>Pantoea</i>	31,3	(Ozdemir, Ceyhan, Ozturk, Akirmak, & Cosar, 2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23,1	Chang <i>et al.</i> 1997
<i>Bacillus subtilis</i>	20,8	Nakajima <i>et al.</i> , 2001
<i>Bacillus sp</i>	16,3	(Tunali, Çabuk, & Akar, 2006b)
<i>Pseudomonas putida</i>	15,8	Chen <i>et al.</i> 2005

Os resultados obtidos no processo de bioissorção foram melhores para ambas as bactérias, já que no processo de bioissorção o sistema consegue atingir o equilíbrio na captação metálica, enquanto que no processo de bioacumulação, o metabolismo das bactérias ocasiona grandes oscilações nesse fenômeno, comportamento que condiz com os registros da literatura. Além disso, a bioacumulação foi um processo mais demorado e

necessita de condições para manutenção da vida celular, portanto, a biomassa nesse caso não pode ser reutilizada. A bioissorção além de ser um processo rápido, não há a necessidade de manutenção da vida da célula, pode ser reutilizada de acordo com a literatura e há a possibilidade de aplicação da mesma através da imobilização da biomassa em estruturas sólidas.

Como foi possível perceber durante este trabalho, os fenômenos de bioissorção e bioacumulação são extremamente dependentes de uma série de fatores físicos e químicos, como por exemplo pH, temperatura, concentração de biomassa, preparo de biomassa, concentração metálica, competitividade metálica, dentre outros que podem não ter sido explorados ainda. Os dados da literatura servem obviamente como comparativos, porém, cada trabalho analisa determinados parâmetros, o que pode alterar significativamente no resultado final de bioissorção de seus bioissorventes. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho foram bons, eficientes e refletem o resultado dessas condições experimentais avaliadas.

6. Conclusão

Ambas as cepas apresentaram identificação segura a nível de espécie pelos métodos de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Através do estudo das diferentes condições de cultivo, foi possível aumentar o rendimento celular de ambas as bactérias em 7 vezes para *R. erythropolis* e 1,7 vezes para *E. cloacae*. As melhores condições de pH e agitação encontradas neste estudo para ambas as bactérias foram de pH 7 e 350 rpm de agitação.

Ambas as bactérias se mostraram resistentes ao Cu^{++} . *R. erythropolis* apresentou MIC de 200 mg.L^{-1} e *E. cloacae* de 400 mg.L^{-1} , dados esses maiores que os reportados na literatura, provavelmente porque são bactérias isoladas de ambiente contaminado. Não há registro de MIC reportado na literatura para *Rhodococcus erythropolis*, sendo este trabalho comparado com resultados de bactérias do mesmo gênero.

Ambos os modelos, de Langmuir e de Freundlich, mostraram-se adequados para os resultados obtidos neste trabalho, sendo o de Langmuir ligeiramente mais apropriado.

Os resultados de capacidade máxima de bioadsorção (q_{max}) previstos através do modelo de Langmuir para *R. erythropolis* foram de 68,03 mg.g^{-1} e 121,95 mg.g^{-1} , respectivamente, para os valores de pH 5 e 6. Para *E. cloacae* foram 238,10 mg.g^{-1} e 370,37 mg.g^{-1} . Os melhores resultados representaram cerca de 12 % e 40 % do peso das biomassas de captação metálica para *R. erythropolis* e *E. cloacae*, respectivamente.

R. erythropolis e *E. cloacae* são bioadsorventes que podem e devem ser explorados como uma forma alternativa de remoção metálica de efluentes contaminados com baixas concentrações metálicas, principalmente quando comparados com tratamentos do tipo carvão ativado, extração por solventes, oxidação química, entre outros tratamentos convencionais de maior custo e maior impacto ambiental.

7. Referências

- 2011 - Biosorption Kinetics of Cu ions removal from aqueous solution using bacteria.pdf. (n.d.).
- Abbas, S. Z., Rafatullah, M., Ismail, N., & Lalung, J. (2014). Isolation, identification, characterization, and evaluation of cadmium removal capacity of *Enterobacter* species. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 1279–1287. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400157>
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2013). Recent Trends in Microbial Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Biochemistry & Molecular Biology*, 1(1), 19–26. <https://doi.org/10.12966/bmb.06.02.2013>
- Ahluwalia, S. S., & Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12), 2243–2257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.006>
- Ahmaruzzaman, M. (2008). Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 143(1–2), 48–67. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.002>
- Al-jumaily, E. F., & Al-, N. Z. (2012). NUTRITIONAL REQUIREMENT OF ENTEROBACTER CLOACAE FOR BIODEGRADATION OF HYDROCARBONS Absorbance at Isolates No ., 1(1), 65–70.
- Albarracín, V. H., Amoroso, M. J., & Abate, C. M. (2005). Isolation and characterization of indigenous copper-resistant actinomycete strains. *Chemie Der Erde - Geochemistry*, 65(SUPPL. 1), 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2005.06.004>
- Albrecht, T. W. J., Addai-Mensah, J., & Fornasiero, D. (2011). Effect of pH , Concentration and Temperature on Copper and Zinc Hydroxide Formation / Precipitation in Solution. *CHEMECA 2011 - "Engineering a Better World,"* 1–10. Retrieved from <http://arrow.unisa.edu.au:8081/1959.8/123424>
- Ambiental, T., Brand, A. R., Ant, D., Nas, R., Ramalho, A., Pereira¹, B., ... De Freitas¹, F. (2012). Uso De Microorganismos Para a Biorremediação De Ambientes Impactados. *Rev. Elet. Em Gestão Educação E Tecnologia Ambiental*, 6(6), 975–1006. Retrieved from www.ufsm.br/reget%5Cnhttp://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget
- Amirnia, S. (2015). Biosorption Processes for Removal of Toxic Metals from Wastewaters, (July), 1–166.
- and, V. R., & Fenselau*, C. (2001). Characterization of the Protein Subset Desorbed by MALDI from Whole Bacterial Cells. <https://doi.org/10.1021/AC0008791>
- Andreazza, R., Pieniz, S., Wolf, L., Lee, M. K., Camargo, F. A. O., & Okeke, B. C. (2010). Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. *Science of the Total Environment*, 408(7), 1501–1507. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.017>
- Andrews, J. M., & Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Aquino, E., Barbieri, C., & Oller Nascimento, C. A. (2011). Engineering Bacteria for Bioremediation. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. <https://doi.org/10.5772/19546>
- Arredondo, M., & Núñez, M. T. (2005). Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4–5 SPEC. ISS.), 313–327. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.010>

- Assis, D. M., Juliano, L., & Juliano, M. A. (2011). A ESPECTROMETRIA DE MASSAS APLICADA NA CLASSIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355>. *Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde*, 9(2), 344–355. <https://doi.org/10.5892/ruvrv.2011.92.344355>
- Aurélio Ramalho Rocio Marcelo Machado da Silva Pedro Sergio Landim de Carvalho José Guilherme da Rocha Cardoso, M. (n.d.). Perspectivas atuais da indústria de cobre no Brasil. *BNDES Setorial*, 36, 397–428.
- Avanzi, I. R., Gracioso, L. H., Baltazar, M. D. P. G., Karolski, B., Perpetuo, E. A., & Do Nascimento, C. A. O. (2016). Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8125-8>
- Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., & Christofi, N. (1998). A review: The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>
- Bergerman, M., Delboni, H., & Nankran, M. (2009). Estudo de variabilidade e otimização do circuito de moagem SAG da Usina do Sossego. *Rem: Revista Escola de Minas*, 62(1), 93–97. <https://doi.org/10.1590/S0370-44672009000100013>
- Bertani, G. (1951). Studies on Lysogenesis I. The mode of phageliberation by lysogenic *escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293–300. <https://doi.org/citeulike-article-id:149214>
- Bertoncini, E. I., & Mattiazzo, M. E. (1999). Lixiviação de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 23(3), 737–744. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=804375>
- Beveridge, T. J., & Koval, S. F. (1981). Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology*, 42(2), 325–335.
- Biossorção, P., De, D., Alberto, J., & Tenório, S. (2011). a14v64n4, 64(4), 487–492.
- Brown, B., & Ahsanullah, M. (1971). Effect of heavy metals on mortality and growth. *Marine Pollution Bulletin*, 2(12), 182–187. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(71\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0025-326X(71)90087-7)
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45(3), 198–207. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860>
- Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., De Carvalho, R. J., Pino, G. a H., & De Mesquita, L. M. S. (2011). Fundamental aspects of biosorption of lead (II) ions onto a *Rhodococcus opacus* strain for environmental applications. *Minerals Engineering*, 24(14), 1619–1624. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2011.08.018>
- Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F., & de Mesquita, L. M. S. (2008a). Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Minerals Engineering*, 21(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.08.013>
- Bueno, B. Y. M., Torem, M. L., Molina, F., & de Mesquita, L. M. S. (2008b). Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: Equilibrium and kinetic studies. *Minerals Engineering*, 21(1), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.08.013>
- Cayllahua, J. E. B., & Torem, M. L. (2010). Biosorption of aluminum ions onto *Rhodococcus opacus* from wastewaters. *Chemical Engineering Journal*, 161(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.025>
- CHANDRASEKHAR, K., Kamala, C. T., Chary, N. S., Sastry, A. R. K., Nageswara Rao, T., & Vairamani, M. (2004). Removal of lead from aqueous solutions using an immobilized

- biomaterial derived from a plant biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 108(1–2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.013>
- Chang, J. S., Law, R., & Chang, C. C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*, 31(7), 1651–1658. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00008-0)
- Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O. P., Marahiel, M. A., & Miethke, M. (2010). Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 192(10), 2512–2524. <https://doi.org/10.1128/JB.00058-10>
- Chojnacka, K. (2010). Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. *Environment International*, 36(3), 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>
- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., & Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 14(11), 1584–1586. <https://doi.org/10.1038/nbt1196-1584>
- Cobbett, C., & Goldsbrough, P. (2002). P HYTOCHELATINS AND M ETALLOTHIONEINS : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 159–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Continental, J. (2011). 1 , 2 1, 2(2), 19–33.
- Das, M. P., & Kumari, N. (2016). A microbial bioremediation approach: Removal of heavy metal using isolated bacterial strains from industrial effluent disposal site. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 38(1), 111–114.
- Davis, T. a., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37(18), 4311–4330. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)
- De Carvalho, C. C. C. R. (2012). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. *Research in Microbiology*, 163(2), 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.11.003>
- De Carvalho, C. C. C. R., & Da Fonseca, M. M. R. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(6), 715–726. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1932-3>
- Dumestre, A., Sauvé, S., McBride, M., Baveye, P., & Berthelin, J. (1999). Copper speciation and microbial activity in long-term contaminated soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(2), 124–131. <https://doi.org/10.1007/s002449900451>
- El Baz, S., Baz, M., Barakate, M., Hassani, L., El Gharmali, A., & Imzil, B. (2015). Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas. *Scientific World Journal*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/761834>
- Febrianto, J., Kosasih, A. N., Sunarso, J., Ju, Y. H., Indraswati, N., & Ismadji, S. (2009). Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2–3), 616–645. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.042>

- Finnerty. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 195–210. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x>
- Foo, K. Y., & Hameed, B. H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 156(1), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., & Nies, D. H. (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(13), 3804–12. <https://doi.org/10.1128/jb.185.13.3804-3812.2003>
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122(2–4 SPEC. IIS.), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.002>
- Gadd, G. M. (2009). Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(1), 13–28. <https://doi.org/10.1002/jctb.1999>
- Gadd, G. M., & White, C. (1993). Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? *Trends in Biotechnology*, 11(8), 353–359. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90158-6)
- Garrido-Baserba, M., Reif, R., Hernández, F., & Poch, M. (2012). Implementation of a knowledge-based methodology in a decision support system for the design of suitable wastewater treatment process flow diagrams. *Journal of Environmental Management*, 112, 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.013>
- Gaur, N., Flora, G., Yadav, M., & Tiwari, A. (2014). A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 16(2), 180–93. <https://doi.org/10.1039/c3em00491k>
- Gavrilescu, M. (2004). Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Engineering in Life Sciences*, 4(3), 219–232. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420026>
- Ghosh, S. K., Chaudhuri, J., Gachhui, R., Mandal, A., & Ghosh, S. (2007). Effect of mercury and organomercurials on cellular glucose utilization: a study using resting mercury-resistant yeast cells. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2), 375–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03100.x>
- Gier, D., Rocca, D., Todescato, D., Maass, D., Oliveira, D., Souza, S. M. A. G. U. D. E., ... Souza, U. D. E. (n.d.). Estudo das condições de crescimento do *Rhodococcus erythropolis* ATCC 1277, 1–8.
- Gleick, P. H. (2003). W <scp>ATER</scp> U <scp>SE</scp>. *Annual Review of Environment and Resources*, 28(1), 275–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.28.040202.122849>
- Grass, G., & Rensing, C. (2001). Genes Involved in Copper Homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 2145–2147. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2145-2147.2001>
- Guo, Z., Han, J., Yang, X.-Y., Cao, K., He, K., Du, G., ... Sun, X. (2015). Proteomic analysis of the copper resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 7(3), 448–54. <https://doi.org/10.1039/c4mt00276h>
- Harada, M. (1995). Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan Caused by

- Environmental Pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(1), 1–24. <https://doi.org/10.3109/10408449509089885>
- Huang, F., Dang, Z., Guo, C. L., Lu, G. N., Gu, R. R., Liu, H. J., & Zhang, H. (2013). Biosorption of Cd(II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.01.062>
- Iwabuchi, N., Sunairi, M., Anzai, H., Morisaki, H., & Nakajima, M. (2003). Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1–2), 51–60. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00036-5)
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Journal, B., Yilmaz, M., Tay, T., Kivanc, M., & Turk, H. (2010). Removal of Copper (II) Ions From Aqueous Solution By a Lactic Acid Bacterium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(2), 309–314.
- Kang, S.-Y., Lee, J.-U., & Kim, K.-W. (2007). Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Engineering Journal*, 36(1), 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.06.005>
- Kapoor, A., & Viraraghavan, T. (1998). Biosorption of heavy metals on *Aspergillus niger*: Effect of pretreatment. *Bioresource Technology*, 63(2), 109–113. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00118-1)
- Karnika Alluri, H., Reddy Ronda, S., Saradhi Settalluri, V., & Singh Bondili, J. (2007). Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African Journal of Biotechnology*, 6(25), 2924–2931. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i25.58244>
- Khan, F. I., Husain, T., & Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71(2), 95–122. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003>
- Kim, S.-K., Lee, B.-S., Wilson, D. B., & Kim, E.-K. (2005). Selective cadmium accumulation using recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(2), 109–114. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.109>
- Koçberber, N., & Dönmez, G. (2007). Chromium(VI) bioaccumulation capacities of adapted mixed cultures isolated from industrial saline wastewaters. *Bioresource Technology*, 98(11), 2178–83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.017>
- Kotaś, J., & Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 107(3), 263–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15092973>
- Kotrba, P., & Ruml, T. (2000). Bioremediation of Heavy Metal Pollution Exploiting Constituents, Metabolites and Metabolic Pathways of Livings. A Review. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 65(8), 1205–1247. <https://doi.org/10.1135/cccc20001205>
- Kratochvil, D., & Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 291–300. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01218-9](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01218-9)
- Kulkarni, S. J. J., & Kaware, J. P. P. (2014). Fixed Bed Removal of Heavy Metal- a Review. *International Journal of Research*, 1(6), 861–871. Retrieved from <http://internationaljournalofresearch.org/index.php/ijr/article/view/336>

- Kunz, A., & Peralta-Zamora, P. (2002). NOVAS TENDÊNCIAS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES TÊXTEIS. *Quim. Nova*, 25(1), 78–82.
- Kuroda, K., & Ueda, M. (2010). Engineering of microorganisms towards recovery of rare metal ions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2581-8>
- Langmuir, I. (1918). THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *Journal of the American Chemical Society*, 40(9), 1361–1403. <https://doi.org/10.1021/ja02242a004>
- Lemos, J. L. S., Carlos, M. C., & Farias, Y. P.-T. M. M. (2008). *Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados. Série Tecnologia Ambiental - CETEM.*
- Lewinson, O., Lee, A. T., & Rees, D. C. (2009). A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4677–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900666106>
- Limousin, G., Gaudet, J. P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., & Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), 249–275. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.09.010>
- Liu, J., Zhang, Y., Huang, D., & Song, G. (2005). Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 280(1–2), 139–145. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-8541-4>
- Lu, W. Bin, Shi, J. J., Wang, C. H., & Chang, J. S. (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials*, 134(1–3), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.036>
- Luiz, C., Júnior, C., & Cobre, I. H. D. O. (1988). Cobre e suas Ligas, 1–5.
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), 8344–8349. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812808106>
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30(2), 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
- Mannazzu, I., Guerra, E., Ferretti, R., Pediconi, D., & Fatichenti, F. (2000). Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1475(2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00062-3)
- Martín-González, A., Díaz, S., Borniquel, S., Gallego, A., & Gutiérrez, J. C. (2006). Cytotoxicity and bioaccumulation of heavy metals by ciliated protozoa isolated from urban wastewater treatment plants. *Research in Microbiology*, 157(2), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.005>
- McGeer, J. C., Szedbedinszky, C., McDonald, D. G., & Wood, C. M. (2002). The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(1), 147–160. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00084-4](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00084-4)
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(7), 887–902.

- <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>
- Muñoz, R., Alvarez, M. T., Muñoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B., & Mattiasson, B. (2006). Sequential removal of heavy metals ions and organic pollutants using an algal-bacterial consortium. *Chemosphere*, 63(6), 903–911. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.062>
- Naeem, A., Woertz, J. R., & Fein, J. B. (2006). Experimental measurement of proton, Cd, Pb, Sr, and Zn adsorption onto the fungal species *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Science & Technology*, 40(18), 5724–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17007132>
- Naja, G., & Volesky, B. (2008). Optimization of a biosorption column performance. *Environmental Science and Technology*, 42(15), 5622–5629. <https://doi.org/10.1021/es703114r>
- Nies, D. H., & Herzberg, M. (2013). A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 87(3), 447–454. <https://doi.org/10.1111/mmi.12123>
- Nishitani, T., Shimada, M., Kuroda, K., & Ueda, M. (2010). Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(2), 641–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2304-1>
- Ofomaja, A. E., & Ho, Y.-S. (2007). Effect of pH on cadmium biosorption by coconut copra meal. *Journal of Hazardous Materials*, 139(2), 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.039>
- Oves, M., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2013). Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(2), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.006>
- Oyetibo, G. O., Ilori, M. O., Obayori, O. S., & Amund, O. O. (2015). Metal biouptake by actively growing cells of metal-tolerant bacterial strains. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(8). <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4731-z>
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F., & Cosar, T. (2004). Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18. *Chemical Engineering Journal*, 102(3), 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2004.01.032>
- Pagenkopf, G. K., Russo, R. C., & Thurston, R. V. (1974). Effect of Complexation on Toxicity of Copper to Fishes. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31(4), 462–465. <https://doi.org/10.1139/f74-077>
- Pahlavanzadeh, H., Keshtkar, A. R., Safdari, J., & Abadi, Z. (2010). Biosorption of nickel(II) from aqueous solution by brown algae: Equilibrium, dynamic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1), 304–310. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.004>
- Pattus, F., & Abdallah, M. A. (2000). Siderophores and Iron-Transport in Microorganisms. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 47(1), 1–20. <https://doi.org/10.1002/jccs.200000001>
- Prithviraj, D., Deboleena, K., Neelu, N., Noor, N., Aminur, R., Balasaheb, K., & Abul, M. (2014). Biosorption of nickel by *Lysinibacillus* sp. BA2 native to bauxite mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.009>

- Pümpel, T., Ebner, C., Pernfuß, B., Schinner, F., Diels, L., Keszthelyi, Z., ... Wouters, H. (2001). Treatment of rinsing water from electroless nickel plating with a biologically active moving-bed sand filter. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00168-7](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00168-7)
- Ramirez, M., Pereira da Silva, M., Ferreira, S. G., & Vasco, O. (2007). Mathematical models applied to the Cr(III) and Cr(VI) breakthrough curves. *Journal of Hazardous Materials*, 146(1–2), 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.056>
- Ranjan, D., Srivastava, P., Talat, M., & Hasan, S. H. (2009). Biosorption of Cr(VI) from water using biomass of aeromonas hydrophila: Central composite design for optimization of process variables. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(3), 524–539. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8404-z>
- Roane, T. M., Rensing, C., Pepper, I. L., & Maier, R. M. (2009). Microorganisms and Metal Pollutants. In *Environmental Microbiology* (pp. 421–441). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00021-3>
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., & Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(3), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1448-7>
- Salvadori, M. R., Lepre, L. F., Ando, R. a., Oller Do Nascimento, C. a., & Corrêa, B. (2013). Biosynthesis and uptake of copper nanoparticles by dead biomass of *Hypocrea lixii* isolated from the metal mine in the Brazilian Amazon region. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080519>
- Samuelson, P., Wernérus, H., Svedberg, M., & Ståhl, S. (2000). Staphylococcal surface display of metal-binding polyhistidyl peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1243–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698802>
- Sar, P., Kazy, S. ., Asthana, R. ., & Singh, S. . (1999). Metal adsorption and desorption by lyophilized *Pseudomonas aeruginosa*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(2–3), 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(99\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(99)00064-5)
- Schenberg, A. C. G. (2010). Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. *Estudos Avançados*, 24(70), 07–17. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000300002>
- Schiewer, S., & Balaria, A. (2009). Biosorption of Pb²⁺ by original and protonated citrus peels: Equilibrium, kinetics, and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 146(2), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.05.034>
- Sébastien Meylan, Renata Behra, and, & Sigg*, L. (2003). Accumulation of Copper and Zinc in Periphyton in Response to Dynamic Variations of Metal Speciation in Freshwater. <https://doi.org/10.1021/ES034566+>
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (n.d.). The Bacterial Cell Envelope. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>
- Smith, M. C. A., Sumner, E. R., & Avery, S. V. (2007). Glutathione and Gts1p drive beneficial variability in the cadmium resistances of individual yeast cells. *Molecular Microbiology*, 66(3), 699–712. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05951.x>
- Snel, B., Bork, P., & Huynen, M. A. (1999). Genome phylogeny based on gene content. *Nature Genetics*, 21(1), 108–110. <https://doi.org/10.1038/5052>
- Soares, E. V., Hebbelinck, K., & Soares, H. M. (2003). Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(5), 336–343. <https://doi.org/10.1139/w03-044>
- Sodré, F. F., & Grassi, M. T. (2005). Especificação Do Cobre Em Águas Naturais : INFLUÊNCIA DE

FATORES ASSOCIADOS À URBANIZAÇÃO, 165.

- Souza, M. C. De, Vargas, A., Saueressig, G., & Luchese, J. (2016). Análise das práticas de reuso de água residual : estudo de casos em lavanderias industriais Analysis of residual water reuse practices : case study in industrial laundry, 497–514.
- Sukumar, C., Janaki, V., Vijayaraghavan, K., Kamala-Kannan, S., & Shanthi, K. (2016). Removal of Cr(VI) using co-immobilized activated carbon and *Bacillus subtilis*: fixed-bed column study. *Clean Technologies and Environmental Policy*, (Vi), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1203-2>
- Sunda, W. (1975). *The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton*. Woods Hole, MA: Massachusetts Institute of Technology and Woods Hole Oceanographic Institution. <https://doi.org/10.1575/1912/1275>
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H. P., & Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 72(8), 1453–1470. <https://doi.org/10.1351/pac200072081453>
- Thieme, D., Neubauer, P., Nies, D. H., & Grass, G. (2008). Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7463–70. <https://doi.org/10.1128/AEM.01370-08>
- Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K.-T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L., & Chatterjee, M. (2007). Metallothionein: an overview. *World Journal of Gastroenterology*, 13(7), 993–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17373731>
- Tunali, S., Çabuk, A., & Akar, T. (2006a). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*, 115(3), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2005.09.023>
- Tunali, S., Çabuk, A., & Akar, T. (2006b). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*, 115(3), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2005.09.023>
- Uhlik, O., Strejcek, M., Junkova, P., Sanda, M., Hroudova, M., Vlcek, C., ... Macek, T. (2011). Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-time of flight mass spectrometry- and MALDI biotyper-based identification of cultured biphenyl-metabolizing bacteria from contaminated horseradish rhizosphere soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(19), 6858–66. <https://doi.org/10.1128/AEM.05465-11>
- Uslu, G., & Tanyol, M. (2006). Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 135(1–3), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.11.029>
- Valls, M., De Lorenzo, V., González-Duarte, R., & Atrian, S. (2000). Engineering outer-membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhanced heavy-metal bioadsorption. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 79(1–4), 219–223. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(99\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(99)00170-1)
- Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A., & Nakatsu, C. H. (2006). Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.01.006>
- Veglio', F., & Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review.

- Hydrometallurgy*, 44(3), 301–316. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(96\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(96)00059-X)
- Vegliò, F., Esposito, A., & Reverberi, A. P. (2003). Standardisation of heavy metal biosorption tests: Equilibrium and modelling study. *Process Biochemistry*, 38(6), 953–961. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00235-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00235-2)
- Vieira, R. H., & Volesky, B. (2000). Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 3(1), 17–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963329>
- Vijayaraghavan, K., Palanivelu, K., & Velan, M. (2006). Biosorption of copper(II) and cobalt(II) from aqueous solutions by crab shell particles. *Bioresource Technology*, 97(12), 1411–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.001>
- Vijayaraghavan, K., & Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26(3), 266–291. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>
- Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 59(2–3), 203–216. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(00\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(00)00160-2)
- Volesky, B. (2003). Biosorption process simulation tools. *Hydrometallurgy*, 71(1), 179–190. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(03\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(03)00155-5)
- Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water Research*, 41(18), 4017–4029. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.05.062>
- Volesky, B., & Holan, Z. R. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*, 11(3), 235–250. <https://doi.org/10.1021/bp00033a001>
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Walker, J., Fox, A. J., Edwards-Jones, V., & Gordon, D. B. (2002). Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. *Journal of Microbiological Methods*, 48(2–3), 117–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11777562>
- Wang, J., & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427–451. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908–934. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Xu, H., Liu, Y., & Tay, J.-H. (2006). Effect of pH on nickel biosorption by aerobic granular sludge. *Bioresource Technology*, 97(3), 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.011>
- Yin, Y., Impellitteri, C. a, You, S.-J., & Allen, H. E. (2002). The importance of organic matter distribution and extract soil:solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *The Science of the Total Environment*, 287(1–2), 107–119. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)01000-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)01000-2)
- Zou, H. X., Pang, Q. Y., Zhang, A. Q., Lin, L. D., Li, N., & Yan, X. F. (2015). Excess copper

induced proteomic changes in the marine brown algae *Sargassum fusiforme*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.028>

Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., & Matis, K. A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, 39(8), 909–916. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00200-0)