



# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

***Bacillus* spp. PRODUTORAS DE BIOFLOCULANTES E  
HIDROLASES EXTRACELULARES, ENTRE ESTIRPES DE  
SOLO/LODO QUE SINTETIZAM POLIHIDROXIALCANOATOS  
E/OU SURFACTANTES**

JÉSSICA GUERRA GOUVEIA

ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Queijeiro López

Maceió, Estado de Alagoas

Julho, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A.C. Simões  
Tabuleiro do Martins  
57072-970 - Maceió-AL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

JÉSSICA GUERRA GOUVEIA

*Bacillus* spp. **PRODUTORAS DE BIOFLOCULANTES E HIDROLASES  
EXTRACELULARES, ENTRE ESTIRPES DE SOLO/LODO QUE SINTETIZAM  
POLIHIDROXIALCANOATOS E/OU SURFACTANTES**

Maceió - AL

2017

JÉSSICA GUERRA GOUVEIA

*Bacillus* spp. **PRODUTORAS DE BIOFLOCULANTES E HIDROLASES  
EXTRACELULARES, ENTRE ESTIRPES DE SOLO/LODO QUE SINTETIZAM  
POLIHIDROXIALCANOATOS E/OU SURFACTANTES**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Área de concentração: Bioquímica e Biotecnologia).

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Maria Queijeiro López

Coorientadora: Dra. Amanda Lys dos Santos Silva

Maceió-AL

2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

G719b Gouveia, Jéssica Guerra.

*Bacillus spp.* produtoras de biofloculantes e hidrolases extracelulares entre estirpes de solo/lodo que sintetizam polihidroxicanoatos e/ou surfactantes / Jéssica Guerra Gouveia. – 2017.

102 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.

Coorientadora: Amanda Lys dos Santos Silva.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 83-102.

1. *Bacillus spp.* 2. Enzimas hidrolíticas. 3. Biofloculação. 4. Biosurfactante.  
I. Título.

CDU: 543:663.18



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E**  
**BIOTECNOLOGIA**



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **JÉSSICA GUERRA GOUVEIA**, intitulada: **“Bacillus spp. Produtoras de biofloculantes e hidrolases extracelulares, entre estirpes de solo/Iodo que sintetizam polihidroxicanoatos e/ou surfactantes”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 26 de julho de 2017, às 14h, na sala de Reuniões do IQB/UFAL.

**COMISSÃO JULGADORA**

Profa. Dra. Ana Maria Queijeiro Lopez  
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Dr. Amanda Lys dos Santos Silva  
Coorientadora (UFAL)

Prof. Dr. Dimas José da Paz Lima  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte  
(UFAL - Arapiraca)

Dedico este trabalho à Deus e toda minha família.

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, que tem me sustentado e me capacitado, dando-me sabedoria para a realização deste trabalho, pois sem ele nada teria;*

*À Universidade Federal de Alagoas, e ao seu Instituto de Química e Biotecnologia, através do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), pela oportunidade de realizar o mestrado em Ciências, pela infraestrutura física concedida, e todo o conhecimento transmitido pelos diferentes professores desde a graduação;*

*Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos, e a S.A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool, pelo financiamento do projeto;*

*À Prof<sup>ª</sup> Dra. Ana Maria Queijeiro López, pela orientação, paciência, oportunidades propiciadas, pelo apoio, pelos exemplos éticos e ensinamentos transmitidos, o qual tem me proporcionado crescimento tanto profissional quanto humano. Apesar das minhas deficiências e imperfeições, sempre esteve disposta a ajudar e aconselhar, por mais que muitas vezes eu criasse dificuldades para entender tudo o quanto me passava. Obrigada sobretudo por confiar que sou capaz;*

*À Dra. Amanda Lys dos Santos, por ter aceitado me coorientar, por todo apoio, amizade e ensinamentos transmitidos.*

*Não poderia deixar de agradecer à MSc. Elane Cristina Lourenço dos Santos, por toda ajuda, apoio e incentivo para realização deste trabalho, bem como os demais colegas do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo Vegetal e Microbiologia Ambiental (LBPMA), Flávia e Everton, pela convivência, ensinamentos compartilhados e pelos momentos de descontração;*

*Aos colegas de graduação e pós-graduação, Maryana, Carol, Ygor, João e Sarah por todo companheirismo, carinho e amizade ao longo deste tempo;*

*Aos meus pais, Onélio e Angelita que sempre confiaram e me incentivaram nessa jornada, sem vocês jamais teria chegado aqui;*

*Ao meu esposo Eliabi Alves, pelo amor e carinho, pela paciência nos momentos em que estive ausente fazendo experimentos e estudando, pelo apoio e incentivo na conclusão deste trabalho;*

*À minha irmã Orlaine Guerra, pela paciência, companheirismo e carinho;*

*À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.*

***“Eu disse a uma amiga: – A vida sempre super-exigiu de mim.***

***Ela disse: – Lembre-se que você também  
super-exige dela. Sim.”***

*(Clarice Lispector)*

***Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.***

*(Paulo Freire)*



## RESUMO

Enzimas são catalisadores biológicos extremamente atrativos em processos de conversão industrial devido a suas habilidades em promover as reações com alta enantio-seletividade e em condições mais brandas que os químicos, da mesma forma que flocculantes biológicos são vantajosos pela fácil biodegradação e segurança aos seres vivos. Ambos são facilmente obtidos a partir de microrganismos que naturalmente habitem ambientes onde tais moléculas se fazem necessárias para favorecer seu metabolismo. No presente trabalho, foram utilizados quatro isolados bacterianos, dois provenientes de solo de Mata Atlântica (linhagens LBPMA: APF.SG3-Isox e ACO.PR1-Isox), previamente selecionados pela alta tolerância a agroquímicos, e dois de lodo agroindustrial (linhagens LBPMA: BDLJ2 e BDL07) (Coruripe-AL, Brasil), triados por produzirem polihidroxialcanoatos e biosurfactantes. Cada linhagem foi submetida a testes bioquímicos e moleculares com fins de identificação e então, submetidas a testes qualitativos/semi-quantitativos (culturas em meio sólido contendo substrato específico) e quantitativos (culturas submersas contendo substratos específicos) de atividade celulolítica, proteolítica, lipolítica e produtora de bioflocculante. Baseado nas propriedades morfológicas e análises das sequências 16S rDNA, os isolados LBPMA-APF.SG3-Isox, LBPMA-ACO.PR1-Isox, LBPMA-BDLJ2 e LBPMA-BDL07 foram identificados respectivamente como *B. megaterium*, *B. toyonensis*, *B. thuringiensis* e *B. pumilus*, e todos foram capazes de apresentar as atividades estudadas. Os índices máximos para atividade proteásica e lipásica em cultura sólida foram obtidos por *B. toyonensis* (IE= 4,55 e 2,41, respectivamente). Para atividade celulásica máxima, *B. pumilus* foi o isolado mais eficiente em meio sólido (IE=1,40), e em meio líquido, as estirpes de *B. pumilus* e *B. thuringiensis* apresentaram a máxima atividade nas primeiras 48 h. A atividade lipolítica máxima dos três isolados analisados em cultura submersa contendo azeite de oliva como substrato específico (0,274 U. mL<sup>-1</sup> para *Bacillus thuringiensis* LBPMA-BDLJ2, 0,450 U. mL<sup>-1</sup> para *Bacillus pumilus* LBPMA-BDL07 e 0,552 U. mL<sup>-1</sup> para *Bacillus megaterium* LBPMA- APF.SG3), correspondeu também ao máximo crescimento celular às 72 h de incubação. Já em relação à atividade proteolítica em cultura submersa, *B. thuringiensis* apresentou a mesma atividade máxima que *B. pumilus*, porém num período menor de incubação. Todos os isolados secretaram as enzimas investigadas como também bioflocculantes, ambos na temperatura constante de 37 ± 1 °C, sem alterações de pH ao longo do tempo. A atividade flocculante aumentou com o tempo de cultivo, a princípio, chegando ao valor máximo de 57 % às 72 h para as amostras de *B. pumilus*, enquanto para *B. thuringiensis*, *B. toyonensis* e *B. megaterium* foram de 33 %, 21 % e 34 % (respectivamente), após 24 h de incubação. Estes resultados obtidos estimularam a otimização das variáveis pH (3, 5, 7 e 9), fontes de nitrogênio [Uréia, Peptona e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] e carbono (Maltose, Sacarose e Glicose) do meio, para melhoria das taxas de flocculação por tais linhagens do gênero *Bacillus*. A Sacarose e a Maltose apresentaram-se como as melhores fontes de carbono, enquanto Uréia foi a fonte preferencial de nitrogênio para dois dos isolados testados (*B. pumilus* e *B. toyonensis*), seguido de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*B. megaterium*) e Peptona (*B. thuringiensis*). Os melhores valores de pH para a produção de bioflocculante foram 5,0 (*B. toyonensis* e *B. thuringiensis*) e 3,0 (*B. pumilus* e *B. megaterium*). Os espectros de FTIR-ATR dos flocculantes extraídos revelaram a presença dos

grupos funcionais carboxilo, hidroxilo e metoxilo como responsáveis pela atividade floculante das estirpes estudadas, sendo assim caracterizados como polissacarídeos.

**Palavras-chave:** Bactéria. Biofloculação. Enzimas hidrolíticas. Seleção.

## ABSTRACT

Enzymes are extremely attractive biological catalysts in industrial conversion processes due to their ability to promote reactions with high enantioselectivity and in milder conditions than chemicals, as well as biological flocculants are advantageous for easy biodegradation and safety to living beings. Both are easily obtained from microorganisms that naturally inhabit environments where these molecules are necessary to favor their metabolism. In the present work, four bacterial isolates were used, two from the Atlantic Forest but cultivated for 40 years with sugarcane (LBPMA strains: APF.SG3-Isox and ACO.PR1-Isox), previously selected by high tolerance to agrochemicals, and two from agro-industrial sludge (LBPMA: BDLJ2 and BDL07) (Coruripe-AL, Brazil), sorted for producing polyhydroxyalkanoates and biosurfactants. Each lineage was submitted to biochemical and molecular tests for identification purposes and then submitted to qualitative / semi-quantitative tests (cultures in solid medium containing specific substrate) and quantitative (submerged cultures containing specific substrates) of cellulolytic, proteolytic, lipolytic activity and bioflocculant producer. Based on the morphological properties and analyzes of the 16S rDNA sequences, the isolates LBPMA-APF.SG3-Isox, LBPMA-ACO.PR1-Isox, LBPMA-BDLJ2 and LBPMA-BDL07 were identified respectively as *B. megaterium*, *B. toyonensis*, *B. thuringiensis* and *B. pumilus*, and all were able to present the studied activities. The maximum indices for protease and lipase activity in solid culture were obtained by *B. toyonensis* (IE = 4.55 and 2.41, respectively), while the maximum cellulolytic activity in solid medium (IE = 1.40) was obtained by *B. pumilus*. In liquid medium, the strains of *B. pumilus* and *B. thuringiensis* showed the highest cellulolytic activity in the first 48 h. The maximum lipolytic activity of the three isolates analyzed in submerged culture containing olive oil as a specific substrate (0.274 U. mL<sup>-1</sup> for *Bacillus thuringiensis* LBPMA-BDLJ2, 0.450 U. mL<sup>-1</sup> for *Bacillus pumilus* LBPMA-BDL07 and 0.552 U. mL<sup>-1</sup> for *Bacillus megaterium* LBPMA- APF.SG3), also corresponded to the maximum cell growth at 72 h of incubation. Concerning proteolytic activity in submerged culture, *B. thuringiensis* showed the same maximum activity as *B. pumilus*, but in a shorter incubation period. All isolates secreted the tested enzymes and bioflocculant at the constant temperature of 37 ± 1 ° C, without changes in the pH over time. The flocculant activity increased with the incubation time, initially reaching the maximum value of 57% at 72 h for *B. pumilus* culture, while for *B. thuringiensis*, *B. toyonensis* and *B. megaterium* this was 33%, 21% and 34%, respectively, after 24 h of incubation. These initial results stimulate the need for optimization of the pH (3, 5, 7 and 9) and nitrogen [Urea, Peptone and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] and carbon sources (Maltose, Sucrose and Glucose) variables of the medium for flocculation using such strains of the *Bacillus* genus. Sucrose and Maltose were the best sources of carbon, whilst Urea was the preferred source of nitrogen for two of the tested isolates (*B. pumilus* and *B. toyonensis*), followed by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (*B. megaterium*) and Peptone (*B. thuringiensis*). The best pH values for the production of bioflocculant were 5.0 (*B. toyonensis* e *B. thuringiensis*) and 3.0 (*B. pumilus* e *B. megaterium*). The FTIR-ATR spectra of the extracted flocculants revealed the presence of the carboxyl, hydroxyl and methoxy functional groups as responsible for the flocculant activity of the studied strains, thus being characterized as polysaccharides.

**Keywords:** Bacteria. Biofloculation. Hydrolytic enzymes. Screening.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Monômero de poliacrilamida .....	19
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da quitosana .....	19
<b>Figura 3.</b> Estrutura química dos polímeros amilopectina e amilose, para formação do amido .....	20
<b>Figura 4.</b> Precursor biossintético previsto do biofloculante polissacarídeo de <i>Bacillus licheniformis</i> CGMCC 2876.....	25
<b>Figura 5.</b> Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no presente estudo .....	32
<b>Figura 6.</b> Aspecto morfológico do isolado bacteriano BDLJ2, obtido de lodo de estação de tratamento de efluentes da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de produzir biosurfactante/bioplástico. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação, 32 ± 1°C, no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1 µm) .....	44
<b>Figura 7.</b> Aspecto morfológico do isolado bacteriano APF.SG3 Isox, obtido de solo de Mata Atlântica da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de tolerar altas concentrações de três herbicidas. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação, 32 ± 1°C, no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (Aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1 µm).....	44
<b>Figura 8.</b> Aspecto morfológico do isolado bacteriano BDL07, obtido de lodo de estação de tratamento de efluentes da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de produzir biosurfactante/bioplástico. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação, 32 ± 1°C, no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (Aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1 µm).....	45
<b>Figura 9.</b> Aspecto morfológico do isolado bacteriano ACO. PR1 Isox, obtido de solo de Mata Atlântica da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de tolerar altas concentrações de três herbicidas. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação, 32 ± 1°C, no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (Aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1 µm .....	45
<b>Figura 10.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose (1 %) de produtos de PCR ( <i>amplicons</i> ) do gene 16S rRNA: <b>A)</b> dos isolados bacterianos APF. SG3 Isox e ACO. PR1 Isox, obtidos de solo cultivado por 4 décadas com cana de açúcar e selecionado pela tolerância a herbicidas. <b>B)</b> dos isolados bacterianos BDLJ2 e BDL07 obtidos do lodo da ETE da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, selecionados por serem capazes de produzir biosurfactante e bioplástico (M= marcador de peso molecular).....	47

<b>Figura 11.</b> Atividade celulolítica <i>in vitro</i> do isolado de <i>Bacillus pumilus</i> (BDL07) cultivado em ágar-carboximetilcelulose (CMC), por 48 h ( $32 \pm 2$ °C, escuro). A seta indica a mudança de coloração ao redor da colônia bacteriana (halo de descoloração), após revelação com o corante vermelho do Congo 1 %, indicando atividade positiva para produção de celulase. ....	48
<b>Figura 12.</b> Atividade proteolítica <i>in vitro</i> para o isolado de <i>Bacillus pumilus</i> (BDL07) cultivados em meio ágar-gelatina 0,4%, por 48 h ( $32 \pm 2$ °C, escuro). A seta indica a mudança de coloração ao redor da colônia bacteriana (halo rósea), após revelação com o corante vermelho de fenol 2 %, indicando atividade positiva para produção de protease.....	50
<b>Figura 13.</b> Atividade lipolítica <i>in vitro</i> para o isolado de <i>Bacillus toyonensis</i> (ACO. PR1 Isox) cultivados em meio agar-Tween 80 por 48 h, a $32 \pm 2$ °C, no escuro. A seta indica a mudança de coloração ao redor da colônia bacteriana (halo rósea), após revelação com o corante vermelho de fenol 2 %, indicando atividade positiva para produção de lipase.....	52
<b>Figura 14.</b> Atividade celulolítica ( $U.mL^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF.SG3 Isox) e B) <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO.PR1 Isox), em meio contendo carboximetilcelulose (CMC). ....	55
<b>Figura 15.</b> Atividade celulolítica ( $U.mL^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. pumilus</i> (LBPMA-BDL07) e B) <i>B. thuringiensis</i> (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo carboximetilcelulose (CMC). ....	56
<b>Figura 16.</b> Atividade proteolítica ( $U.mL^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo caseína como substrato.....	59
<b>Figura 17.</b> Atividade proteolítica ( $U.mL^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. pumilus</i> (LBPMA-BDL07) e B) <i>B. thuringiensis</i> (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo caseína como substrato.....	60
<b>Figura 18.</b> Atividade lipolítica ( $U.mL^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo azeite de oliva .....	62
<b>Figura 19.</b> Atividade lipolítica ( $U.mL^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. pumilus</i> (LBPMA-BDL07) e B) <i>B. thuringiensis</i> (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo azeite de oliva.....	63
<b>Figura 20.</b> Atividade biofloculante (%), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo glicose e avaliado com suspensão de caolim .....	65
<b>Figura 21.</b> Atividade biofloculante (%), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo glicose e avaliado com suspensão de caolim .....	66
<b>Figura 22.</b> Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) durante 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox).....	69
<b>Figura 23.</b> Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) durante 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox) .....	70

<b>Figura 24.</b> Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) após 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de <i>B. pumilus</i> (LBPMA- BDL07).....	71
<b>Figura 25.</b> Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) após 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de <i>B. thuringiensis</i> (LBPMA- BDL07).....	72
<b>Figura 26.</b> Efeito das fontes de nitrogênio sobre: A) produção de biofloculante (%) e B) massa seca (mg) após 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) dos isolados de: <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox); <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox); <i>B. pumilus</i> (LBPMA- BDL07) e <i>B. thuringiensis</i> (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo as melhores fontes de carbono e pH .....	75
<b>Figura 27.</b> Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) dos biofloculantes produzidos, após 72 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) dos isolados de: A) <i>B. megaterium</i> (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) <i>B. toyonensis</i> (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio para produção de biofloculante .....	78
<b>Figura 28.</b> Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) dos biofloculantes produzidos, após 72 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) dos isolados de: A) <i>B. pumilus</i> (LBPMA-BDL07) e B) <i>B. thuringiensis</i> (LBPMA-BDLJ2), em meio para produção de biofloculante .....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Microrganismos produtores de biofloculantes e sua composição química.....	22
<b>Tabela 2.</b> Aplicações utilizando biofloculantes e suas origens.....	23
<b>Tabela 3.</b> Aspectos morfo-bioquímicos de quatro isolados bacterianos provenientes ou de argissolo amarelo distrófico, com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar, ou de lodo de estação de tratamento de efluentes da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe-Alagoas, Brasil), e capazes respectivamente de tolerar altas concentrações de três herbicidas (APF. SG3 Isox, ACO. PR1 Isox) ou de produzir biosurfactante/bioplástico (BDLJ2 e BDL07) .....	43
<b>Tabela 4.</b> Diâmetros dos halos de hidrólise da CMCase e das colônias das estirpes de <i>Bacillus</i> spp. estudadas, cultivadas em meio ágar- carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, após 48 h de incubação em estufa BOD ( $32 \pm 2$ °C, no escuro), e cálculo do índice de atividade enzimática (IE).....	49
<b>Tabela 5.</b> Diâmetros dos halos de hidrólise de gelatina e das colônias das estirpes de <i>Bacillus</i> spp. estudadas, cultivadas em meio ágar- gelatina como única fonte de carbono, após 48 h de incubação em estufa BOD ( $32 \pm 2$ °C, no escuro), e cálculo do índice de atividade enzimática (IE).....	51
<b>Tabela 6.</b> Diâmetros dos halos de hidrólise de lipídio das colônias das estirpes de <i>Bacillus</i> spp. estudadas, cultivadas em meio ágar-Tween 80 como única fonte de carbono, após 48 h de incubação em estufa BOD ( $32 \pm 2$ °C, no escuro), e cálculo do índice de atividade enzimática (IE).....	53
<b>Tabela 7.</b> Razão da atividade floculante pelo crescimento celular, para os isolados de <i>Bacillus</i> spp. testados após 24 h de incubação (160 rpm a 37 °C, no escuro) .....	74
<b>Tabela 8.</b> Comparação dos valores de atividade floculante utilizando diferentes fontes de nitrogênio, para os isolados de: <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. toyonensis</i> e <i>B. thuringiensis</i> , após 24 h de incubação (160 rpm a 37 °C, no escuro).....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÔNIMOS E SIGLAS

- AF** – Atividade flocculante
- AN** – Ágar Nutriente
- CMC**- Carboximetilcelulose
- CMCase**- Carboximetilcelulase
- CONOMA** - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DNSA** - Ácido dinitrosalicílico
- DQO** – Demanda Química de Oxigênio
- ETE** – Estação de Tratamento de Efluentes
- FTIR** – Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier
- IE**- Índice de atividade enzimática
- IQB** – Instituto de Química e Biotecnologia
- KEGG** – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- LBPMA** – Laboratório de Bioquímica do Parasitismos e Microbiologia Ambiental
- MAC** – Máxima Atividade Celulásica
- MAF**- Máxima Atividade Flocculante
- MAL** – Máxima Atividade Lipolítica
- MAP** – Máxima Atividade Proteásica
- NCBI** - *National Center for Biotechnological Information*
- OD** – Densidade Óptica
- PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- pNPP**- palmitato de *p*-nitrofenila
- rRNA** – Ácido Ribonucleico Ribossomal
- TCA**- Ácido Tricloroacético
- UFAL** – Universidade Federal de Alagoas
- UV** - Ultravioleta
- 16S rRNA** – segmento do RNA que codifica a subunidade ribossomal 16S

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo Geral .....	17
2.2	Objetivos Específicos .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>18</b>
3.1	Floculantes Inorgânicos, Orgânicos Sintéticos ou Naturais e Biofloculantes .....	18
3.1.1	Biossíntese da principal classe de biofloculante.....	24
3.1.2	Fatores que influenciam a produção tecnológica de biofloculante.....	26
3.2	Enzimas de origem microbiana para aplicações industriais .....	27
3.2.1	Celulasas .....	28
3.2.2	Proteases .....	29
3.2.3	Lipases .....	29
3.3	Produtores de Biofloculantes e Enzimas Extracelulares – o Gênero <i>Bacillus</i> .....	30
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>32</b>
4.1	Bactérias Estudadas .....	32
4.2	Características morfo-cultural e bioquímica dos isolados estudados .....	33
4.2.1	Aspectos morfológicos .....	33
4.2.2	Identificação bioquímica e molecular dos isolados previamente selecionados.....	33
4.3	Cultivo em meio sólido: triagem de isolados com atividades celulolítica, lipolítica ou proteásica .....	36
4.3.1	Preparo do inóculo para os testes em meio sólido .....	36
4.3.2	Atividade celulolítica.....	37
4.3.3	Atividade proteolítica .....	37
4.3.4	Atividade lipolítica .....	37
4.3.5	Índice enzimático.....	37
4.4	Cultivo submerso: avaliação das atividades enzimáticas e produção de biofloculante conforme crescimento no decurso do tempo .....	38
4.4.1	Determinação do pH e massa seca ao longo do tempo.....	39
4.4.2	Determinação quantitativa da atividade celulolítica.....	39
4.4.3	Determinação quantitativa da atividade proteásica .....	39
4.4.4	Determinação quantitativa da atividade lipolítica .....	40
4.4.5	Avaliação da atividade biofloculante.....	40
4.5	Otimização dos componentes do meio de cultivo para produção de biofloculante.....	41



4.5.1	Efeito da fonte de carbono sobre atividade biofloculante .....	41
4.5.2	Efeito da fonte de nitrogênio sobre atividade biofloculante .....	41
4.5.3	Efeito do pH sobre atividade biofloculante .....	41
4.6	Extração e purificação do biofloculante produzido .....	41
4.7	Caracterização do biofloculante produzido .....	42
4.8	Análise Estatística.....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1	Identificação bioquímica e molecular das bactérias isoladas .....	43
5.2	Seleção dos isolados de <i>Bacillus</i> capazes de secretar celulases, lipases ou proteases em meio sólido.....	48
5.2.1	Atividade celulolítica.....	48
5.2.2	Atividade proteolítica .....	50
5.2.3	Atividade lipolítica .....	52
5.3	Determinação quantitativa da produção de enzimas extracelulares e/ou biofloculante	53
5.3.1	Determinação quantitativa da atividade celulolítica.....	53
5.3.2	Determinação quantitativa da atividade proteolítica .....	57
5.3.3	Determinação quantitativa da atividade lipolítica .....	61
5.3.4	Avaliação da atividade biofloculante.....	64
5.4	Otimização dos componentes do meio de cultivo para produção de biofloculante.....	68
5.4.1	Efeito da fonte de carbono sobre atividade biofloculante .....	68
5.4.2	Efeito da fonte de nitrogênio sobre atividade biofloculante .....	73
5.5	Caracterização do biofloculante produzido .....	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A diversidade biológica é um importante recurso com potencial para o desenvolvimento de ferramentas sustentáveis para gestão de ecossistemas e oportunidades de bioprospecção. Apesar do reconhecimento, a diversidade microbiana brasileira é considerada como amplamente desconhecida em relação a outros grupos, como os animais e as plantas (PYLRO *et al.*, 2013). Nesse sentido, há um vasto campo propício à descoberta e a utilização biotecnológica de novas espécies que habitam ambientes naturais ou manejados (MANFIO, 2003; PERES *et al.*, 2011). O grande desafio para o uso racional da biodiversidade brasileira é, sem dúvida, como transformar um enorme patrimônio genético natural em riqueza biotecnológica (PYLRO *et al.*, 2013).

Os processos biotecnológicos têm conquistado um lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos químicos convencionais (MACIEL, 2006). As enzimas, por exemplo, são amplamente utilizadas por apresentarem potenciais biotecnológicos e industriais, sendo que a maioria das enzimas empregadas nesses processos pertence ao grupo das hidrolases. Dentre as enzimas utilizadas nos diversos setores industriais, as microbianas correspondem a 95% daquelas comercializadas (BÖTTCHER *et al.*, 2010) para eventos como o tratamento de efluentes, química fina e produção de biocombustíveis (CARVALHO *et al.*, 2005; SOETAERT & VANDAMME, 2006).

O gênero *Bacillus* é um dos que mais contribui nesse quesito, gerando, por exemplo, enzimas que são utilizadas na fabricação de detergentes e polpa de papel, além de biosurfactantes, polihidroxicarboxilatos (bioplásticos) e biofloculantes. Suas espécies são facilmente cultivadas em diferentes condições de laboratório, sendo capazes também de inibir outros microrganismos, o que serve de estímulo para o isolamento de estirpes que expressem bioprodutos adaptados a uma variedade de ambientes, os quais são específicos de certos processos industriais (BARROS *et al.*, 2013; MARTINS & HATTI-KAUL, 2002).

Por outro lado, com o aumento da atividade industrial, a quantidade de efluentes gerados – os quais em sua maioria, não são tratados ou não recebem o tratamento adequado, aumentando o impacto ambiental – tornou-se um preocupante problema ambiental. Para controlar essa situação, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), pela resolução nº 430 de 13 de maio de 2011, estabeleceu condições de lançamento em corpos hídricos para efluentes de qualquer fonte poluidora, o que acarretou na crescente utilização de floculantes para o tratamento de águas residuárias (CONAMA, 2011).

Floculantes são produtos químicos que estimulam a agregação de colóides e outras partículas em suspensão, formando um floco (IUPAC, 1997). São amplamente aplicados em vários processos industriais, incluindo o tratamento de águas residuais, processamento a jusante, e os processos de alimentos e fermentação (MABINYA *et al.*, 201; NAKATA e KURANE, 1999; SALEHIZADEH & SHOJAOSADATI, 2001). Embora floculantes químicos tenham sido amplamente utilizados, devido à sua atividade de floculação eficaz e baixo custo, esses possuem propriedades cancerígenas neurotóxicas fortes, perigosos para o ambiente e para saúde humana (MOUSSAS & ZOUBOULIS, 2009).

Os biofloculantes, por sua vez, são metabólitos secundários produzidos durante o crescimento de microrganismos, predominantemente formados por alguns polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Entre essas macromoléculas, os biofloculantes polissacarídeos têm atraído atenção devido às suas altas taxas de floculação na remoção de diferentes tipos de metais pesados, de células e de recuperação de biomassa e tratamento de águas residuárias. Segundo Okaiyeto *et al.* (2015), há biofloculantes produzidos por bactérias, fungos e algas isolados a partir de lodo ativado, solos e água. Além disso, a utilização de floculantes microbianos tem sido promovida devido à sua biodegradabilidade e à sua natureza ambientalmente inerte (LI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010).

O Brasil ainda carece de trabalhos relacionados a produção de floculantes a partir de microrganismos, de modo que selecionar bactérias capazes de produzi-los, bem como de secretar enzimas utilizadas em biodegradação, torna-se uma contribuição para área. Desta forma, organismos que podem expressar mais de um subproduto e/ou classe de enzimas, como biosurfactantes, bioplásticos, biofloculantes e, por exemplo, celulasas, proteases e lipases, diante de diferentes substratos, apresentam grande potencial biotecnológico.

Diante do exposto, o propósito deste trabalho foi avaliar, entre isolados bacterianos provenientes de solo (linhagens LBPMA: APF SG3 Isox e ACO PR1 Isox) e lodo agroindustrial (linhagens LBPMA: BDLJ2 e BDL07) (Coruripe-AL, Brasil), previamente investigados acerca respectivamente da tolerância a agroquímicos e produção de polihidroxialcanoatos/biosurfactantes, sua capacidade em produzir enzimas extracelulares e/ou biofloculantes de interesse industrial.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar quatro linhagens bacterianas – duas isoladas de solo de Mata Atlântica e com tolerância a agroquímicos e duas isoladas de lodo da Estação de Tratamento de Efluentes (ETE) da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe, AL), com capacidade biosurfactante e/ou acumuladora de bioplásticos – e selecionar aquelas com atividades enzimáticas e/ou biofloculante, quantificando tais atividades e otimizando as condições de produção dos possíveis biofloculantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Selecionar linhagens bacterianas, dentre isolados de solo e lodo, aquelas capazes de expressar atividades lipolítica, proteolítica e celulolítica em meio sólido e produzir biofloculante em meio líquido;
- Identificar, através de técnicas morfo-bioquímicas e de biologia molecular, os isolados bacterianos selecionados;
- Avaliar em cultura submersa a cinética de crescimento (biomassa seca), pH e atividades celulolítica, proteolítica, lipolítica e/ou biofloculante dos microrganismos selecionados, utilizando meio de cultivo propício para sua produção;
- Avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio do meio de cultura, a fim de otimizar as condições de cultivo originalmente utilizada para produção de biofloculante pelas estirpes selecionadas;
- Caracterizar os biofloculantes produzidos pelas estirpes selecionadas, por meio da técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

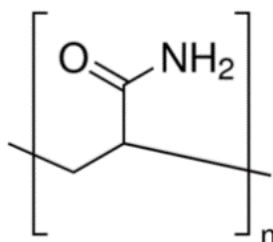
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Floculantes Inorgânicos, Orgânicos Sintéticos ou Naturais e Biofloculantes

Floculantes são substâncias que proporcionam a separação (suspensão/dispersão e agregação) de partículas (flocos) num meio líquido, de forma a tornar a sedimentação e clarificação mais rápidas (SHARMA *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2014). São utilizados principalmente no tratamento de águas residuais domésticas ou industriais, e foram desenvolvidos e comercializados para a melhoria de parâmetros ambientais importantes, tais como sólidos suspensos e dissolvidos, turbidez, demanda química de oxigênio (DQO) e cor (LEE, ROBINSON & CHONG, 2014). Os floculantes podem ser classificados como inorgânicos ou orgânicos, sendo que esses últimos têm sido utilizados no tratamento de efluentes devido a sua inércia natural às mudanças de pH, alta eficiência com baixa dosagem e fácil manuseio (SINGH *et al.*, 2000).

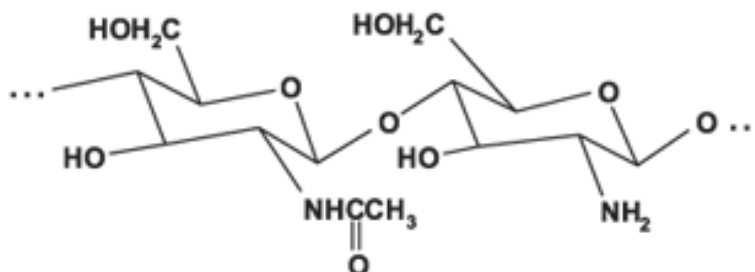
**Floculantes inorgânicos**, como sais de metais multivalentes (alumínio, ferro, etc.), são comumente usados devido ao seu baixo custo, facilidade de uso e disponibilidade. No entanto, a sua utilização foi reduzida e controlada devido a algumas desvantagens, tais como a necessidade de utilização de grande quantidade para uma floculação eficiente e elevada sensibilidade a variações de pH. Além disso, o floculante inorgânico é aplicável a apenas alguns sistemas dispersos e é ineficiente para partículas muito finas (SHARMA *et al.*, 2006), além de acarretar o acúmulo do metal utilizado na água tratada, com implicações para a saúde humana e para o meio ambiente (RENAULT *et al.*, 2009).

Os **floculantes orgânicos sintéticos** são na sua maioria polímeros lineares solúveis em água, derivados de materiais à base de hidrocarbonetos (petróleo) e não renováveis (SUOPAJÄRVI *et al.*, 2013). Seus monômeros podem ser acrilamida, ácido acrílico, cloreto de dialildimetil amônio, ácido estireno sulfônico, etc. (SINGH *et al.*, 2000). Aqueles a base de poliacrilamida (**Figura 1**) tornaram-se muito importantes no tratamento de águas residuais devido à sua maior vantagem de flocular mesmo quando adicionados em pequenas quantidades (SHARMA *et al.*, 2006).

**Figura 1-** Monômero de poliacrilamida. **Fonte:** SigmaAldrich, 2016.

No entanto, os monômeros de poliacrilamida têm fortes propriedades cancerígenas e neurotóxicas, que causam danos tanto para o meio ambiente quanto para os seres humanos (MOUSSAS & ZOUBOULIS, 2009). Assim, com a crescente conscientização de possíveis danos causados por floculantes químicos e implementação de regulamentações ambientais mais rigorosas, alguns países (por exemplo, Japão, Suíça e França) começaram a controlar estritamente seu uso no tratamento de água potável e processamento de alimentos (KWON *et al.*, 1996; BOLTO & GREGORY, 2007; LU *et al.*, 2014), além de desenvolverem floculantes mais inofensivos, eficientes e favoráveis ao ambiente para remoção de turbidez em águas superficiais e efluentes.

Floculantes **orgânicos naturais** são baseados em polímeros naturais animais ou vegetais, como quitosana, amido, celulose, gomas naturais, mucilagem e etc. Estudos de suas propriedades de floculação no tratamento de águas residuais têm sido conduzidos por apresentarem comportamento ambientalmente amigável quando comparados com os floculantes químicos convencionais (RENAULT *et al.*, 2009). A quitosana (amino-polissacarídeo), por exemplo, possui uma estrutura rígida contendo unidades de glucosamina e acetilglucosamina (**Figura 2**).

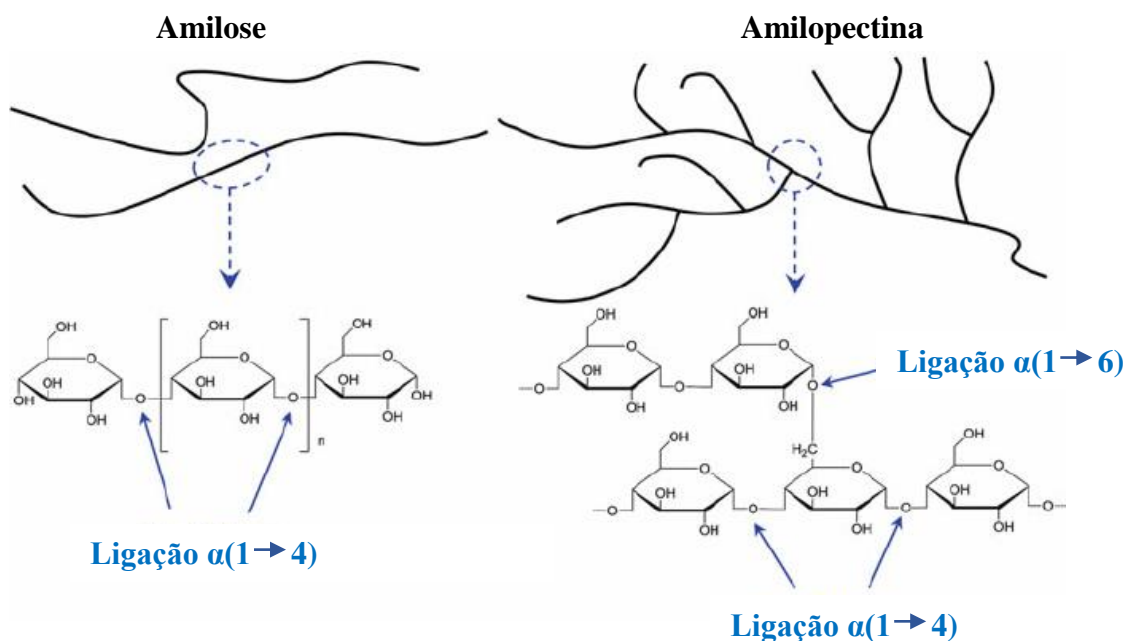
**Figura 2-** Estrutura química da quitosana. **Fonte:** LARANJEIRA *et al.* (2009).

Essa molécula é insolúvel em água ou em solventes orgânicos, mas solúvel em ácidos orgânicos diluídos (RENAULT *et al.*, 2009; SZYGULA *et al.*, 2009). Em pH ácido (~ pH 5), a quitosana torna-se um polímero catiônico solúvel com elevada densidade de carga (RINAUDO,

2006). Este tem sido aplicado nas últimas décadas nos processos de tratamento de água para a remoção de suspensões inorgânicas ou orgânicas (RENAULT *et al.*, 2009).

O amido (**Figura 3**), por sua vez, é outro polissacarídeo floculante, apesar da baixa eficiência, sendo por isso geralmente modificado para ampliar seu poder floculante em águas residuais (ZHANG *et al.*, 2004; XING *et al.*, 2005) e na fabricação de papel (MERRETTE *et al.*, 2005).

**Figura 3-** Estrutura química dos polímeros amilopectina e amilose, para formação do amido. **Fonte:** Reocities, 2016.



As gomas naturais podem ser definidas genericamente como substâncias poliméricas que, em solvente ou agente de inchamento apropriado e mesmo a baixas concentrações, são capazes de formar dispersões ou soluções altamente viscosas ou até mesmo géis. Com essa definição, o termo aplica-se a uma vasta variedade de substâncias, incluindo hidrocarbonetos de alto peso molecular, borrachas, proteínas, polissacarídeos e seus derivados, além de alguns polímeros sintéticos (BE MILLER, 1987). Esse grupo tem sido estudado extensivamente como floculantes eficazes sobre uma ampla gama de pH e forças iônicas no tratamento de águas residuais de várias indústrias (TRIPATHY & DE, 2006), devido a seu processo de produção e aplicação serem benéficos ao homem e ecossistemas (LEE *et al.*, 2014).

Já os taninos são compostos polifenólicos aniônicos biodegradáveis (ÖZACAR & SENGIL, 2000) provenientes do metabolismo secundário de órgãos vegetais como casca, frutos e folhas (HEREDIA & MARTÍN, 2009) com diversas aplicações (precipitantes de proteínas, antioxidantes, pró-oxidantes, toxinas a herbívoros, etc.) (BARBEHENN & CONSTABEL,

2011). Existem vantagens na utilização de taninos como floculantes, tais como a capacidade de adsorção de metais dissolvidos em água e eliminação (ou pelo menos a diminuição) da toxicidade do meio. Além disso, possuem geralmente pKa de 2,5 e atuam numa faixa de pH de 4,5 a 8. Agem neutralizando as cargas e formando pontes entre essas partículas, originando os flocos (MACÊDO, 2004).

No entanto, apesar das vantagens do uso de floculantes naturais de origem animal ou vegetal, essa categoria possui curta vida útil e eficiência moderada (MISHRA *et al.*, 2012). Nesse contexto, os **floculantes provenientes de microrganismos (biofloculantes)**, isto é, metabólitos secundários seguros, biodegradáveis, secretados extracelularmente durante o crescimento destes, emergiram como materiais alternativos promissores para substituir os floculantes convencionais (JANG *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2002), especialmente em países em desenvolvimento, que dificilmente podem arcar com os altos custos de produtos químicos importados para tratamento de água e esgoto. Pertencem predominantemente às classes de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (FLEMMING & WINGENDER, 2010) sendo que os polissacarídicos despertaram muito interesse por suas altas taxas de floculação ( $\cong$  80-90 %) e remoção de diferentes tipos de metais pesados e células, atuando bem na recuperação de biomassa em processos biotecnológicos e no tratamento de resíduos e água potável (LIN & HARICHUND, 2011; ZHAO, LIU & ZHOU, 2013).

Li *et al.* (2008), Kumari *et al.* (2014) e Okaiyeto *et al.* (2016) observaram que a maioria dos biofloculantes documentados na literatura são exopolissacarídeos (EPS) e glicoproteínas de bactérias isoladas de solo, lodo ou águas residuais ou, ainda, sedimentos marinhos, cuja função é proteger a parede celular de condições ambientais adversas, tais como alta pressão osmótica, tensão de oxigênio, temperatura e compostos tóxicos (NWODO *et al.*, 2012). A produção em larga escala de biofloculantes depende unicamente da possibilidade de cultivar microrganismos capazes de sintetizá-los em diferentes meios, além de sua extração (SALEHIZADEH & SHOJAOSADATI, 2003).

Como se observa na **Tabela 1**, a produção de biofloculantes ricos em polissacarídeos não é exclusiva de uma espécie, e é possível que estirpes da mesma espécie segreguem diversos tipos de polissacarídeos com diferentes funções biológicas (SATHIYANARAYANAN *et al.*, 2013). Os polissacarídeos possuem grupos hidroxilo, com uma extremidade redutora hemiacetal, bem como outras funcionalidades que desempenham papéis essenciais em reações de redução (MATA *et al.*, 2009).



**Tabela 1-** Microrganismos produtores de biofloculantes e sua composição química. Fonte: Adaptado de Okaiyeto *et al.*, 2016.

<b>Microrganismos</b>	<b>Local isolado</b>	<b>Composição química</b>	<b>Referências</b>
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	Solo	Polissacarídeo	Tang <i>et al.</i> , 2014 <sup>a</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Solo	Glicoproteína	Lu <i>et al.</i> , 2005
<i>Oceanobacillus sp.</i> Pinky	Marinho	Glicoproteína	Cosa <i>et al.</i> , 2013 <sup>a</sup>
<i>Chryseobacterium daeguense</i> W6	Lodo de retrolavagem	Glicoproteína	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BY-28	Solo	Glicoproteína	Gong <i>et al.</i> , 2003
<i>Virgibacillus sp.</i>	Marinho	Polissacarídeo	Cosa <i>et al.</i> , 2013 <sup>b</sup>
<i>Solibacillus silvestres</i>	Marinho	Glicoproteína	Wan <i>et al.</i> , 2013
<i>Klebsiella sp.</i>	Lodo ativado	Polissacarídeo	Yang <i>et al.</i> , 2012
<i>Klebsiella mobilis</i>	Solo	Polissacarídeo	Wang <i>et al.</i> , 2007 <sup>a,b</sup>
<i>Aeromonas sp.</i>	Lodo ativado	Polissacarídeo	Li <i>et al.</i> , 2007
<i>Serratia ficaria</i>	Solo	Polissacarídeo	Gong <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus elgii</i> B69	Solo	Polissacarídeo	Li <i>et al.</i> , 2013
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Lodo ativado	Glicoproteína	Peng <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus licheniformis</i>	Meio LB contaminado	Polissacarídeo	Xiong <i>et al.</i> , 2010
<i>Halomonas sp.</i>	Sedimento marinho	Polissacarídeo	Mabinya <i>et al.</i> , 2011
<i>Klebsiella sp.</i> TG-1	Águas residuárias	Glicoproteína	Liu <i>et al.</i> , 2013
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Saliva humana	Glicoproteína	Luo <i>et al.</i> , 2014
<i>Methylobacterium sp.</i>	Água doce	Glicoproteína	Ntsaluba <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus licheniformis</i> X14	Solo	Glicoproteína	Li <i>et al.</i> , 2009
<i>Aeromonas sp.</i>	Lodo ativado	Polissacarídeo	Li <i>et al.</i> , 2008
<i>Brachybacterium sp.</i>	Água doce	Glicoproteína	Nwodo <i>et al.</i> , 2013
<i>Microcoleus sp.</i>	Marinho -Salinas	Polissacarídeo	Chen <i>et al.</i> , 2011 <sup>a</sup>
<i>Lyngbya sp.</i>	Marinho -Salinas	Polissacarídeo	Chen <i>et al.</i> , 2011 <sup>b</sup>
<i>Bacillus licheniformis</i>	Meio LB contaminado	Polissacarídeo	Chen <i>et al.</i> , 2016

As aplicações práticas de biofloculantes em indústrias, no entanto, até agora têm sido limitadas devido ao seu alto custo de produção e necessidade de utilização de altas dosagens para melhor eficiência (NIE *et al.*, 2011). Assim, muitos pesquisadores (**Tabela 2**) estão estudando o uso de biofloculantes com finalidade industrial – em face dos problemas de saúde causados por floculantes químicos – e também buscando aprimorar o cultivo de microrganismos para que a obtenção do biofloculante se torne menos oneroso (NIE *et al.*, 2011; ZHI *et al.*, 2010).

**Tabela 2-** Aplicações utilizando biofloculantes e suas origens. **Fonte:** Adaptado (Okaiyeto *et al.*, 2016; Agunbiade *et al.*, 2016).

Aplicações	Microrganismos	Observações	Referências
Recuperação de biomassa e remoção de patógenos	<i>Klebsiella terrigena</i>	Remove <i>Salmonella</i> sp.	Ghosh <i>et al.</i> , 2009
	<i>Solibacillus silvestris</i> W01	Colheita de <i>Nannochloropsis oceânica</i>	Wan <i>et al.</i> , 2013
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Remove cistos de <i>Acanthamoeba</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2013
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> AM49	Remove <i>Scenedesmus</i> sp.	Kim <i>et al.</i> , 2011
Decoloração	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Remove soluções de corantes dispersos	Peng <i>et al.</i> , 2014
	<i>Serratia ficaria</i>	Decolorização de efluente da polpa	Gong <i>et al.</i> , 2008
	<i>Chryseomonas luteola</i>	Decoloração das águas residuais	Syafalni <i>et al.</i> , 2012
	<i>Klebsiella</i> sp.	Remove sulfametoxazol	Xing <i>et al.</i> , 2013
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Decolorização de águas residuais do melaço	He <i>et al.</i> , 2004
Purificação de água	<i>Paenibacillus elgii</i> B69	Tratamento real de águas residuais	Li <i>et al.</i> , 2013
	<i>Paenibacillus mucilaginosus</i> G1M16	Tratamento de efluente do moinho de papel	Tang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Chlorella</i> sp. e <i>Micratinium</i> sp.	Águas residuais industriais	Wang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Aspergillus niger</i>	Tratamento de água do rio	Aljuboori <i>et al.</i> , 2013
Remoção de metais pesados	<i>Bacillus firmus</i>	Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , e Zn <sup>2+</sup>	Salehizadeh & Shojaosadati, 2003
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IASST201	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cr <sup>2+</sup> e Mn <sup>2+</sup>	Pathak <i>et al.</i> , 2014
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> BM07	Hg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> e Co <sup>2+</sup>	Noghabi <i>et al.</i> , 2007
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Pb <sup>2+</sup>	Guo & Yu, 2014

Portanto, tornou-se imperativo identificar e pesquisar novos microrganismos produtores de biofloculantes e otimizar as condições de fermentação para melhorar os rendimentos e custo de produção do biofloculante (OKAIYETO *et al.*, 2013). Para isso, se faz necessário a utilização de substratos rentáveis, como, por exemplo, resíduos agrícolas. Além disso, é importante fazer estudos que assegurem as propriedades e qualidade do biofloculante produzido em resíduos agrícolas. Isto reduzirá razoavelmente o custo de produção e incentivará sua produção e aplicação em larga escala (OKAIYETO *et al.*, 2016).

### 3.1.1 Biossíntese da principal classe de biofloculante

Li *et al.* (2008) observaram que a maioria dos biofloculantes documentados na literatura são exopolissacarídeos (EPS) secretados por microrganismos isolados do solo ou de lodo de esgoto. EPS são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias, os quais são encontrados ligados à superfície das células de forma firme (EPS de revestimento) ou fraca (EPS de limo) (ANNA *et al.*, 2006; SHENG *et al.*, 2010). Essas moléculas são capazes de proteger a parede celular contra compostos tóxicos e condições ambientais adversas, tais como alta pressão osmótica, tensão de oxigênio, temperatura; e também podem ser excretados para o meio extracelular, sendo responsáveis também pela adesão entre as células (LI & YANG, 2007; SHENG *et al.*, 2010).

Além disso, podem contribuir para a absorção de íons metálicos, bem como evitar a desidratação sob certas condições ambientais (NICHOLS *et al.*, 2005), sendo os constituintes mais importantes dos agregados biológicos responsáveis pela degradação da matéria orgânica no tratamento de águas residuais, que inclui também biofilmes e lodos ativados. Esses promovem o desenvolvimento de bioflocos, alterando a relação entre agregados microbianos, diferentes estirpes bacterianas, bem como partículas orgânicas e inorgânicas (MARTÍN-CERECEDA *et al.*, 2001).

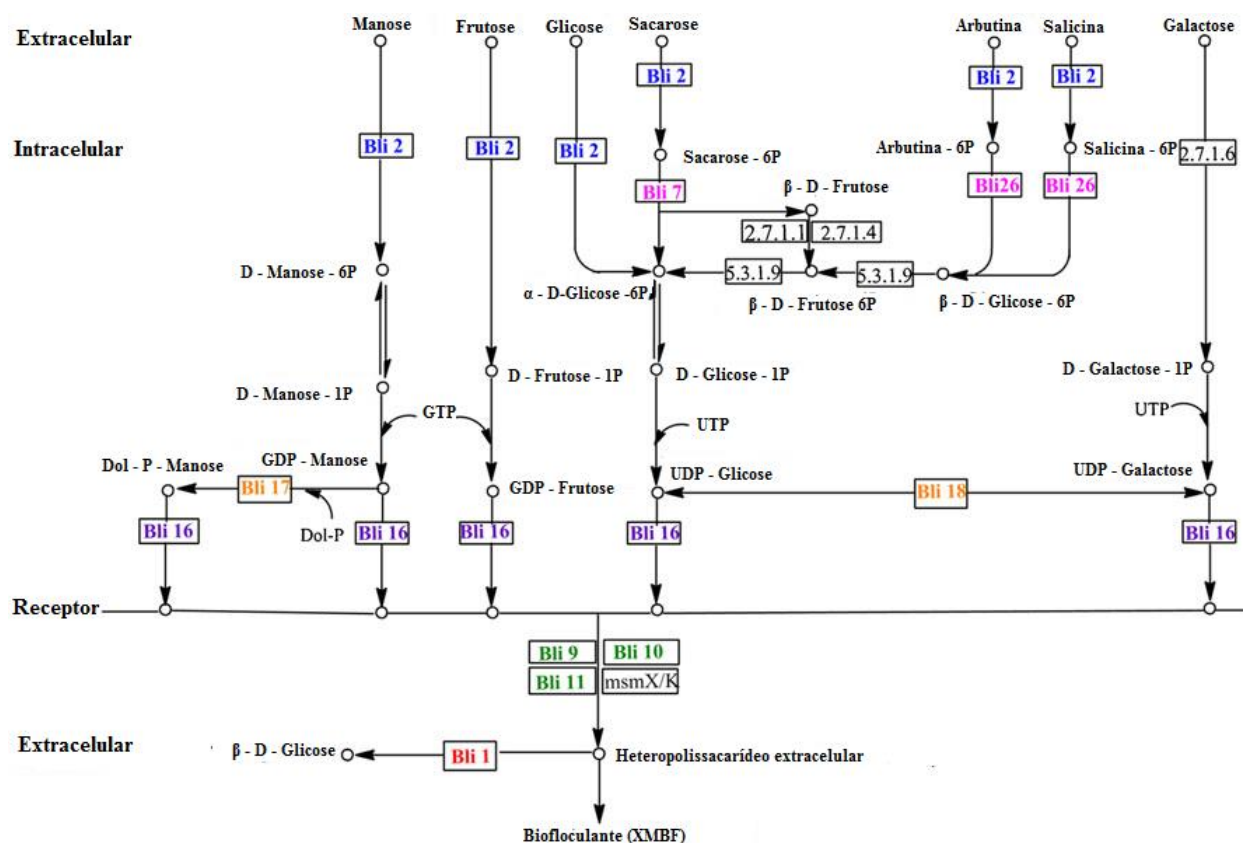
Os EPS são geralmente de natureza complexa e heterogênea, cujos constituintes e localização podem ser dependentes de vários processos metabólicos, como secreção ativa, alterações na fase de crescimento, quebra de células devido à morte celular, liberação de macromoléculas de superfície celular (proteínas de membrana externa e lipopolissacarídeos) e sua interação com o ambiente (CRISTINA *et al.*, 2011).

Os exopolissacarídeos produzidos por microrganismos são divididos em dois grupos: heteropolissacarídeos e homopolissacarídeos (DONOT *et al.*, 2012). Contudo, a biossíntese de

heteropolissacarídeos é mais complexa. A xantana, um dos heteropolissacarídeos mais estudados, requer glicídeos-nucleotídicos (UDP-glicose, UDP-glicuronato e GDP manose) a partir dos quais são construídas unidades repetidas de xantana, assim como enzimas, tais como polimerase e transferase (ROSALAM & INGLATERRA, 2006).

Os EPS das bactérias estabelecem um modelo importante de sistemas para o estudo da agregação e secreção molecular, regulação gênica, interações célula-célula, simbiose e patogenicidade (OTOBONI, 2007). Uma via de biossíntese foi proposta por Yan *et al.* (2013) utilizando as identidades de aminoácidos das enzimas determinadas pelo programa KEGG (**Figura 4**), que poderiam ser responsáveis pela produção do biofloculante polissacarídico de *B. licheniformis* CGMCC 2876.

**Figura 4-** Precursor biossintético previsto do biofloculante polissacarídico de *B. licheniformis* CGMCC 2876. **Fonte:** Adaptado de YAN *et al.* (2013).



Legenda: Bli 1, beta-glicosidase (EC 3.2.1.21); Bli 2, glicose fosfotransferase (EC 2.7.1.69); Bli 7, beta-frutofuranosidase (EC 3.2.1.26); Bli 9 e Bli 10, proteínas de permease do sistema de transporte de glicídeos; Bli 11, proteína de ligação ao substrato; MsmX ou msmK, proteína de ligação a ATP; Bli 16, glicosiltransferase (EC 2.4.X. Y); Bli 17, Dol-P-Man sintase (EC 2.4.1.83); Bli 18, UDP-glicose 4- epimerase (EC 5.1.3.2); Bli 26, beta-glucosidase-6P (EC 3.2.1.86); EC 2.7.1.6, galactoquinase; EC 5.3.1.9, glicose-6P isomerase; EC 2.1.7.4, frutoquinase; EC 2.7.1.1, hexoquinase.

Embora as vias sintéticas da maioria dos EPS ainda não tenham sido elucidadas claramente, a biossíntese de polissacáridos pode ser dividida em três etapas principais: (1) assimilação de glicídeos simples e conversão em derivados de nucleótidos; (2) montagem de subunidades ligadas a um transportador de lípídeos, e (3) polimerização e secreção para o ambiente extracelular (YAN *et al.*, 2013).

### 3.1.2 Fatores que influenciam a produção tecnológica de biofloculante

A produção tecnológica de biofloculantes, como de qualquer metabólito microbiano, é bastante influenciada pela composição do meio de cultura e por vários outros parâmetros físico-químicos, tais como pH inicial do meio de produção, fontes de carbono (GOO *et al.*, 2013), e de nitrogênio (SALEHIZADEH & YAN, 2014), força iônica, íons metálicos, concentração do inóculo, tempo e temperatura (LI *et al.*, 2009) de incubação, e velocidade de agitação (HE *et al.*, 2004; SHENG *et al.*, 2006; ABDEL-AZIZ *et al.* 2011; FANG *et al.*, 2013).

O pH inicial do meio de fermentação é importante para produção e também a eficiência do biofloculante (ZHENG *et al.*, 2008), determinando a eletrificação das células e o potencial de oxidação-redução que influencia na absorção de nutrientes e reações enzimáticas (SALEHIZADEH & SHOJAOSADATI, 2001). A faixa de pH ideal para a produção de biofloculante varia de acordo com o microrganismo utilizado e os demais parâmetros, como temperatura, tempo e concentração do inóculo utilizadas. Estudos realizados por Mabinya *et al.* (2011) com cepas de *Halomonas sp.*, e por Cosa *et al.* (2012) com cepas de *Halobacillus sp.*, demonstram que o pH que melhor favorece a produção de biofloculante por tais microrganismos é 7,0. Por outro lado, Deng *et al.* (2003), utilizando estirpes de *Aspergillus parasiticus*, e Liu *et al.* (2013), utilizando estirpes de *Klebsiella sp.* TG-1, relataram que a melhor produção de biofloculante ocorreu em meios alcalinos, com pH 8,0.

Lee *et al.* (2001) relataram que as melhores fontes de carbono para a secreção de biofloculante ZS-7, a partir de estirpes de *B. licheniformis* X14 foram o etanol, a sacarose e o amido, enquanto que o cloreto de amônio foi a fonte de azoto preferida para tal. Em outra pesquisa, Shih *et al.* (2001) verificaram que glicose, frutose e lactose não foram adequados para a produção de biofloculante por cepa de *B. licheniformis*, enquanto a presença de múltiplas fontes de carbono (glicerol, ácido cítrico e ácido glutâmico) no meio de cultivo melhorou o crescimento celular e a produção de biofloculantes por tal linhagem. Sheng *et al.* (2006), utilizando estirpes de *Klebsiella sp.*, relatam que a maltose e a ureia foram as fontes de carbono e azoto, respectivamente, mais efetivas para a produção de biofloculante.

Gong *et al.* (2003) descobriram que a sacarose, maltose, xilitol, lactose e glicose são substratos adequados para a produção de biofloculante por *Paenibacillus polymyxa* BY-28. He *et al.* (2004) documentaram um novo biofloculante de ácido poligalacturônico REA-11 produzido por *Corynebacterium glutamicum* a partir de sacarose (fonte de carbono) e ureia e licor de maceração de milho como fontes de azoto complexas.

A capacidade do microrganismo utilizar a sacarose como uma fonte de carbono para a produção de biofloculante aponta para a possibilidade de utilizar melaços na produção industrial em grande escala de biofloculante (OKAIYETO *et al.*, 2016).

Segundo Zhang *et al.* (2007), geralmente as enzimas responsáveis pela produção de biofloculante são ativadas em temperaturas ótimas associadas ao ótimo para o crescimento microbiano, que para microrganismos mesófilos oscila entre 25 ° C e 37 ° C (SALEHIZADEH & SHOJAOSADATI, 2001).

### **3.2. Enzimas de origem microbiana para aplicações industriais**

As enzimas são caracterizadas de forma geral como catalisadores biológicos ou biocatalisadores, em sistemas *in vivo* e *in vitro*, de natureza proteica, altamente específicas e com grande poder catalítico (WISEMAN, 1995). Podem ser classificadas em intracelulares ou extracelulares. As intracelulares são produzidas dentro das células e permanecem no citoplasma; são utilizadas quando não há outra forma de síntese, principalmente quando se necessita de replicação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Porém, as mais utilizadas industrialmente são as extracelulares, que assim como as intracelulares, são sintetizadas no ribossomo próximo à membrana celular, porém são transferidas para fora da célula. Dessa forma, elas podem ser retiradas do meio do cultivo onde o microrganismo que a produziu se encontra. A principal vantagem desse processo é a de não haver risco de contaminação por outras moléculas (BOURGAIZE *et al.*, 2000).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, visto a facilidade de manipulação genética dos mesmos e rapidez com que estas moléculas são obtidas (RAO *et al.*, 1998), além do menor custo de produção em fermentadores industriais de larga escala e amplo espectro de características físico-químicas (estabilidade térmica, de pH e tempo de estocagem, especificidade ao substrato, etc.) (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A identificação de novas fontes de enzimas microbianas, principalmente daquelas não tóxicas ao organismo humano, e suas diferentes aplicações, por si só justificam estudos de sua produção (MUSSATTO *et al.*, 2007), pois além de garantirem o suprimento de biocatalisadores necessários aos diferentes processos industriais, os quais muitas vezes não estão disponíveis nos sistemas vegetais ou animais, podem torná-los menos agressivos ao meio ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

### 3.2.1 Celulases

Celulases (EC 3.2.1.4) são hidrolases que atuam sinergicamente e especificamente sobre materiais celulósicos, liberando glicídios dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol, etc. (CASTRO & PEREIRA, 2010). Possuem, portanto, grande importância econômica, sendo aplicadas no setor alimentício, de ração animal, têxtil, detergente e cervejarias. Outras áreas incluem a indústria de polpa e papel, gestão de resíduos e indústria médico farmacêutica (BHAT & BHAT, 1997).

As endoglucanases são celulases que clivam internamente a molécula de celulose, isto é, hidrolisam ligações beta-glicosídicas de forma aleatória ao longo do polímero (LEE *et al.*, 2003), como ocorre com as carboximetilcelulases. Estas clivam as ligações glicosídicas das regiões menos compactadas (amorfa) da celulose, diminuindo o comprimento da fibra e gerando novas extremidades livres (LYND *et al.*, 2002).

As fontes de celulases microbianas incluem bactérias anaeróbicas (*Clostridium*, *Ruminococcus*, etc.) e aeróbicas (*Cellulomonas*, *Thermobifida*, etc.), actinomicetos (*Streptomyces*), fungos filamentosos (*Trichoderma*, *Aspergillus*, etc.) (LYND *et al.*, 2002; PALOMER *et al.*, 2004).

Toda bactéria com ação celulolítica secreta endoglucanases com propriedades diferentes, sendo que a maioria mostra uma pequena atividade na estrutura cristalina da celulose (BEGUIN, 1990). Segundo Schallmey *et al.* (2004), a habilidade de produzir e secretar grandes quantidades de enzimas extracelulares e apresentar espécies termófilas capazes de fermentar numa ampla variedade de valores de pH, faz com que as cepas do gênero *Bacillus* sejam dominantes nos processos de fermentação microbiológica, gerando produtos enzimáticos comerciais com aplicabilidades específicas.

### 3.2.2 Proteases

As proteases (EC 3.4.11-19) hidrolisam ligações peptídicas (BEG *et al.*, 2002) podendo ser exo ou endopeptidases. As endopeptidases atuam sobre aminoácidos não terminais, em contraste com as exopeptidases, que hidrolisam as ligações peptídicas dos aminoácidos terminais (HAKI & RASHIT, 2003).

Essas enzimas microbianas são amplamente utilizadas no processamento de alimentos, indústria têxtil e farmacêutica, na produção de detergentes (biológicos), biologia molecular e aplicações médicas. A ampla utilização destas enzimas é reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalisadores (PHADATARE, *et al.*, 1993, MANDIGAN *et al.*, 1996; HORIKOSHI, 1999; KANEKAR, *et al.*, 2002).

Entre as várias proteases microbianas, as de origem bacteriana são as de maior relevância, quando comparadas com proteases fúngicas, sendo as espécies de *Bacillus* as principais produtoras de proteases extracelulares (NASCIMENTO & MARTÍNS, 2006), sendo tal produção fortemente influenciada por fatores físicos como pH, temperatura e tempo de incubação, além de componentes do meio como íons metálicos (NEHETE *et al.*, 1985; JOHNVESLY & NAIK, 2001).

### 3.2.3 Lipases

As lipases (EC 3.1) são glicerol éster hidrolases, liberando ácidos graxos e glicerol de acilgliceróis (Jaeger *et al.*, 1994), mas facilitando também a catálise de outras reações, tais como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise, apresentando consideráveis atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos (MARTINS *et al.*, 2008).

As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, principalmente pelas suas versatilidades de propriedades de atuação, especificidade ao substrato e facilidade de produção em larga escala. Dentre os processos bioquímicos reportados na literatura, as lipases, especialmente microbianas, representam cerca de 35 % das enzimas empregadas industrialmente (FEITOSA *et al.*, 2010), tanto pela facilidade de obtenção a partir do caldo fermentativo, como pela estabilidade e propriedades diversificadas (PASTORE *et al.*, 2003).

A síntese de lipases por microrganismos é influenciada por vários fatores, como disponibilidade de oxigênio, de fontes de nutrientes (carbono, nitrogênio e minerais), presença de indutores, presença de agentes que interfiram na interface óleo-água, temperatura de



incubação, pH do meio, tempo de cultivo, intensidade da agitação, bem como o tipo de substrato (SHARMA *et al.*, 2001; DOMINGUEZ *et al.*, 2003; ZAREVUCKA *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2008).

Grande variedade de microrganismos são capazes de produzi-las: dentre as bactérias destacam-se *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*; *Kurthia sp.* e *Staphylococcus sp.*; dentre os fungos filamentosos, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Botrytis* e *Rhizopus*; e dentre fungos leveduriformes há especial interesse em *Trichosporon*, *Candida* e *Saccharomyces* (SHARMA *et al.*, 2001; HASAN *et al.*, 2006). É crescente o número de publicações que relatam novas espécies produtoras de enzimas lipolíticas, formas de obtenção e sua caracterização (HASAN *et al.*, 2006; FOTOUH *et al.*, 2016; SHUKLA & DESAI, 2016; SHAINI & JAYASREE, 2016). Estudos realizados por Sharma *et al.* (2001), listaram 109 espécies produtoras de lipase, das quais 47 foram obtidas de bactérias, com prevalência do gênero *Bacillus sp.*, 42 obtidas de fungos filamentosos e 20 de leveduras.

### 3.3 Produtores de Biofloculantes e Enzimas Extracelulares – o Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* (família Bacillaceae) é um dos maiores entre as espécies bacterianas. Suas características são muito variadas, tanto geneticamente quanto fenotipicamente, com espécies muito importantes do ponto de vista industrial, agrícola e médico (veterinário ou humano, com estirpes inclusive produtoras de toxinas) (PAIKET *et al.*, 1997). Por conta disso, as estirpes de *Bacillus* encontradas na natureza (solo, água e ar), e algumas da biota intestinal animal (CHANTAWANNAKUL *et al.*, 2002) são fontes importantes de enzimas extracelulares utilizadas industrialmente.

As espécies deste gênero são morfologicamente bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis (0,5 x 1,2 µm até 2,5 x 10 µm), capazes de esporular, com resposta positiva ou variável à coloração de Gram (isto é, nos cultivos muito jovens a coloração de Gram pode não ser positiva) e compõem-se principalmente por bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, podendo ser termofílicas, psicrofílicas, acidófilas, halotolerantes ou halofílicas (GOMES, 2013). Assim, possuem morfologia, composição enzimática e química favoráveis a resistência a diversas condições de temperatura, pH e salinidade. O hábitat principal desse gênero é o solo, com papel importante no ciclo do carbono e do azoto. A resistência dos esporos e a diversidade fisiológica das formas vegetativas fazem com que sejam encontrados também na água do mar, água doce e gêneros alimentícios (OLIVEIRA, 2010; GOMES, 2013).

As espécies do gênero *Bacillus* são classificadas em três grupos, de acordo com a morfologia e o endosporo de resistência produzido. O grupo I é subdividido em outros dois subgrupos: a) O grupo Ia constituído de bacilos de diâmetro superior a 1 µm, apresentando inclusões de poli-beta-hidroxibutirato (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*); e b) O grupo Ib constituído de bacilos com diâmetro inferior a 1 µm e desprovidos de inclusões de poli-betahidroxibutirato (*B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*); O grupo II é constituído de espécies Gram variáveis; apresenta esporo oval, central ou terminal que deformam a parede celular (*B. circulans*, *B. stearothermophilus*); O grupo III é caracterizado por bacilos Gram variáveis; apresentam um esporo esférico terminal ou subterminal que deformam a parede celular (*B. globisporus*, *B. insolitus*) (GOMES, 2013).

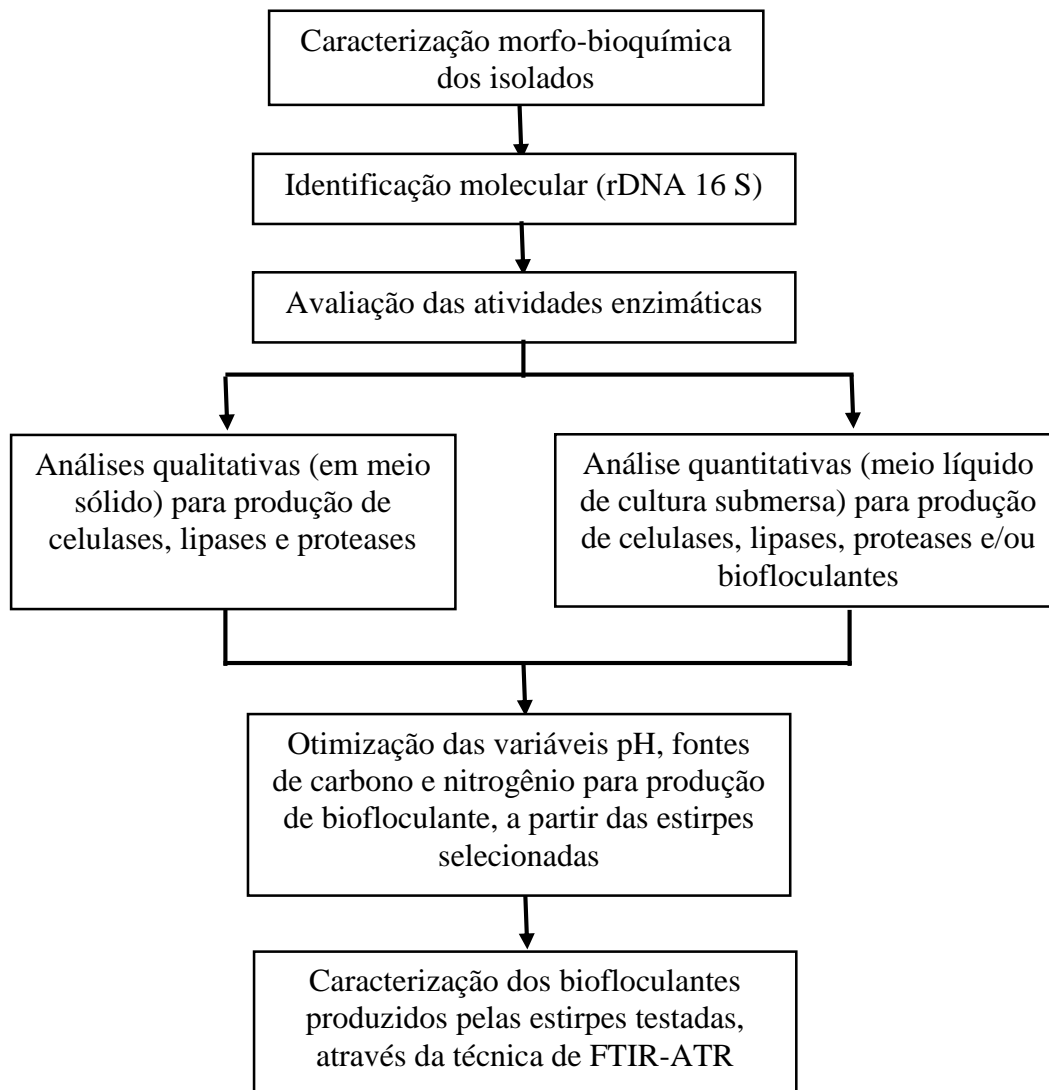
Espécies de *Bacillus* geralmente crescem bem em meios definidos contendo várias fontes de carbono, sendo também hábeis em utilizar uma variedade de substratos de baixo custo e de fácil disponibilidade, tais como os subprodutos da agroindústria, bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de trigo (SOCCOL & VANDENBERGH, 2003) como substratos. Isso ocorre em função também da versatilidade de produção de enzimas extracelulares que degradam polímeros complexos, como polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídeos, permitindo aos organismos utilizarem esses produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons (PALLADINO, 2008).

O gênero *Bacillus*, portanto, já é amplamente utilizado para produção de enzimas com interesse industrial, além de outras finalidades comerciais, como agentes bioinseticidas, biodegradadores ou metabolizadores de compostos inorgânicos ou orgânicos para o tratamento de águas, e produtores de biosurfactantes, etc. (ABBAS, 2003; PALLADINO, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008). Algumas cepas de *Bacillus* são potenciais redutoras de Fe III em águas (SCHEID *et al.*, 2004). Barreto (2011), utilizando diferentes estirpes de *Bacillus sp.*, destacou 15 com potencial para degradação de petróleo. Amostras de solo são boas fornecedoras dessas espécies, como é o caso de *Bacillus subtilis*.

## 4 METODOLOGIA

A **Figura 5** sintetiza as atividades experimentais desenvolvidas neste estudo e detalhadas nos subitens seguintes.

**Figura 5-** Fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no presente estudo. **Fonte:** AUTOR, 2017.



### 4.1 Bactérias Estudadas

Quatro bactérias mantidas na bacterioteca do Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA), do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), foram isoladas de locais distintos. Duas isoladas do solo originalmente da Mata Atlântica, mas com 40 anos de cultivo de cana-de-açúcar e aplicação frequente dos herbicidas Diuron, Sulfentrazone e Isoxaflutole (LBPMA-APF.SG3 e LBPMA-ACO.PR1), de propriedade da “Usina Coruripe Açúcar e Álcool S.A.” (localizada em Coruripe-AL) (SILVA, 2015), e as outras duas do lodo de lagoa de sedimentação da Estação

de Tratamento de Efluentes (ETE) da mesma empresa (LBPMA-BDL07 e LBPMA-BDLJ2) foram selecionadas (SILVA, 2016). Para a manutenção de células ativas, as culturas originais mantidas a baixa temperatura ( $10 \pm 2$  °C) foram repicadas quinzenalmente em meio ágar nutriente (5 g peptona, 3 g extrato de carne, 1 g cloreto de sódio, 20 g ágar, 1 L de água destilada) e incubadas por 24 h ao abrigo da luz a  $32 \pm 1$  °C.

## **4.2 Características morfo-cultural e bioquímica dos isolados estudados**

### **4.2.1 Aspectos morfológicos**

Foram utilizadas as colorações diferenciais para determinação da constituição da parede celular de bactérias (Gram, utilizando cristal violeta, lugol e safranina), da existência de endósporos (Verde-Malaquita) e da álcool-ácido resistência das paredes (Fuccina fenolada, de Ziehl-Nielsen), como descrito por Neder (1992). As lâminas coradas por Gram foram observadas em microscópio óptico equipado com ocular micrométrica WF 10X/18mm, e no aumento de 1000X, cada traço menor da régua representa 1µm, e cada traço maior representa 10 µm.

### **4.2.2 Identificação bioquímica e molecular dos isolados previamente selecionados**

Quatro linhagens bacterianas isoladas e selecionadas por apresentarem tolerância já detectada aos herbicidas Diuron, Sulfentrazone e Isoxaflutole (LOPEZ, SILVA & ROHERS, no prelo) e habilidade para produzirem polihidroxibutirato e/ou biosurfactante (SILVA *et al.*, 2016), foram submetidas aos testes de produção de enzimas extracelulares com atividade celulolítica, lipolítica, proteolítica, além da excreção de biofloculantes. Depois, aquelas que apresentaram tais atividades, antes de serem submetidas a testes de cinética para produção das mesmas, foram submetidas aos testes bioquímicos diferenciais e de extração de seu DNA total e amplificação do gene codificante da subunidade 16S do rDNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), visando sua identificação. Para tanto, os microrganismos foram cultivados em caldo nutriente por 24 h ( $30 \pm 1$  °C, ao abrigo da luz) sob agitação orbital constante (100 rpm), e imediatamente utilizados nos testes bioquímicos ou aos protocolos e séries de reagentes de extração de DNA da Norgen Biotek® ou da Quiagen® (QIAamp, DNA Mini Kit), conforme instruções dos fabricantes.

A caracterização bioquímica foi efetuada através do cultivo em meios diferenciais, tanto contidos em placas de Petri quanto em tubos de ensaio, conforme descrito por SILVA (1996) para o Ágar MacConkey, o meio Três Glicídios e Ferro (TSI), o Ágar Citrato de Simons, o

Ágar-Ureia, e o meio SIM (Sulfito–Indol–Motilidade). Também foram efetuadas provas para detectar em meio sólido a atividade hemolítica (MULLIGAN *et al.*, 1984), de Catalase (SILVA, 1996), ligninase (DHOUIB *et al.*, 2005) e de fenoloxidase (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005). Para esta última, ao meio AN acrescentou-se 0,5% de ácido gálico, e após esterilização (120°C, 1 atm, 10 min), o meio vertido em placas de Petri e posteriormente solidificado foi inoculado conforme nos demais ensaios (100 µL de suspensão aquosa com  $1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, cultura com 24 h), e incubado por 7 dias (30 ± 1 °C, no escuro), em triplicata para cada isolado.

No caso da extração do DNA dos isolados LBPMA-BDL07 e LBPMA-BDLJ2, a lise celular após centrifugação da cultura em meio líquido (14.000 rpm, 20° C, 30 s), foi promovida acrescentando-se ao precipitado 250 µL da solução de ressuspensão de 10 U de Rnase A, 12 µL de lisozima, 250 µL da solução de Lise e 11 µL de Proteinase K do *Kit* Norgen Biotek®. Após incubação (37 °C por 2 h), o material genético extraído foi recuperado por meio de coluna. Uma vez verificada a quantidade e pureza do DNA extraído através da medida da absorção espectrofotométrica a 260 e 280 nm, realizou-se o processo de amplificação do gene universal amplamente utilizado para identificação de bactérias em geral, o 16S rRNA. O seguinte protocolo de mistura de reação *singleplex* (volume final de 25 µL) foi utilizado para amplificação (WINSLEY *et al.*, 2012): 100 µg de DNA, 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (ACWCCTACGGGWGGCWGC e AYCTCACGRCACGAGCTGAC), 0,8 mM de dNTPs, 2,5 mM de cloreto de magnésio, 2,5 µL de tampão 10×, 5 µg de albumina de soro bovino (BSA) e 1U de Taq DNA Polimerase.

O DNA amplificado dos isolados mencionados foi visualizado com auxílio da luz ultravioleta emitida diretamente no gel de agarose corado com brometo de etídio, utilizando-se um transiluminador com proteção acrílica. Após a confirmação de amplificação do gene, o *amplicon* 16S rDNA de cada um dos isolados foi purificado do tubo de PCR original utilizando o protocolo do *kit* comercial da Norgen Biotek e enviado para a Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco. O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger no Analisador Genético da Applied Biosystems® ABI 3500×L (Life Technologies), contendo os marcadores fluorescentes Big Dye® Terminator v3.1 (Life Technologies). As condições de PCR para a reação de sequenciamento foram: 95°C (10 s), 51°C (5 s) e 60°C (4 min). Após o recebimento das sequências, utilizou-se o *software* CodonCode Aligner para edição. Depois de convertido para o formato FASTA, a sequência foi

comparada com as outras depositadas no banco público do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI).

No caso dos isolados LBPMA-ACO.SG3 e LBPMA-ACO.PR1, a extração ocorreu da mesma forma, porém, utilizando-se a série de reagentes da Quiagen® (QIAamp, DNA Mini Kit). A amplificação do gene 16S rDNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em microtubos contendo 45 µL da mistura de água ultrapura estéril isenta de DNase e RNase, tampão de reação 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP ([dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 10 mM), 100 ng de cada iniciador direto e reverso [PA-*forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e PH-*reverse* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')] e 1,5 U da enzima *Taq* polimerase (Promega), acrescida de 5 µL do DNA alvo extraído, sobre gelo, antes da submissão ao termociclador. Este foi programado da seguinte forma: pré-desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 72 °C por 1,5 min e uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min. Após o término do processo de amplificação, a verificação da eficiência da reação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose [1% (p/v) em tampão TBE 1X com brometo de etídio 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>], adicionando-se aos poços do gel 5 µL do DNA amplificado na PCR ou de um marcador de 100 a 2000 pares de bases (Invitrogen), adicionados de 2 µL de tampão de carregamento [0,025 % (v/v) de azul de bromofenol e 50 % (v/v) de glicerol] para verificação do segmento amplificado (cerca de 1200 pb). A corrida foi realizada por 40 min a 70 V.

O produto da PCR foi visualizado em um transiluminador sob luz ultravioleta (UV), sendo observada a possível presença de contaminantes. A imagem foi capturada e registrada em fotocodificador Gel Logic 100 (Imaging System) com o auxílio do programa *Molecular Imaging* (Kodak). Os produtos da PCR foram armazenados em freezer a -20 °C até a etapa seguinte. Para purificação dos produtos da PCR, foi utilizado o *kit GFX PCR DNA Illustra* (GE Healthcare), para digestão dos restos de iniciadores e dNTPs não utilizados na amplificação, e posterior utilização como molde de DNA para a reação de sequenciamento em microplacas com 96 poços (*MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate* da Applied Biosystems) com o *kit* comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), utilizando como iniciadores diretos [PA-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 926-F (5'-AACTCAAAGGAATTGACGG-3')] e reversos [PH-R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), 519-R (5'-G(AT)ATTACCGCGGC(GT)GCTG-3') e 1093-R (5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'), além dos iniciadores universais 1831 (5'-GAGGAACACCGATGG

CGAAGGC-3') e 1832 (5'-GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT-3'). Em ambos os casos, seguiu-se as recomendações dos fabricantes.

Posteriormente, os produtos gerados em cada um dos poços de reação da microplaca foram incubados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 min com 80  $\mu$ L de uma solução com 75 % de isopropanol v/v, precipitados e centrifugados (Centrifuga 5810R-Eppendorf) por 45 min a 4000 rpm (21°C), e o sobrenadante desprezado pela inversão cuidadosa da microplaca em papel de filtro. Após inverter novamente essa microplaca sobre novo papel de filtro, centrifugá-la por 1 min a 900 rpm (21°C) e levá-la ao termociclador para secagem a 75 °C por 5 min, os precipitados foram ressuspensos em 10  $\mu$ L de formamida para desnaturação, e as microplacas centrifugadas por 1 min a 900 rpm (21°C), incubadas para secagem por 5 min a 95 °C, e então imediatamente submetidas a choque térmico em banho de gelo antes da submissão ao sequenciador automático. A separação dos fragmentos nucleotídicos do DNA foi realizada no sequenciador (*ABI PRISM 3100 DNA Sequencer* da Applied Biosystem), utilizando-se a voltagem de 1,6 kV por 10 s na injeção da amostra, sendo cada corrida realizada a 60 °C, por 2800 s, a 5  $\mu$ Amp e 13,4 kV. As sequências totais do rRNA 16S foram editadas utilizando o programa SeqMan versão 7.0 (*DNASTAR Lasergene*), e comparadas àquelas depositadas no banco de dados de sequências do GenBank, EzTaxon e Ribosomal Database Project II.

### **4.3 Cultivo em meio sólido: triagem de isolados com atividades celulolítica, lipolítica ou proteásica**

#### **4.3.1 Preparo do inóculo para os testes em meio sólido**

O inóculo foi preparado semeando uma alçada de colônia de cada um dos isolados de *Bacillus* sp. (mantidos em meio AN,  $32 \pm 1$  °C, no escuro) em meio sólido AN contido em placas de Petri. As placas foram incubadas em estufa a  $32 \pm 1$  °C por 24 h, no escuro, afim de obter células jovens. Após este período, um volume de 9 mL de água destilada estéril foi depositado na superfície de cada cultura para ressuspender as células; em seguida, essas foram colhidas por sucção com o auxílio de uma pipeta estéril, cada suspensão quantificada utilizando-se a escala de Mc Farland, e então submetidas a diluição seriada. Alíquotas dessas diluições contendo  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup> foram inoculadas no centro dos meios sólidos ou líquidos contendo substratos específicos para a verificação da produção de enzimas extracelulares, vertidos em placas de Petri, no limite de uma marca esférica de 1 cm de diâmetro (previamente efetuada

com o auxílio de um perfurador de meio). O material foi incubado por 48 h, a  $32 \pm 1$  °C, no escuro.

#### **4.3.2 Atividade celulolítica**

Para detecção da atividade celulolítica foi utilizado um meio constituído de (g.L<sup>-1</sup>): 10,0 de carboximetilcelulose (CMC); 1,0 de peptona; 2,0 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,0 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 de uréia; 0,5 de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,4 de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 1mL de solução de elementos traço esterilizada por filtração contendo (g.L<sup>-1</sup>): 5,0 de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 1,6 de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 2,0 de CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 2,0 de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 20 de ágar (JANG & CHEN, 2003). O pH do meio foi ajustado para 7,0 com soluções 1M de NaOH ou HCl, e logo após foi esterilizado por autoclavagem (121 °C, 1 atm, 20 min). Após resfriamento, tal meio foi vertido em placas de Petri, solidificado e submetido à inoculação por cada isolado estudado, conforme descrito no item 4.3.1. Para confirmar a atividade, adicionou-se solução de vermelho Congo 1 % sobre as placas. Os isolados que apresentaram halo claro ao redor das colônias após 2 h de contato foram considerados positivos para a produção de celulase.

#### **4.3.3 Atividade proteolítica**

Para detecção da atividade proteolítica foi utilizado um meio contendo 0,4 % de gelatina como substrato, o qual foi adicionado ao meio AN. Após inoculação como descrito no item 4.3.1, a confirmação da atividade foi feita observando a presença de zonas róseas ao redor da colônia após a adição da solução vermelho de fenol a 2 % ao meio (HANKIN & ANAGNOSTAKIS,1975).

#### **4.3.4 Atividade lipolítica**

Para detecção da atividade lipolítica, utilizou-se a metodologia descrita por Slifkin (2000), sendo o meio composto por (g.L<sup>-1</sup>): 1,0 de peptona; 0,5 de NaCl; 0,01 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1,7 ágar e Tween 80® (polioxietileno sorbitano monooleato) na proporção de 1:100 como substrato. O Tween 80 é geralmente considerado como um surfactante que pode ser utilizado como substrato para a produção de lipases e esterases. Após incubação conforme descrito no item 4.3.1, efetuou-se a avaliação depois de depositar sobre as culturas a solução de revelação, isto é, 2 % de vermelho de fenol. A conversão da coloração do meio amarelo para rosa (acidificação) representa um resultado positivo.

#### **4.3.5 Índice enzimático**

Para determinação do índice da atividade enzimática (IE) das análises qualitativas/semi-quantitativas, utilizou-se a seguinte equação (FLORENCIO *et al.*,2012):



$$IE = Dh/Dc$$

Dh = diâmetro em milímetros (mm) do halo de hidrólise;

Dc = diâmetro em mm da colônia bacteriana.

O teste de atividade enzimática foi realizado em triplicata para cada isolado, sendo calculadas as médias dos diâmetros das colônias e halos de hidrólise e respectivos desvios-padrão.

#### **4.4 Cultivo submerso: avaliação das atividades enzimáticas e produção de biofloculante conforme crescimento no decurso do tempo**

Os isolados que apresentaram eficiente produção das enzimas testadas em meio sólido, foram então submetidos aos demais testes em meio líquido, inclusive de produção de biofloculantes.

Para isso, cada inóculo (preparado como descrito em 4.3.1) foi depositado em 75 mL dos meios específicos contidos em frascos erlenmeyers de 125 mL. Triplicatas das culturas foram incubadas (160 rpm,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro, em incubadora Shel Lab, modelo SSI3-2) por um período de 120 h, e a cada 24 h foram colhidas amostras para determinação da massa seca, atividade enzimática específica ou de biofloculante e pH. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Para avaliar a produção do complexo enzimático carboximetilcelulose, foi utilizado o mesmo meio de cultura descrito no item 4.3.2, sem a adição de ágar.

Para atividade proteolítica foi utilizado o meio descrito por Josephine *et al.* (2012), constituído de ( $\text{g L}^{-1}$ ): 5,0 de D-glicose; 7,5 de peptona; 5,0 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 5,0 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,1 de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 com NaOH 1,0 M ou HCl 1,0 M e logo após foi esterilizado por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$ , 1 atm, 20 min).

Para atividade lipolítica, foi utilizado o meio descrito por Sharma *et al.* (2002), o qual é constituído de ( $\text{g L}^{-1}$ ): 1,2 de  $\text{KNO}_3$ ; 6,0 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 3,0 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2 de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,01 de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,001 de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,75 % (m/v) de peptona de caseína; 0,75 % (m/v) de extrato de levedura e 1 % (v/v) de óleo de oliva. O pH do meio de cultivo foi ajustado para 7,0 com NaOH 1,0 M ou HCl 1,0 M e logo após foi esterilizado por autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$ , 1 atm, 20 min).

Por fim, o meio de cultura utilizado para produção de biofloculante foi composto por (g L<sup>-1</sup>): 20 de glicose, 0,5 de ureia, 0,5 de extrato de levedura, 0,3 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 de NaCl e 0,2 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0 (ZHANG *et al.*, 2007).

#### **4.4.1 Determinação do pH e massa seca ao longo do tempo**

As amostras das culturas foram centrifugadas (5000 rpm, 20 min, 4 °C, em centrífuga Sigma, 2K15) e seus sobrenadantes foram utilizados medidas de pH (utilizando-se pHmetro eletrônico previamente calibrado com soluções-padrão). As células precipitadas nos tubos de centrifugação foram ressuspensas em 1 mL de água destilada estéril e transferidas para microtubos de 1,5 mL (tipo *Eppendorf*), sendo estes submetidos a secagem em estufa, a 40 °C por 24 h, até massa constante, a qual foi determinada gravimetricamente e expressa em mg.

#### **4.4.2 Determinação quantitativa da atividade celulolítica**

Para cada tempo analisado, uma mistura contendo 1,0 mL da preparação enzimática (sobrenadante livre de células) e 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 1,0 % (p/v) em tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0) foi incubada em banho seco (70 °C) durante 30 min. Após esse período, a reação foi paralisada com adição de 1,0 mL de solução aquosa do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNSA) (0,25 g DNSA; 75 g de tartarato de sódio e potássio, 50 mL de hidróxido de sódio 2M, 250 mL de água destilada) e a mistura depositada em água em ebulição por 10 min, sendo então resfriada em banho de gelo por 5 min (MILLER, 1959). A absorvância da mistura foi medida a 540 nm em espectrofotômetro Fento 800XI. No tratamento “controle”, a amostra do sobrenadante foi substituída por 0,5 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M e pH 8,0), e os demais passos foram os mesmos descritos anteriormente. Uma unidade de carboximetilcelulase é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicídio redutor por minuto por mL da enzima. A curva padrão foi produzida variando-se a concentração de 0,2 a 1 mg.mL<sup>-1</sup> de D-glicose.

#### **4.4.3 Determinação quantitativa da atividade proteásica**

O ensaio para atividade proteolítica utilizando caseína como substrato foi realizado pelo método de Ramakrishna & Pandit (1988) com as seguintes modificações: 250 μL do sobrenadante foram adicionados em um tubo contendo 500 μL de Caseína Hammarsten 1 % (em tampão fosfato 50 mM, pH 8,0). Os tubos foram selados com filme plástico e incubados a 30 °C em banho seco por 2 h. A reação foi paralisada pela adição de 375 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10 %, e os tubos submetidos imediatamente a banho de gelo por 30

min. A seguir, o material foi centrifugado (5.000 rpm, 15 min, 4 °C). A leitura da absorvância foi realizada a 280 nm contra o branco (750 µL do tampão fosfato 50 mM, pH 8,0 + 375 µL de ácido tricloroacético). Todas as análises foram feitas em triplicatas. Uma curva padrão de tirosina foi construída diluindo-se solução de tirosina em 0,2 M de HCl (200 µg.mL<sup>-1</sup>) para obtenção de diferentes concentrações (25-200 µg.mL<sup>-1</sup>). A atividade foi expressa em U.mL<sup>-1</sup>, correspondente a µg (de tirosina) por minuto por mL da enzima.

#### 4.4.4 Determinação quantitativa da atividade lipolítica

A atividade da enzima lipase tem sido determinada através da quantificação dos ácidos graxos liberados, e esses podem ser determinados por métodos físico-químicos avaliando-se o desaparecimento do substrato ou a formação de produtos de reação através da utilização do sobrenadante enzimático dos cultivos submersos colorimetricamente (MESSIAS *et al.*, 2011). Ésteres sintéticos de ácidos graxos (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato) com *p*-nitrofenila podem ser hidrolisados por lipases, como no caso do palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP), em meio aquoso contendo goma arábica como surfactante, liberando o composto colorido *p*-nitrofenol, cuja mensuração é proporcional à atividade enzimática. A atividade quantitativa da lipase foi analisada utilizando-se (pNPP) como o substrato (WINKLER & STUCKMANN, 1979). Assim, a um volume de 10 mL de isopropanol contendo 30 mg de pNPP (Sigma), foi adicionado a 90 mL de 0,05 M de tampão de fosfato de sódio (pH 8) contendo 207 mg de desoxicolato de sódio e 100 mg de goma-arábica. Uma alíquota de 2,4 mL dessa solução recém-preparada de substrato foi pré-aquecida a 37 °C e misturada com 0,1 mL de solução de enzima (filtrado do sobrenadante de cultivo). Após 15 min de incubação a 37 °C, a absorvância a 410 nm foi medida contra o branco. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol a partir do substrato em mL.min<sup>-1</sup>.

#### 4.4.5 Avaliação da atividade biofloculante

Para cada tempo de amostragem, 2 mL do meio de cultivo foi centrifugado (5000 rpm, 30 min) para separar as células bacterianas, e o sobrenadante da cultura isento de células foi analisado quanto a atividade de floculação (ZHANG *et al.*, 2007). A atividade de floculação foi determinada como descrito por KURANE *et al.* (1994). Resumidamente, a um volume de 3 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 % e 2 mL de sobrenadante isento de células foram adicionados 100 mL de suspensão de Kaolin (4 g.L<sup>-1</sup>) em frasco de 250 mL. A mistura foi agitada vigorosamente e vertida para uma proveta graduada de 100 mL, repousando por 5 min. A densidade óptica (OD) da solução

de clarificação foi medida em espectrofotômetro a 550 nm. O controle foi preparado usando o mesmo método, mas o biofloculante foi substituído por meio de cultura sem prévia inoculação (B). A atividade floculante foi medida usando a equação:

$$\text{Atividade floculante (\%)} = [(B - A) / A] \times 100$$

A = absorvância da mistura de reação da “amostra” a 550 nm;

B = absorvância da mistura de reação do “controle” a 550 nm.

#### **4.5 Otimização dos componentes do meio de cultivo para produção de biofloculante**

##### **4.5.1 Efeito da fonte de carbono sobre atividade biofloculante**

Para determinar a melhor fonte de carbono para a produção de biofloculante, os microrganismos isolados foram inoculados (como descrito no item 4.3.1) em tubos tipo *Falcon* (50 mL) contendo 40 mL de meio de cultivo específico (conforme descrito no item 4.4) para produção de biofloculante, o qual foi constituído de diferentes fontes de carbono, tais como: Sacarose (20 g L<sup>-1</sup>), Maltose (20 g L<sup>-1</sup>) e Glicose (20 g L<sup>-1</sup>) (160 rpm, 37 ± 1°C, no escuro, em incubadora Shel Lab, modelo SSI3-2). A atividade floculante e massa seca foram analisadas após 24 horas de cultivo (conforme descrito no item 4.4.5).

##### **4.5.2 Efeito da fonte de nitrogênio sobre atividade biofloculante**

Para a otimização das fontes de nitrogênio para a produção de biofloculante, os microrganismos isolados foram inoculados em tubos tipo *Falcon* (50 mL) contendo 40 mL de meio de cultivo específico (conforme descrito no item 4.4) para produção de biofloculante, o qual foi constituído de diferentes fontes de nitrogênio (1,3 g.L<sup>-1</sup>), tais como: uréia e peptona (nitrogênio orgânico), sulfato de amônio (nitrogênio inorgânico) e também uma fonte mista de nitrogênio composta de extrato de levedura, sulfato de amônio e uréia . A atividade de floculação foi determinada como previamente descrito no item 4.4.5, após as 24 h de cultivo.

##### **4.5.3 Efeito do pH sobre atividade biofloculante**

O pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 com NaOH 1,0 M ou HCl 1,0 M, nos diferentes meios de cultivo (para otimização das fontes de carbono e nitrogênio), visando identificar-se a melhor condição deste para estimular a produção do biofloculante.

#### **4.6 Extração e purificação do biofloculante produzido**

A extração e purificação do biofloculante produzido pelas estirpes de *Bacillus spp.* foi realizada segundo metodologia descrita por Wong *et al.* (2012), com algumas alterações. Após

72 h de cultivo, o meio de cultura foi centrifugado a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C para remover as células bacterianas. Dois volumes de etanol foram adicionados ao sobrenadante, para precipitar o possível biofloculante produzido, e deixado na geladeira durante 24 h. O precipitado resultante foi recolhido por centrifugação a 4000 rpm durante 20 min. O biofloculante foi dissolvido em 25 mL de água destilada e 25 mL de uma mistura de clorofórmio e 1-butanol (5: 2 v/v); agitou-se durante 60 s e manteve-se durante 12 h em um funil de separação (temperatura ambiente). A fase superior foi recolhida, e centrifugada a 4000 rpm durante 20 min a 4 °C, redissolvida em 50 mL de água destilada e deixado secar em estufa a 40 °C. O biofloculante obtido foi caracterizado conforme o item descrito a seguir.

#### **4.7 Caracterização do biofloculante produzido**

Utilizou-se um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier-FTIR-ATR (Shimadzu, modelo IRPrestige-21) para determinar as porções funcionais do biofloculante, o qual foi analisado em uma faixa de números de onda de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.8 Análise Estatística**

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Com os resultados obtidos foi feito a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, tomando-se o valor de  $p \leq 0,05$  como nível máximo de significância estatística (SOKAL & ROHLF, 1996).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação bioquímica e molecular das bactérias isoladas

As características morfológicas e bioquímicas analisadas nos isolados bacterianos estão expostas na **Tabela 3**.

**Tabela 3-** Aspectos morfo-bioquímicos de quatro isolados bacterianos provenientes ou de argissolo amarelo distrófico, com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar, ou de lodo de estação de tratamento de efluentes da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capazes respectivamente de tolerar altas concentrações de três herbicidas (APF. SG3 Isox, ACO. PR1 Isox) ou de produzir biosurfactante/bioplástico (BDLJ2 e BDL07).

Teste \ Isolado	APF. SG3 Isox	ACO. PR1 Isox	BDLJ2	BDL07
Gram	+	+	+	+
Forma	bastonete	bastonete	bastonete	bastonete
Presença de endósporo	+	+	+	+
Aspecto das colônias (Ágar Nutriente)	Forma irregular, grandes, elevação convexa, de margem ondulada, cor branco-creme opaca.	Circulares, grandes e planas, bordas inteiras a onduladas com anéis, cor creme-amarelada e superfície granulada opaca.	Forma irregular, elevação plana, de margem ondulada, cor branco-creme opaca.	Forma irregular, colônias são lisas e se tornam ligeiramente amareladas
Motilidade (Meio SIM)	+	+	+	+
Produção de H <sub>2</sub> S (SIM)	-	-	-	+
Produção de Indol (SIM)	-	-	-	-
Utilização de Citrato como única fonte de Carbono	+	+	-	.-
Fermentação de glicose (TSI)	+, aeróbio ou facultativo	+, aeróbio ou facultativo	+, aeróbio ou facultativo	+, aeróbio
Oxidação/Fermentação de sacarose (TSI)	+	+	+	-
Produção de Gás (TSI)	-	-	-	-
Produção de FeS (TSI)	-	-	-	-
Fermentação de lactose (Ágar McConkey)	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	+
Citocromo <i>c:o</i> Oxidase*	.*	.*	.*	.*
Urease	+	+	-	+
Hemólise em Ágar-Sangue de carneiro desfibrinado	$\alpha$ -hemólise (halo cinza-esverdeado ao redor da colônia)	$\beta$ - hemólise (lise total gerando halo transparente)	$\beta$ - hemólise (lise total gerando halo transparente)	$\beta$ - hemólise (lise total de hemácias ao redor da colônia, com halo transparente)
Ligninase	-	-	+	+
Fenoloxidase	+	+	+	+
Teste de Voges-Proskauer	-	-	+	+
Teste do Vermelho de Metila	-	+	+	+
Nitrato-redutase	+	+	+	-
Crescimento em 6,5% NaCl	+	+	+	+

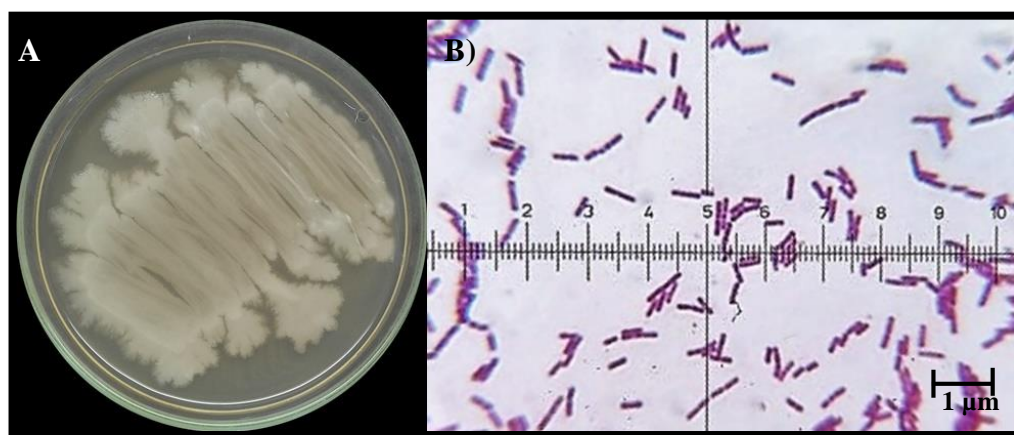
(\*) teste subjetivo, em tiras de papel contendo reagente de Kovacs; (-) negativo; (+) positivo

As bactérias isoladas do lodo da ETE (LBPMA-BDL07 e LBPMA-BDLJ2) e do solo de Mata Atlântica (LBPMA-ACO. PR1 Isox e LBPMA-APF. SG3 Isox), apresentaram-se como

Gram positivas formadoras de esporos, apresentando metabolismo aeróbio facultativo ou estrito.

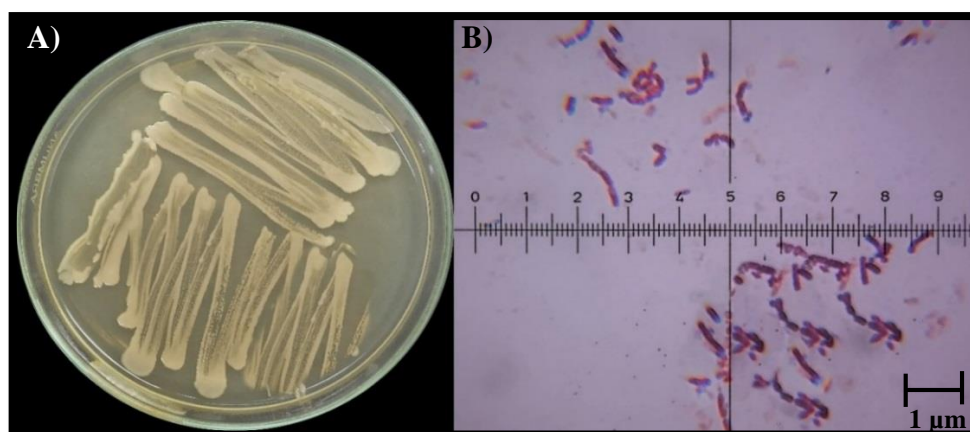
O isolado LBPMA-BDLJ2 (**Figura 6**), após 24 h de crescimento em meio ágar nutriente, apresentou colônias com forma irregular, elevação plana, margem ondulada e coloração branco opaca. Sua análise microscópica mostra que o tamanho de suas células pode variar de 0,5-1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro  $\times$  2,5-10,0  $\mu\text{m}$  de comprimento.

**Figura 6** - Aspecto morfológico do isolado bacteriano BDLJ2, obtido de lodo de estação de tratamento de efluentes da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de produzir biosurfactante/bioplástico. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1  $\mu\text{m}$ ).



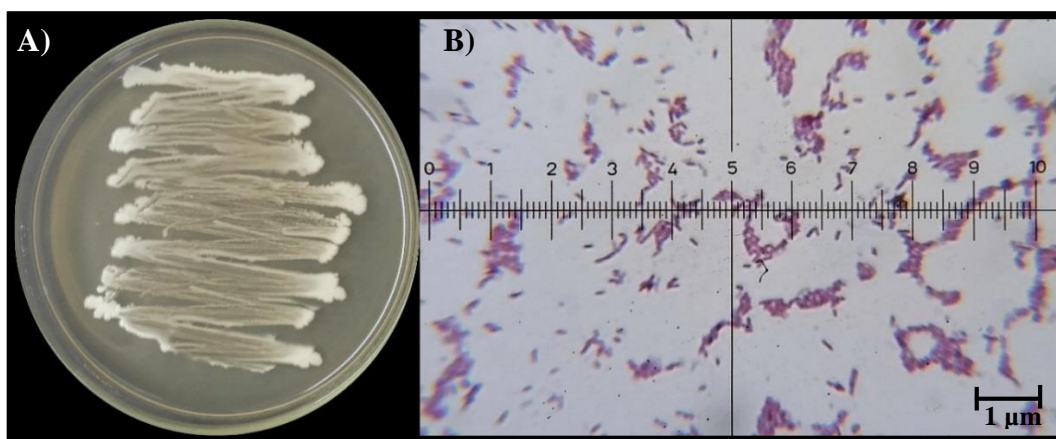
Já o isolado LBPMA-APF.SG3 Isox (**Figura 7**), apresentou colônias com forma irregular, grandes (isto é,  $\geq 5$  mm), com elevação convexa, de margem ondulada e cor branco-creme opaca. Sua análise microscópica revelou tamanho celular variando de 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro  $\times$  3-4  $\mu\text{m}$  de comprimento.

**Figura 7** - Aspecto morfológico do isolado bacteriano APF.SG3 Isox, obtido de solo de Mata Atlântica da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de tolerar altas concentrações de três herbicidas. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (Aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1  $\mu\text{m}$ ).



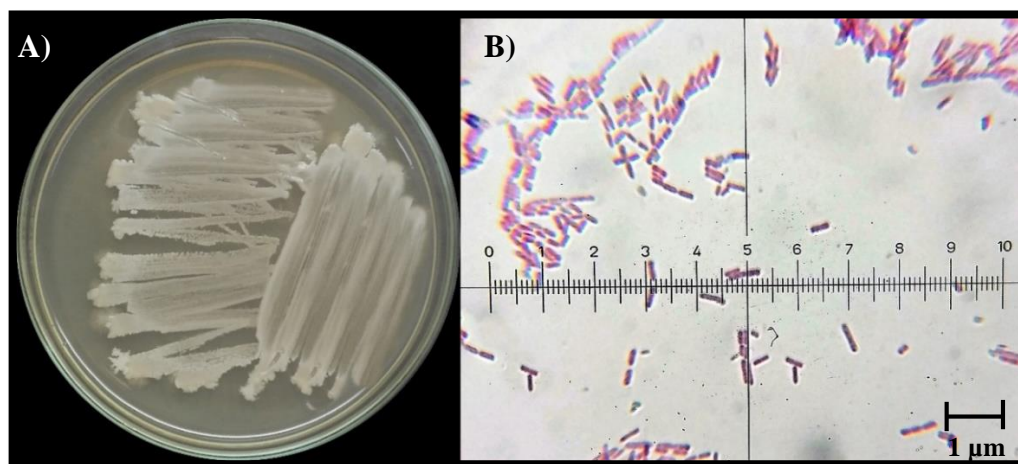
O isolado LBPMA-BDL07 (**Figura 8**), apresentou forma irregular, colônias lisas as quais tornam-se ligeiramente amareladas. A análise microscópica deste isolado mostrou que suas células podem variar em tamanho de 2,0–3,0  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  0,5–0,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

**Figura 8** - Aspecto morfológico do isolado bacteriano BDL07, obtido de lodo de estação de tratamento de efluentes da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de produzir biosurfactante/bioplástico. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (Aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1  $\mu\text{m}$ ).



Por outro lado, o isolado LBPMA-ACO.PR1 Isox (**Figura 9**), apresentou colônias com formas circulares, grandes e planas, bordas inteiras a onduladas com anéis, cor creme-amarelada e superfície granulada opaca. A análise microscópica do mesmo mostrou células com 3,0-4,0  $\mu\text{m}$  de comprimento  $\times$  0,5–0,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

**Figura 9** - Aspecto morfológico do isolado bacteriano ACO. PR1 Isox, obtido de solo de Mata Atlântica da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Alcool” (Coruripe- Alagoas, Brasil), e capaz de tolerar altas concentrações de três herbicidas. A) Crescimento bacteriano em meio ágar nutriente (24 h de incubação,  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro); B) Estrutura microscópica das células após coloração de Gram (Aumento de 1000X, unidade menor do retículo ocular=1  $\mu\text{m}$ ).





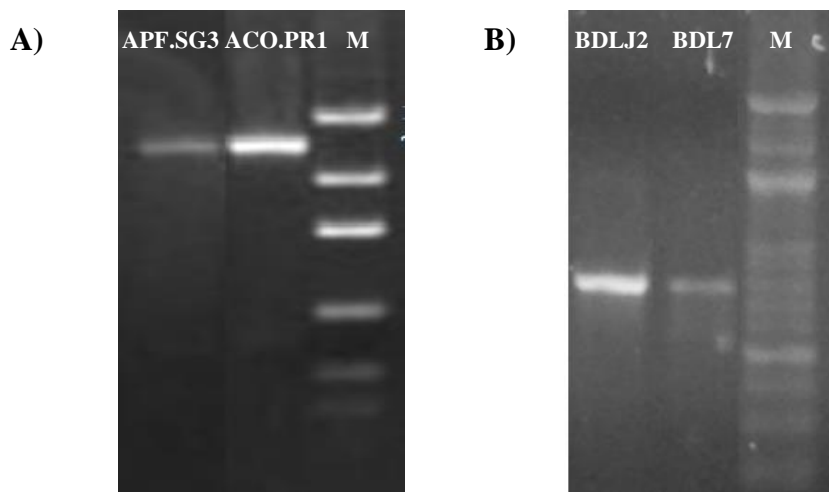
Todos os isolados são capazes tanto de oxidar como fermentar a glicose utilizando a via ácida mista com a produção de diferentes ácidos. Além disso, todos foram capazes de suportar meio de cultura com elevada concentração de sal (6,5 % NaCl). Com relação à produção de urease, apenas o isolado LBPMA-BDLJ2 foi incapaz de fazê-lo.

A catalase, enzima importante para combater o excesso de radicais livres da célula, foi detectada em todos os microrganismos isolados. Assim, todos os quatro isolados – provenientes ou de solo cultivado por 4 décadas com cana de açúcar (LBPMA-APF.SG3 Isox e LBPMA-ACO.PR1 Isox), ou lodo de ETE (LBPMA-BDLJ2 e LBPMA-BDL07) da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, selecionados respectivamente por já apresentarem tolerância a três herbicidas de uso frequente (isoxaflutole, sulfentrazone, diuron) e produzirem biosurfactantes e bioplásticos, – são representantes do gênero *Bacillus*.

No entanto, uma característica importante para definir tal gênero é a expressão positiva de oxidase, a qual não foi constatada no teste utilizado. Segundo, Jurtshuk & Liu (1983), *Bacillus* spp. fornecem respostas variáveis ao teste qualitativo de oxidase, e a avaliação da resposta da mudança da coloração do reagente num prazo de 30-45 s, não se aplica a esse gênero. Dessa forma, para esclarecer com mais precisão a identificação dos isolados selecionados, esses foram submetidos a extração de seu DNA e amplificação da região intragenômica 16 S rDNA, os quais foram editados e comparados àqueles depositados no banco de dados de sequências do GenBank, EzTaxon e Ribosomal Database Project II (**Figura 10**), uma vez que, dentre os vários marcadores químicos usados, somente DNA e RNA não são afetados pelas condições de cultivo. A extração, amplificação e sequenciamento (total ou parcial) das regiões 16S rDNA é uma estratégia importante de identificação (ROSSELLÓ-MÓRA & AMANN, 2015), e definir a espécie exata dos isolados é fundamental para direcionar futuros estudos para qualquer que seja a finalidade biotecnológica (SANGKHARAK e PRASERTSAN, 2012).

Conforme tais estudos moleculares, verificou-se que o isolado LBPMA-ACO.PR1 apresentou 99 % de similaridade com a sequência análoga da cepa *Bacillus toyonensis* BCT 7112<sup>T</sup>, enquanto o isolado LBPMA-APF.SG3 apresentou 99,93 % de homologia com a estirpe *Bacillus megaterium* GU2522112. Já o isolado LBPMA-BDL07 apresentou a mesma porcentagem de homologia com a cepa de *Bacillus pumilus* SAFR-032. As sequências dessas três linhagens foram depositadas no GenBank (NCBI) sob os códigos de acesso KX129778, KX1298 e KU555928, respectivamente. O isolado LBPMA-BDLJ2, por sua vez, também apresentou 99 % de homologia com *Bacillus thuringiensis* Bc601.

**Figura 10** - Perfil eletroforético em gel de agarose (1 %) de produtos de PCR (*amplicons*) do gene 16S rRNA: **A)** dos isolados bacterianos APF, SG3 Isox e ACO, PR1 Isox, obtidos de solo cultivado por 4 décadas com cana de açúcar e selecionado pela tolerância a herbicidas. **B)** dos isolados bacterianos BDLJ2 e BDL07 obtidos do lodo da ETE da “S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool”, selecionados por serem capazes de produzir biosurfactante e bioplástico (M= marcador de peso molecular).



Estudos realizados por Assis & Ribeiro (2011), mostram que estirpes de *B. megaterium* são capazes de sobreviver em condições extremas, tais como ambientes desérticos, especialmente em função de produzir esporos resistentes. São muito importantes na biotecnologia industrial devido ao seu tamanho facilmente identificável ao microscópio óptico e capacidade de produzir enzimas, principalmente amilases.

Já *B. pumilus*, segundo Parvathi *et al.* (2009), caracteriza-se por ser altamente resistente a condições ambientais extremas, tais como baixa ou nenhuma disponibilidade de nutriente, dessecação, irradiação, presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e desinfecção química. Seu papel ecológico é enfatizado pelo fato de não produzir compostos tóxicos de microrganismos patogênicos, aumentando o interesse tecnológico por essa espécie.

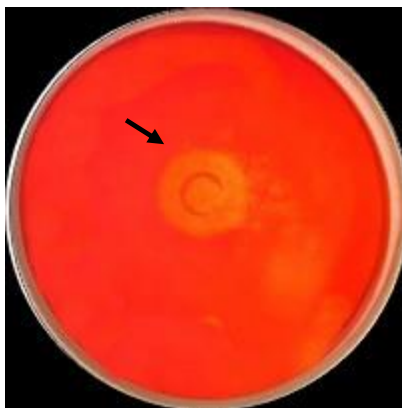
*B. thuringiensis*, por sua vez, é uma espécie encontrada nos mais diferentes substratos do planeta, como solo, água, insetos mortos, superfície (BRAVO *et al.*, 1998) e no interior das raízes (MONNERAT *et al.*, 2003) de plantas. É entomopatogênica, e por isso, amplamente utilizada como bioinseticida no controle de praga de culturas relevantes, como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho, *Sphenophorus levis* Vaurie (Coleoptera: Curculionidae) em cana-de-açúcar e *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae) em vários tipos de grãos armazenados (GALLO *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2005). Durante a esporulação, sintetiza proteínas que se acumulam na periferia dos esporos em forma de cristais (PEFERÖEN, 1997).

## 5.2 Seleção dos isolados de *Bacillus* capazes de secretar celulases, lipases ou proteases em meio sólido

### 5.2.1 Atividade celulolítica

Dentre os quatro microrganismos estudados, após o período de incubação de 48 h em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) 1 % como única fonte de carbono e corados com a solução do corante vermelho do Congo 1 %, todos foram capazes de apresentar halos claros ao redor das colônias, indicando produção de CMCase. A **figura 11** apresenta o resultado de um dos isolados testados (*B. pumilus* BDL07).

**Figura 11-** Atividade celulolítica *in vitro* do isolado de *Bacillus pumilus* (BDL07) cultivado em ágar-carboximetilcelulose (CMC), por 48 h ( $32 \pm 2$  °C, escuro). A seta indica a mudança de coloração ao redor da colônia bacteriana (halo de descoloração), após revelação com o corante vermelho do Congo 1 %, indicando atividade positiva para produção de celulase. **Fonte:** Autor, 2015.



As endoglucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações  $\beta$ -1,4 da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2008). A formação de um halo transparente ao redor de colônias das bactérias cultivadas em ágar-CMC, após coloração com vermelho do Congo, resulta da clivagem do polímero de CMC (hidrólise) em monômeros de glicose, os quais não se ligam ao corante, que por sua vez, se fixa nas ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas (CASTRO, 2006).

A utilização do vermelho Congo para a revelação de ensaios qualitativos de seleção de microrganismos produtores de celulases é um protocolo bem estabelecido (KUMARI *et al.*, 2011; PEREIRA, 2013; PIVETTA, 2014), porém, de acordo com CASTRO (2006), algumas substâncias podem interferir no corante proporcionando falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos, daí a importância de se utilizar o substrato CMC puro no meio.

A medida do diâmetro do halo indicador da atividade celulolítica foi obtida pelo método de difusão radial em meio sólido, sendo correlacionada com a medida do diâmetro da colônia,

o que determina o índice de atividade enzimática (IE) (FLORÊNCIO *et al.*, 2012). Essa é uma ferramenta preliminar prática, que facilita a seleção e a comparação da produção enzimática de diferentes isolados microbianos, uma vez que o índice considera a correlação direta entre o tamanho do halo e a capacidade de degradação dos microrganismos (LIN *et al.*, 1991, FUNGARO & MACCHERONI, 2002). A **Tabela 4** mostra os diâmetros dos halos de descoloração das colônias e os respectivos valores do IE dos isoladas de *Bacillus* spp. testados.

**Tabela 4** - Diâmetros dos halos de hidrólise da CMCase e das colônias das estirpes de *Bacillus* spp. estudadas, cultivadas em meio ágar- carboximetilcelulose (CMC) como única fonte de carbono, após 48 h de incubação em estufa BOD ( $32 \pm 2$  °C, no escuro), e cálculo do índice de atividade enzimática (IE).

Atividade enzimática Microorganismos	Celulase		
	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	IE
<i>Bacillus thuringiensis</i> BDLJ2	13,00 ± 1,73 <sup>a</sup>	10,33 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,25
<i>Bacillus pumilus</i> BDL07	14,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	10,17 ± 0,28 <sup>a</sup>	1,40
<i>Bacillus megaterium</i> APF. SG3 Isox	11,67 ± 0,57 <sup>a</sup>	10,83 ± 1,04 <sup>a</sup>	1,07
<i>Bacillus toyonensis</i> ACO. PR1 Isox	14,67 ± 1,52 <sup>a</sup>	11,83 ± 1,25 <sup>a</sup>	1,24

Legenda: Os valores representam a média das triplicatas ± desvio padrão. As letras diferentes nas colunas do mesmo parâmetro indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), enquanto letras iguais indicam que os valores obtidos não diferem entre si.

Sistemas celulolíticos completos são produzidos por diferentes espécies de bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas ou estrictas (BOM *et al.*, 2008). Dentre elas, as comumente reportadas são dos gêneros *Cellulomonas*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Sporocytophaga*, *Streptomyces* (WIRTH & ULRICH, 2002), as espécies de *B. pumilus* (ARIFFIN *et al.*, 2008), *B. subtilis* (KIM *et al.*, 2009) e *B. flexus* (TRIVEDI *et al.*, 2010).

As diferenças nos tamanhos das zonas claras, presumivelmente devem-se às distintas atividades hidrolíticas em CMC (RAFEDZI & MATRHEWS, 2015). Os diâmetros das zonas claras obtidos no presente estudo são semelhantes aos relatados por Poszytek *et al.* (2016) utilizando estirpes de *Bacillus* spp., as quais variaram de 15-44 mm. Archana *et al.* (2016), utilizando cepas de *Proteus vulgaris* e *Serratia ficaria*, obtiveram diâmetros de hidrólise com valores de 23 mm e 18 mm, respectivamente.

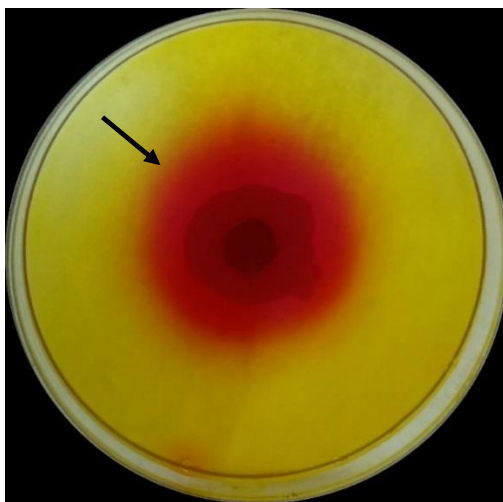
De acordo com Fungaro & Maccheroni (2002), IE > 1,0 é indicativo de excreção de enzimas. Porém, Bispo (2010) utiliza valores de IE > 2,0 como característicos de atividade enzimática significativa. As estirpes estudadas apresentaram zonas claras que variaram de 11,67

a 14,67 mm de diâmetro e IE > 1,0. O isolado de *B. pumilus* (BDL07) apresentou o maior IE quando comparado aos demais isolados testados, com a menor colônia no mesmo tempo de cultivo. Segundo Ruegger & Tauk-Tornisielo (2004) e Braga *et al.* (2009) mesmo o microrganismo apresentando menor crescimento e, conseqüentemente, menor produção de biomassa, ainda assim este pode apresentar um elevado potencial de produção e excreção de celulase. Portanto, o teste do vermelho Congo revela-se, através da obtenção do IE, um ótimo teste preliminar de seleção de microrganismos produtores de celulase, e esse teste qualitativo demonstra que as linhagens bacterianas estudadas são produtoras de enzimas celulolíticas.

### 5.2.2 Atividade proteolítica

Os isolados bacterianos foram inoculados em meio sólido ágar-gelatina 0,4 % (p/v) para a determinação qualitativa da atividade proteolítica, utilizando-se depois o corante vermelho de fenol para evidenciar a atuação enzimática (zonas róseas) ao redor das colônias (**Figura 12**). Dentre os quatro microrganismos estudados, todos os isolados de *Bacillus spp.* foram capazes de produzir proteases ao longo de 48 h de incubação.

**Figura 12-** Atividade proteolítica *in vitro* para o isolado de *Bacillus pumilus* (BDL07) cultivados em meio ágar-gelatina 0,4%, por 48 h ( $32 \pm 2$  °C, escuro). A seta indica a mudança de coloração ao redor da colônia bacteriana (halo rósea), após revelação com o corante vermelho de fenol 2 %, indicando atividade positiva para produção de protease. **Fonte:** Autor, 2015.



RIFFEL *et al.* (2003) descreveram que a atividade proteolítica dos microrganismos pode ser confirmada através de ensaios em meios sólidos com substratos protéicos, nos quais a formação de halo característico indica a produção da enzima estudada. Diversos autores têm utilizado o meio contendo ágar-gelatina a fim de identificar qualitativamente a produção de enzimas proteolíticas (ABIRAMI *et al.*, 2011; GEETHANJALI & SUBASH, 2011; SEVIC & DEMIRKAN, 2011; SMITA *et al.*, 2012; SINHA *et al.*, 2013).

Além da observação da formação de halos róseos ao redor das colônias, foi realizada a medida dos diâmetros dos halos de degradação e do crescimento das colônias, bem como o cálculo dos seus respectivos IE (Tabela 5).

**Tabela 5** - Diâmetros dos halos de hidrólise de gelatina e das colônias das estirpes de *Bacillus* spp. estudadas, cultivadas em meio ágar-gelatina como única fonte de carbono, após 48 h de incubação em estufa BOD ( $32 \pm 2$  °C, no escuro), e cálculo do índice de atividade enzimática (IE).

Atividade enzimática Microorganismos	Protease		
	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	IE
<i>Bacillus thuringiensis</i> BDLJ2	43,33 $\pm$ 3,05 <sup>a</sup>	19,00 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup>	2,28
<i>Bacillus pumilus</i> BDL07	43,00 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	14,67 $\pm$ 2,51 <sup>b</sup>	2,93
<i>Bacillus megaterium</i> APF. SG3 Isox	43,67 $\pm$ 4,93 <sup>a</sup>	23,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup>	1,87
<i>Bacillus toyonensis</i> ACO. PR1 Isox	44,00 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	9,67 $\pm$ 1,52 <sup>b</sup>	4,55

Legenda: Os valores representam a média das triplicatas  $\pm$  desvio padrão. As letras diferentes nas colunas do mesmo parâmetro indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), enquanto letras iguais indicam que os valores obtidos não diferem entre si.

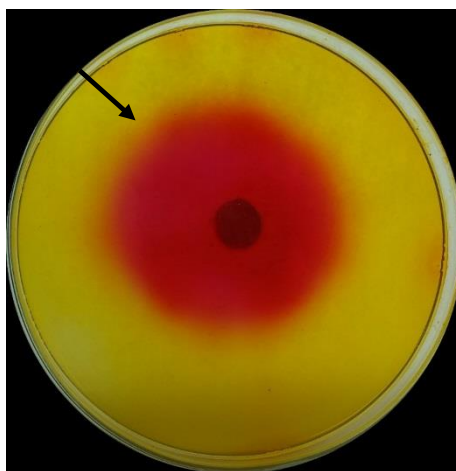
De acordo com Richa *et al.* (2009), a atividade hidrolítica de microrganismos pode ser classificada em três grupos, isto é, excelente (IE > 5), moderado (IE > 2,0 a, 5,0) e pobre (IE < 2) produtor de protease. Entre as estirpes estudadas, apenas o isolado de *B. megaterium* (LBPMA-APF. SG3 Isox) apresentou IE < 2,0, sendo assim classificado como um pobre produtor da gelatinase. Além disso, observa-se que as estirpes apresentaram zonas claras que variaram de 43 a 44 mm de diâmetro. Gill *et al.* (2016), utilizando estirpes de *B. megaterium* e *B. subtilis*, obtiveram halos de hidrólise de 12 e 14 mm, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Pant *et al.* (2015) ao utilizar estirpes de *B. subtilis*, o qual obteve um diâmetro do halo de hidrólise de 22 mm. Lima (2013), utilizando cepas de *Bacillus* spp. e aplicando a técnica qualitativa em meio sólido, também conseguiu identificar 8 cepas capazes de produzir enzimas proteolíticas.

Dessa forma, os resultados obtidos no teste qualitativo para a seleção de bactérias proteolíticas também mostraram que diferentes isolados de um mesmo gênero, assim como aqueles de uma mesma espécie, podem apresentar diferentes expressões de proteases, ou seja, a produção da enzima é específica para uma estirpe (SOUZA, 2015).

### 5.2.3 Atividade lipolítica

No presente estudo, utilizou-se Tween™ 80 como substrato pois buscava-se a produção de lipases (TRIGIANO *et al.*, 2010), já que esterases hidrolisam facilmente ligação éster com ácidos graxos de cadeia curta, como ocorre no Tween™ 20, que possui ácido láurico (KUMAR *et al.*, 2012). Assim, os ácidos graxos liberados do Tween alteram o pH do meio ao redor da colônia e respondem à coloração com o vermelho de fenol na forma de um halo róseo (**Figura 13**).

**Figura 13-** Atividade lipolítica *in vitro* para o isolado de *Bacillus toyonensis* (ACO. PR1 Isox) cultivados em meio agar-Tween 80 por 48 h, a  $32 \pm 2$  °C, no escuro. A seta indica a mudança de coloração ao redor da colônia bacteriana (halo róseo), após revelação com o corante vermelho de fenol 2 %, indicando atividade positiva para produção de lipase. **Fonte:** Autor, 2015.



Segundo MESSIAS *et al.* (2011), a detecção de halos transparentes ao redor das colônias de microrganismos cultivados num meio sólido contendo um substrato lipídico – como a tributirina, a trioleína, o azeite de oliva ou o sintético Tween™ 80 (um álcool de glicídio com cinco carbonos, o sorbitol, esterificados com ácido oléico, isto é, 2-[2-[3,4-bis(2-hidroxietoxi)oxolan-2-il]-2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etil octadec-9-enoato) –, é um método útil para a triagem qualitativa de microrganismos que hidrolisam lipídios. A intensidade da atividade enzimática (IE) foi determinada medindo-se os diâmetros das zonas claras em torno das colônias e dos crescimentos destas, como mostra a **Tabela 6**.

Entre as estirpes estudadas, *B. toyonensis* (LBPMA-ACO. PR1 Isox) e *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) apresentaram os maiores índices enzimáticos (IE > 2,0), sendo assim classificados como ótimos produtores da enzima de interesse. As estirpes que obtiveram maiores IE apresentaram zonas claras que variaram de 75 a 78 mm de diâmetro.

**Tabela 6-** Diâmetros dos halos de hidrólise de lipídio das colônias das estirpes de *Bacillus spp.* estudadas, cultivadas em meio ágar-Tween 80 como única fonte de carbono, após 48 h de incubação em estufa BOD ( $32 \pm 2$  °C, no escuro), e cálculo do índice de atividade enzimática (IE).

Atividade enzimática Microorganismos	Lipase		
	Diâmetro do halo (mm)	Diâmetro da colônia (mm)	IE
<i>Bacillus thuringiensis</i> BDLJ2	39,00 ± 2,64 <sup>b</sup>	24,33 ± 1,15 <sup>a</sup>	1,60
<i>Bacillus pumilus</i> BDL07	78,67 ± 6,11 <sup>a</sup>	34,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	2,31
<i>Bacillus megaterium</i> APF. SG3 Isox	35,67 ± 4,72 <sup>b</sup>	21,00 ± 5,29 <sup>a</sup>	1,70
<i>Bacillus toyonensis</i> ACO. PR1 Isox	75,67 ± 3,21 <sup>a</sup>	31,33 ± 5,00 <sup>a</sup>	2,41

Legenda: Os valores representam a média das triplicatas ± desvio padrão. As letras diferentes nas colunas do mesmo parâmetro indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), enquanto letras iguais indicam que os valores obtidos não diferem entre si.

O potencial biotecnológico de *Streptomyces* para produzir lipases e esterases também foi evidenciado por Karanja *et al.* (2010), os quais relataram IE de 5,3 para a degradação de Tween 80®, enquanto Van Der Sand *et al.* (2014) afirmam que a triagem para aplicação é mais promissora utilizando-se IE médio de 7,6 para atividade lipolítica. No entanto, alguns autores afirmam que lipases e esterases apresentam preferência por substratos, e conseqüentemente as suas atividades variam de acordo com a composição dos óleos usados (NITHANGENI *et al.*, 2001; EDEM, 2002), sendo influenciadas pelas condições do ambiente de crescimento. Meneses *et al.* (2016), por exemplo, avaliando o desempenho de cepas de *Rizobium* em ágar-Tween 80®, observaram valores de IE lipolítica que variavam de 0,76 a 4,31. No presente estudo, os resultados obtidos no teste qualitativo também permitiram constatar que o referido meio de cultura é eficaz para a seleção de bactérias lipolíticas.

### 5.3 Determinação quantitativa da produção de enzimas extracelulares e/ou biofloculante

Após realizados os testes qualitativos para produção das enzimas extracelulares, as cepas de *Bacillus spp.* foram submetidas as análises quantitativas de produção de enzimas extracelulares e/ou biofloculante por cultivo submerso.

#### 5.3.1 Determinação quantitativa da atividade celulolítica

Como os testes em meio sólido são qualitativos e semi-quantitativos, a atividade celulolítica das linhagens selecionadas foi avaliada quantitativamente usando o método do ácido dinitrosalicílico (DNSA) (MILLER, 1959), e 1 % de CMC como substrato preferencial para endoglucanases (CMCase) (CAO & TAN, 2002; FARINAS *et al.*, 2011).

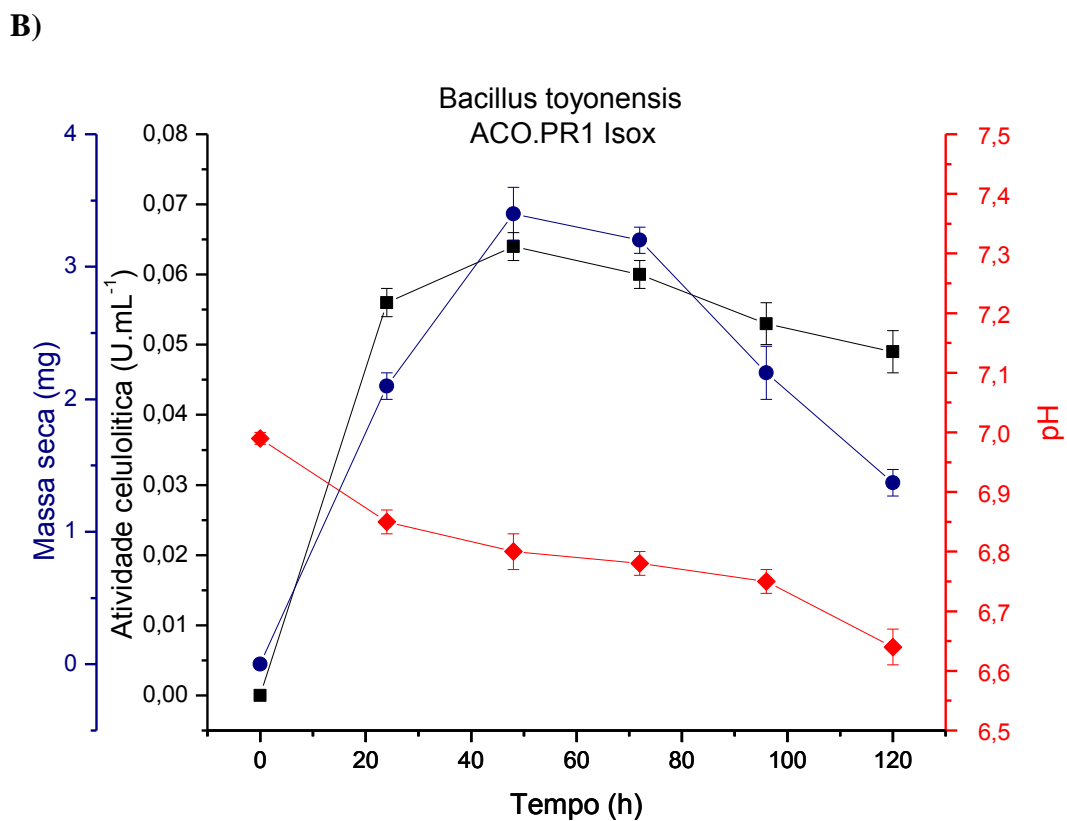
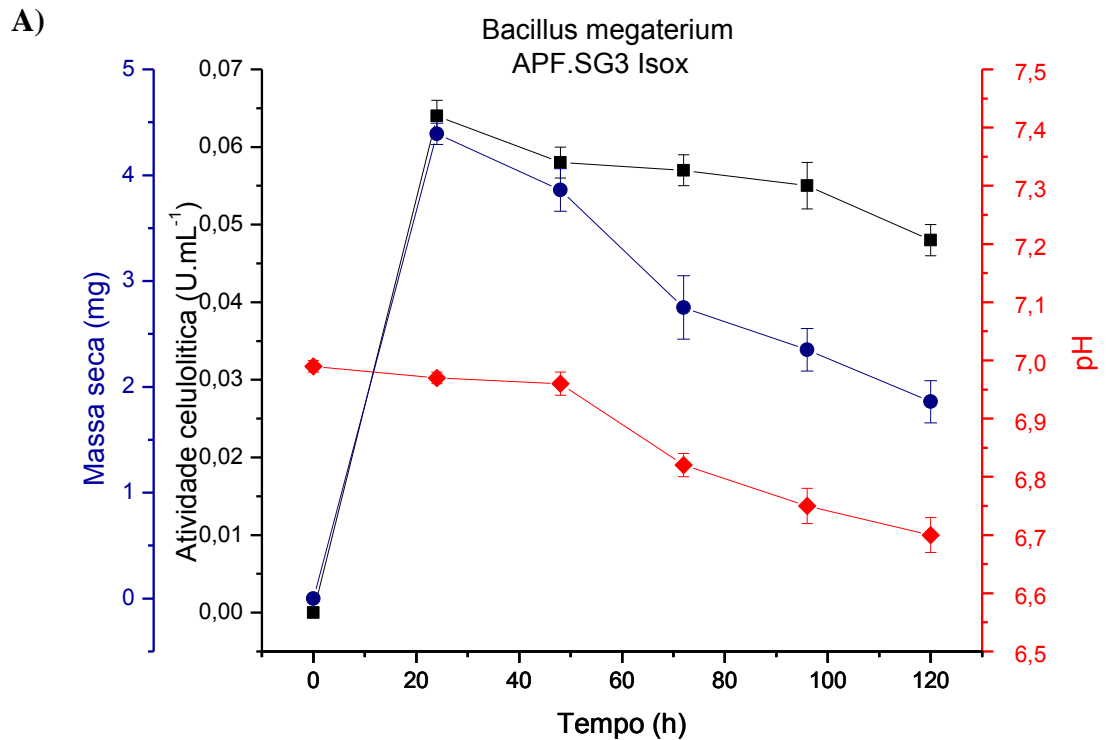


Para algumas espécies do gênero *Bacillus*, o pH mais próximo da neutralidade favorece seu crescimento (SHARMA, 2009). Khatiwada *et al.* (2016), utilizando estirpes de *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Serratia sp.*, constataram a produção celulásica ótima para as duas primeiras a 37 °C, e para a última a 35 °C. Além disto, a melhor produção de celulase por todos os isolados bacterianos avaliados pelos autores foi em pH inicial 7,0. Poszytek *et al.* (2016), por sua vez, estudando as condições de crescimento de cultivo para diferentes espécies de *Bacillus*, verificaram que temperatura de 30 °C e pH 7,0 mostraram-se ideais, e outros relatos sobre o pH inicial e temperatura ótima para a produção de celulases remetem a boa eficiência a 30 °C e pH 7,0 (PRADIP SAHA *et al.*, 2012; SALAM *et al.*, 2013).

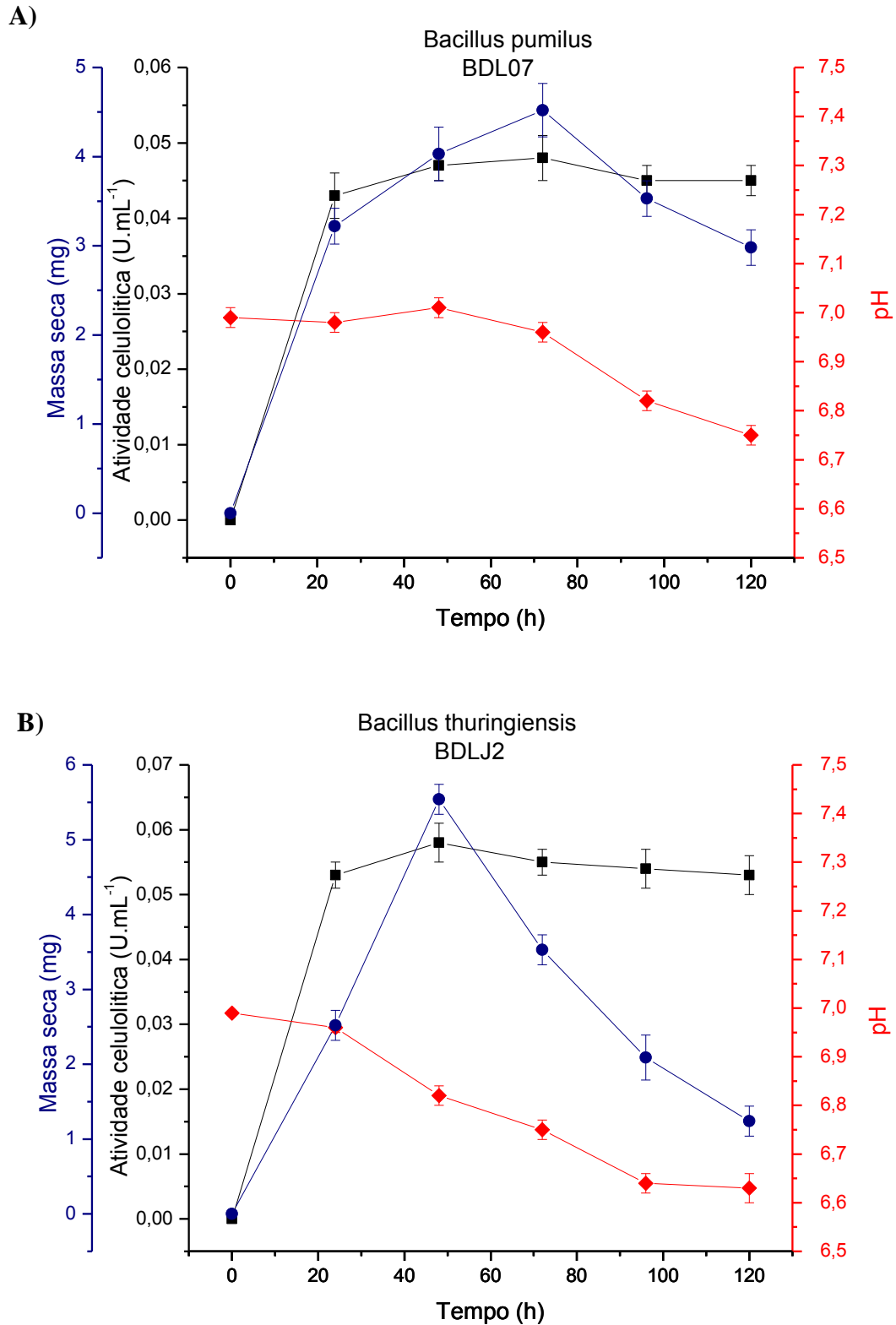
Os resultados obtidos na avaliação do crescimento celular (massa seca) permitiram verificar a relação positiva existente entre o referido parâmetro e a atividade da celulase. Isso indica que as bactérias estudadas utilizaram CMC para gerar a glicose a ser usada como fonte principal de carbono e de energia, corroborando com os resultados de outros autores (SIVAKUMAR *et al.*, 2016).

Conforme as **Figuras 14 e 15**, o cultivo submerso para os isolados testados permitiu constatar que o pH do meio foi mantido próximo da neutralidade em todos os intervalos de tempo amostrados.

**Figura 14-** Atividade celulolítica ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. megaterium* (LBPMA- APF.SG3 Isox) e B) *B. toyonensis* (LBPMA- ACO.PR1 Isox), em meio contendo carboximetilcelulose (CMC). Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



**Figura 15-** Atividade celulolítica ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e B) *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo carboximetilcelulose (CMC). Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



Nas primeiras 48 h de incubação (**Figura 14 e 15**), a produção da CMCase elevou-se acentuadamente nas culturas estudadas (concentração decrescente de CMC), com exceção do isolado de *B. megaterium*, onde o mesmo atingiu sua maior produção nas primeiras 24 h de cultivo. A produção de CMCase foi paralela ao crescimento (avaliado por gravimetria). Em seguida, o crescimento ou foi declinando – morte celular mais intensa que duplicação –, como no caso de *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2) e *B. megaterium* (LBPMA- APF.SG3 Isox), ou ficou mais lento até 72 h (fase estacionária) para depois declinar mais acentuadamente, como para *B. pumilus* (LBPMA- BDL07) e *B. toyonensis* (LBPMA- ACO.PR1 Isox), quando provavelmente a fonte de carbono se exauriu.

Houve variação do pico máximo da atividade enzimática de cada espécie ao longo do tempo, sendo este de 24 h ( $0,064 \text{ U.mL}^{-1}$ ) para *B. megaterium* (LBPMA- APF.SG3 Isox), 48 h ( $0,058 \text{ U.mL}^{-1}$ ) para *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2) e  $0,064 \text{ U.mL}^{-1}$  para *B. toyonensis* (LBPMA- ACO.PR1 Isox), e 72 h ( $0,048 \text{ U.mL}^{-1}$ ) para o isolado de *B. pumilus* (LBPMA- BDL07). Estudos realizados por Padilha *et al.* (2015), sobre a produção e caracterização da CMCase termófila produzida por *Bacillus* sp. em cultivo submerso, revelaram atividade celulolítica máxima ( $0,38 \text{ U.mL}^{-1}$ ) após 72h de incubação, enquanto trabalho efetuado por Ariffin *et al.* (2008), com cepa de *B. pumilus* cultivado em meio CMC como única fonte de carbono a  $37^\circ \text{C}$ , apresentou pico máximo de atividade enzimática ( $0,076 \text{ U.mL}^{-1}$ ) após 48 h do início do experimento.

Poszytek *et al.* (2016), utilizando estirpes de *B. pumilus* e de *B. aerius*, verificaram que após 72 h de cultivo valores de atividade celulásica foram de  $0,21 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,59 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, deve-se enfatizar que é muito relativo comparar a atividade endoglucanase de várias bactérias e determinar se seu valor é alto ou baixo pois as estirpes descritas na literatura foram cultivadas sob diferentes condições.

### 5.3.2 Determinação quantitativa da atividade proteolítica

Após cultivar as estirpes de *Bacillus* spp. em meio líquido contendo proteína como fonte específica de carbono e nitrogênio, a quantificação da atividade proteásica baseou-se na concentração de aminoácidos libertos do substrato, adicionando-se ácido tricloroacético (10 %) para inibir a enzima e precipitar as proteínas.

Para os isolados testados, a máxima atividade proteásica (MAP) coincidiu com o maior crescimento ao longo do tempo, sendo este mais drástico nas primeiras 48 h para *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2) e *B. toyonensis* (LBPMA-ACO.PR1 Isox) (MAP respectivamente de  $0,083 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,121 \text{ U.mL}^{-1}$ ), enquanto que o crescimento dos isolados *B. pumilus* (LBPMA-

BDL07) e *B. megaterium* (LBPMA-APF. SG3 Isox) no mesmo meio foi mais acentuado nas 72 h iniciais da incubação (MAP respectivamente de 0,083 U.mL<sup>-1</sup> e 0,085 U.mL<sup>-1</sup>).

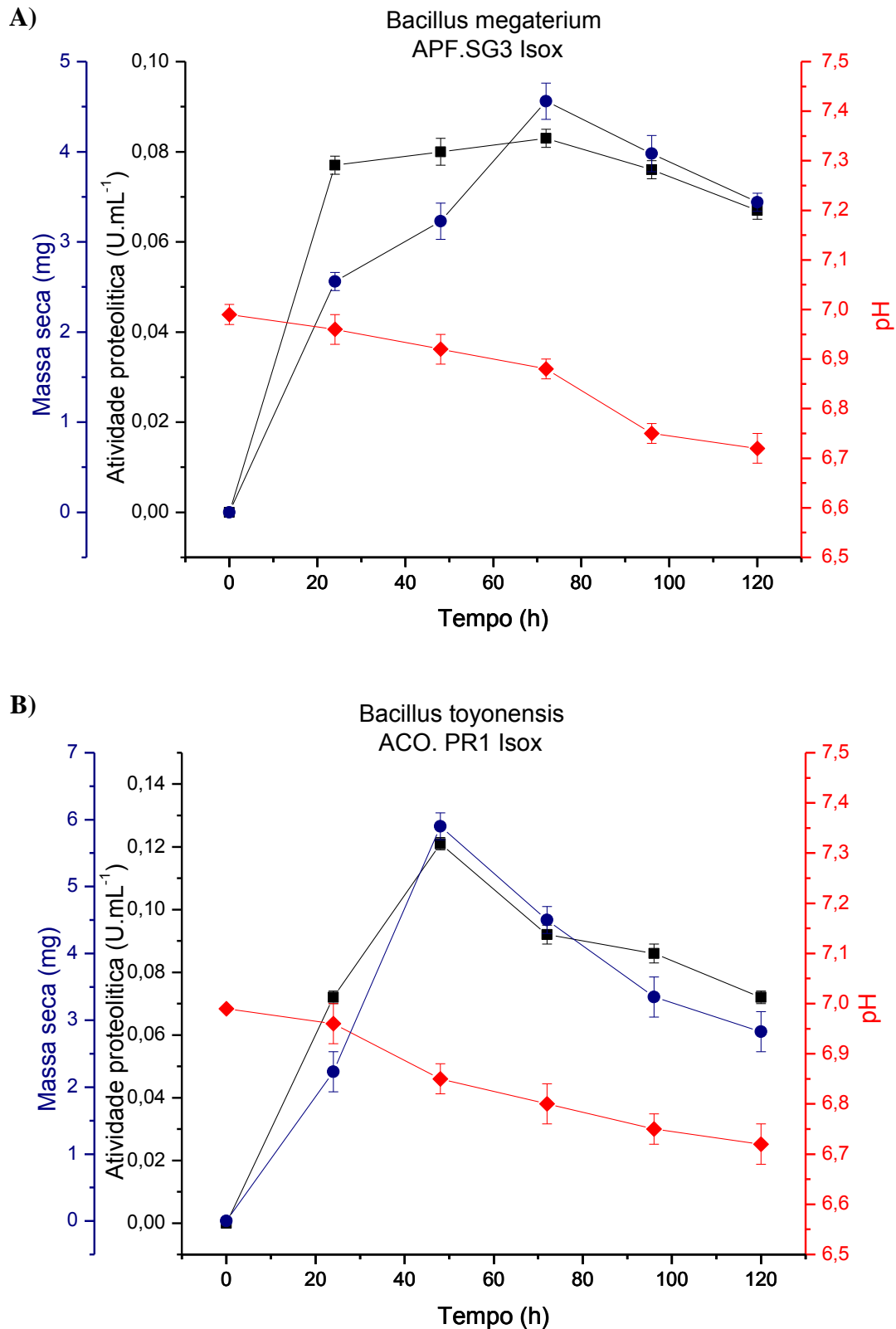
Verificou-se que *B. thurigiensis* (LBPMA-BDLJ2) atingiu a mesma MAP de *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) num tempo mais curto, e apesar do pH das culturas manter-se na faixa da neutralidade ao longo do período analisado, a MAP atingida em um período menor pode ser explicado não só pelo acúmulo dos aminoácidos livres, mas também pelo seu catabolismo com liberação de amônia para utilização do esqueleto carbônico como fonte de energia. Em meio aquoso, a amônia captura um próton da molécula de água, com formação do hidróxido de amônio e consequente alcalinização do meio (MARQUADT, 2003).

Segundo Kim *et al.* (2002), o pH ótimo para *B. stearrowthermophilus* secretar proteases é de 7,5. Por outro lado, Dorcas & Pindi (2016), utilizando cepas de *B. cereus* obtiveram MAP na faixa de pH 7-8,0 e a mais baixa foi observada a pH 5. O período de incubação, assim como o pH do meio e temperatura de incubação – os quais podem alterar a estabilidade da enzima e, portanto, a velocidade da reação enzimática, além de afetar as condições fisiológicas em geral – desempenham um papel importante, isolados ou de forma combinada, na MAP (FERRO, 2002; LIMA, 2009; DORCAS & PINDI, 2016).

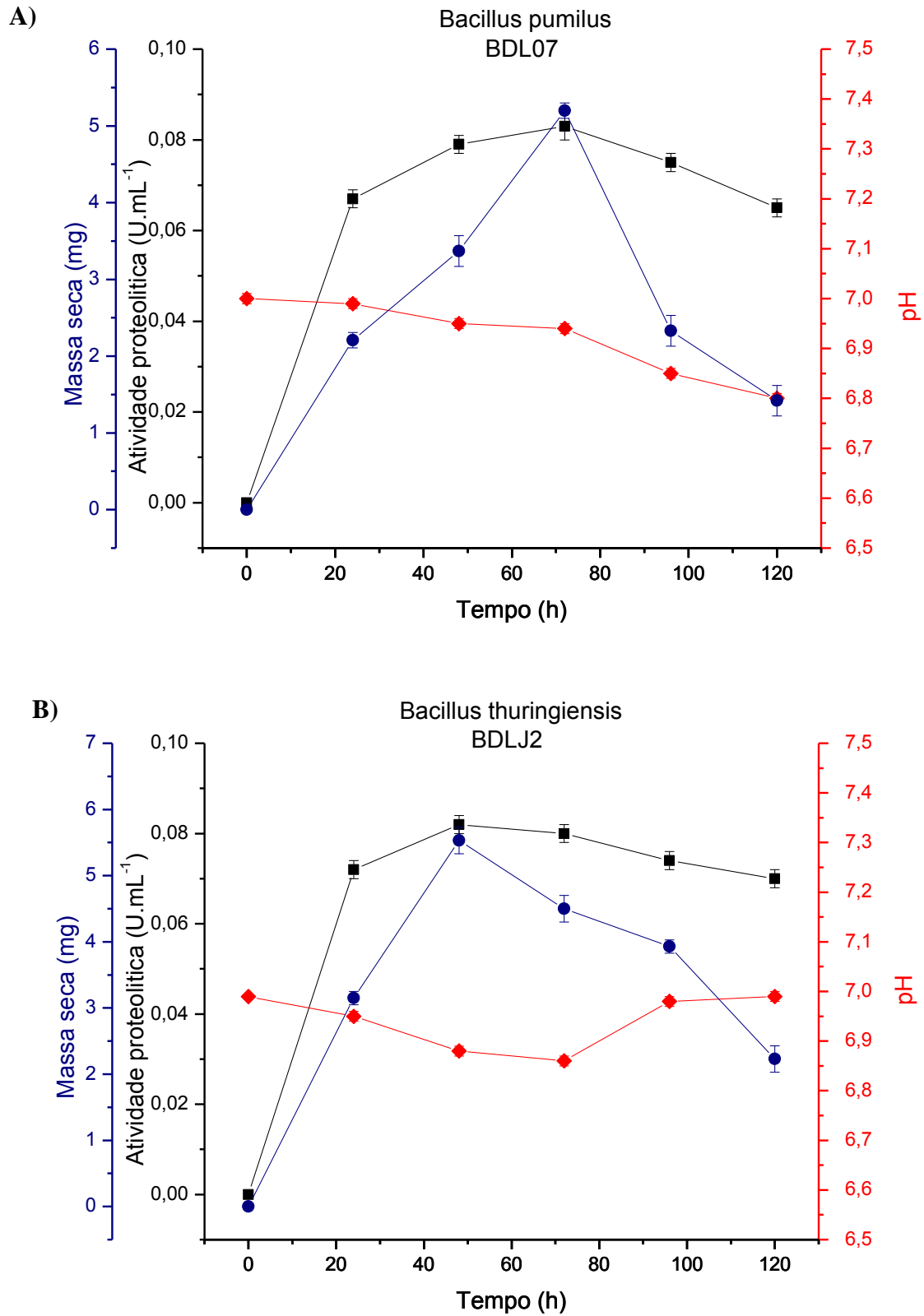
Adinarayana *et al.* (2002) relatam que a temperatura de 37 °C foi a melhor para a produção de protease para cepas de *Bacillus sp.*, enquanto Dorcas & Pindi (2016) observaram que a atividade máxima de protease em *B. cereus* ocorreu a 37 °C.

Enquanto Pastor *et al.* (2001) constataram que a MAP para *B. subtilis* PE-11 ocorreu após 48 h de incubação, Nascimento & Martins (2006) concluíram que isolados de *Bacillus* secretam maior quantidade de proteases no final da fase exponencial. Já Ladeira *et al.* (2010), descreveram que apesar das estirpes desse gênero crescerem imediatamente após a inoculação, a secreção de protease só tem início após 6 h em meio contendo alta concentração de glicose, pois esse substrato provavelmente inibe o catabolismo imediato de proteínas (HADDAR *et al.*, 2010). Jani *et al.* (2016), por sua vez, detectaram MAP (59,18 U.mL<sup>-1</sup>) para cepas de *B. flexus* após 96 h de incubação. Os resultados dos parâmetros analisados ao longo do tempo podem ser observados nas **Figuras 16 e 17**.

**Figura 16-** Atividade proteolítica ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo caseína como substrato. Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



**Figura 17-** Atividade proteolítica ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e B) *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo caseína como substrato. Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



### 5.3.3 Determinação quantitativa da atividade lipolítica

O cultivo submerso em meio contendo azeite de oliva mostrou ser um processo bastante eficaz para a produção de enzimas lipolíticas. Com os resultados obtidos, verifica-se que a máxima atividade lipolítica (MAL) dos isolados analisados (0,274 U.mL<sup>-1</sup> para *Bacillus thuringiensis* LBPMA-BDLJ2, 0,450 U.mL<sup>-1</sup> para *Bacillus pumilus* LBPMA-BDL07, 0,115 U.mL<sup>-1</sup> para *Bacillus toyonensis* LBPMA- ACO.PR1 Isox e 0,552 U.mL<sup>-1</sup> para *Bacillus megaterium* LBPMA- ACO.SG3 Isox), correspondeu também ao máximo crescimento celular e início de fase de declínio às 72 h de incubação (medida da massa seca). Estes resultados estão de acordo com o descrito por Borzani *et al.* (2005) e Tumang (2006), isto é, pelo mecanismo de produção de biomassa e enzima, com predomínio de conversões produtoras de energia (metabolismo oxidativo) no início do cultivo para aumento de biomassa, e, depois, atenuação desse metabolismo para produção de mais enzima hidrolítica. Portanto, a produção de lipase está associada ao crescimento microbiano (EDWINOLIVER *et al.*, 2010) e o azeite de oliva mostrou-se uma alternativa de baixo custo como substrato (GUPTA *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2004; MESSIAS *et al.*, 2009).

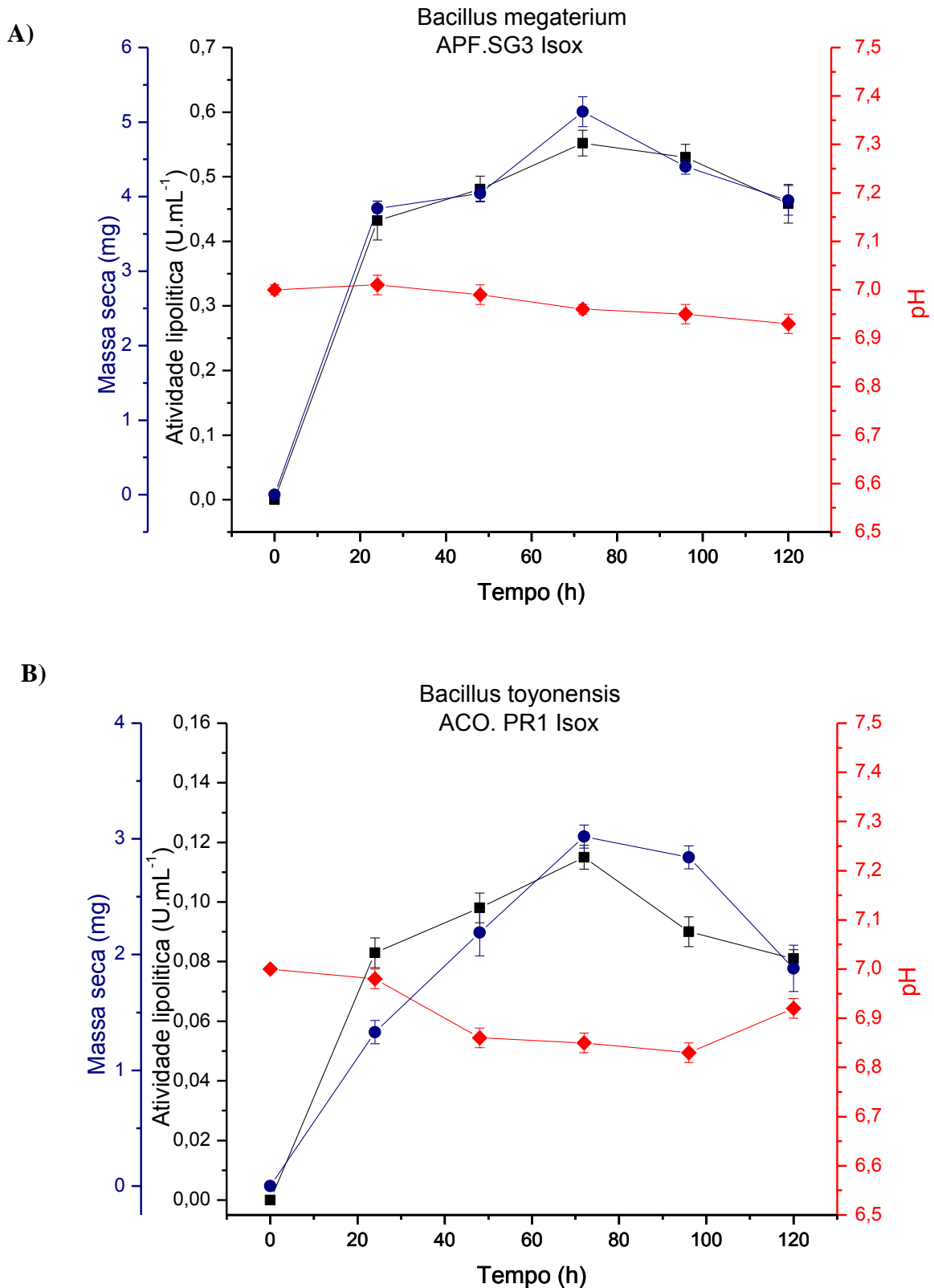
Chaturvedi *et al.* (2016), utilizando óleos vegetais para produção de lipase por estirpes de *Bacillus spp.* a uma temperatura de 37 °C, obtiveram um baixo nível de atividade enzimática (0.0052 U.mL<sup>-1</sup>) após 72 h de incubação. Os autores justificam que esse resultado ocorreu provavelmente devido ao esgotamento de triglicerídeos para os microrganismos ou devido a proteólise. Os resultados dos parâmetros analisados ao longo do tempo podem ser observados nas **Figuras 18 e 19**.

Por outro lado, Pukančíková *et al.* (2016), estudando cepas de *Pseudomonas lundensis* cultivadas no mesmo substrato, detectaram MAL de 1,72 U.mL<sup>-1</sup>.

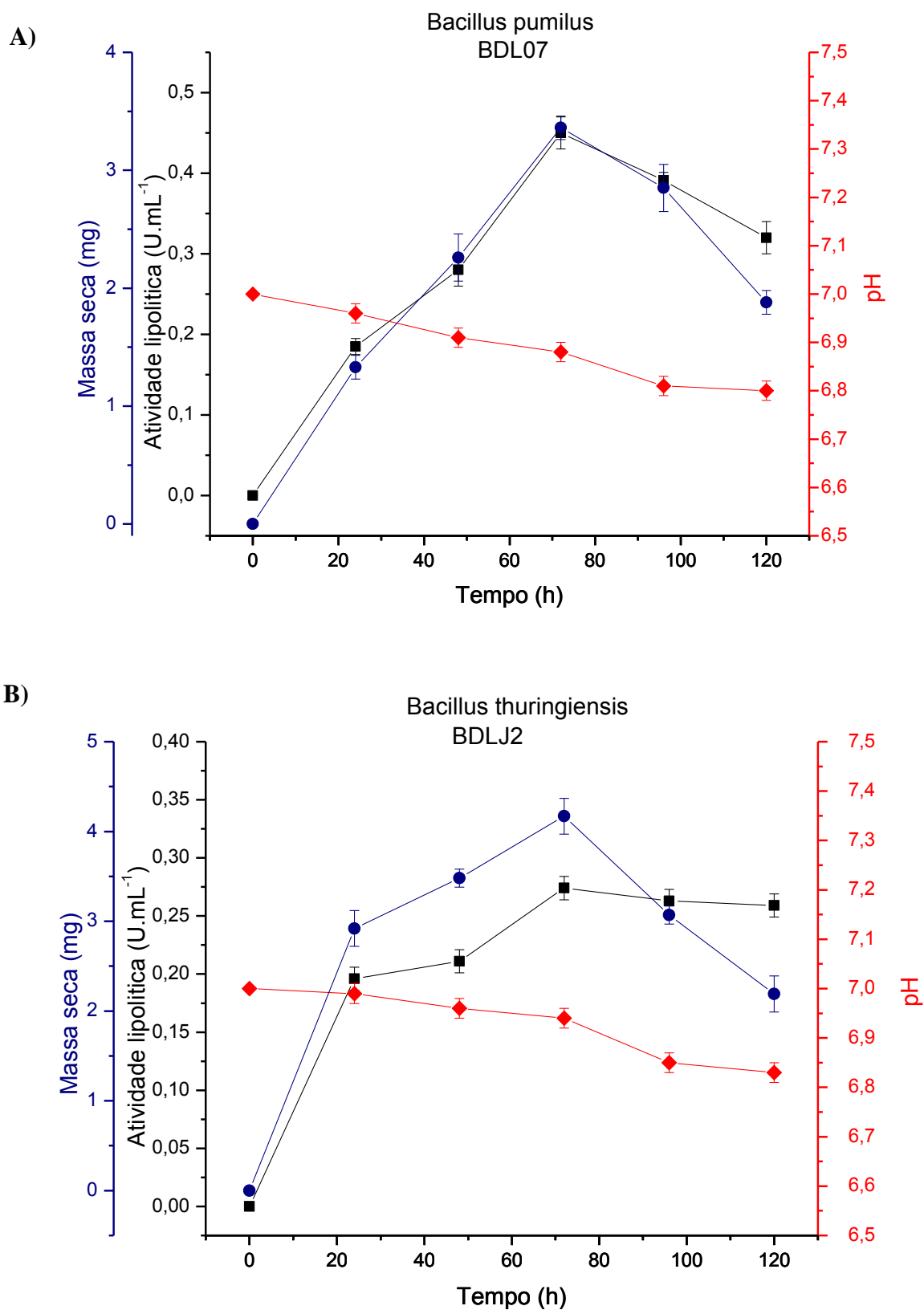
Com relação ao pH, verificou-se que houve uma pequena variação ao longo de 120 h de incubação das culturas, provavelmente em face da liberação de ácidos graxos após a hidrólise enzimática. Segundo Ruiz *et al.* (2002), existem lipases que atuam em ampla faixa de pH, como a de *B. megaterium* (pH entre 4,0 e 12,0). Porém, estudos de Lima *et al.* (2004), com uma estirpe da mesma espécie, revelaram uma faixa de pH de atuação entre o ácido e o neutro (ótimo entre 5,0 e 7,0). Por outro lado, Kambourova *et al.* (2003) há haviam identificado lipases bacterianas que atuam mais eficazmente em pH neutro a alcalino, como no caso daquelas de *B. stearothermophilus* MC7, cujo ótimo está entre 7,5 e 9,0.



**Figura 18-** Atividade lipolítica ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo azeite de oliva. Os resultados estão expressos como média de triplicatas.  
**Fonte:** Autor, 2015.



**Figura 19-** Atividade lipolítica ( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a  $37^\circ\text{C}$ , no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e B) *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo azeite de oliva. Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



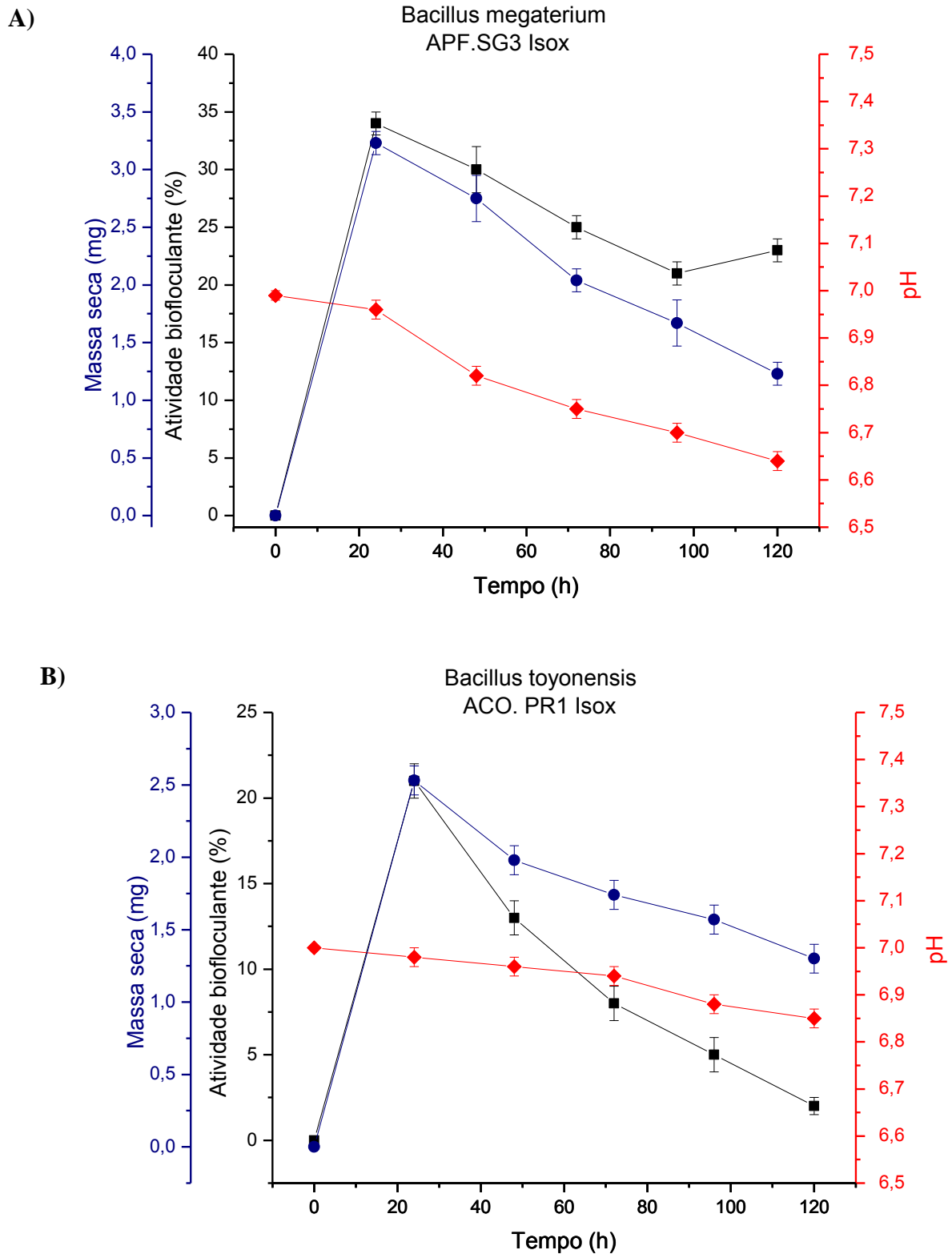
### 5.3.4 Avaliação da atividade biofloculante

As cepas de *Bacillus* ora estudadas foram capazes de sintetizar biofloculantes, progressiva e paralelamente ao crescimento ao longo do tempo de cultivo nas condições estabelecidas, o que corrobora com resultados de More *et al.* (2014).

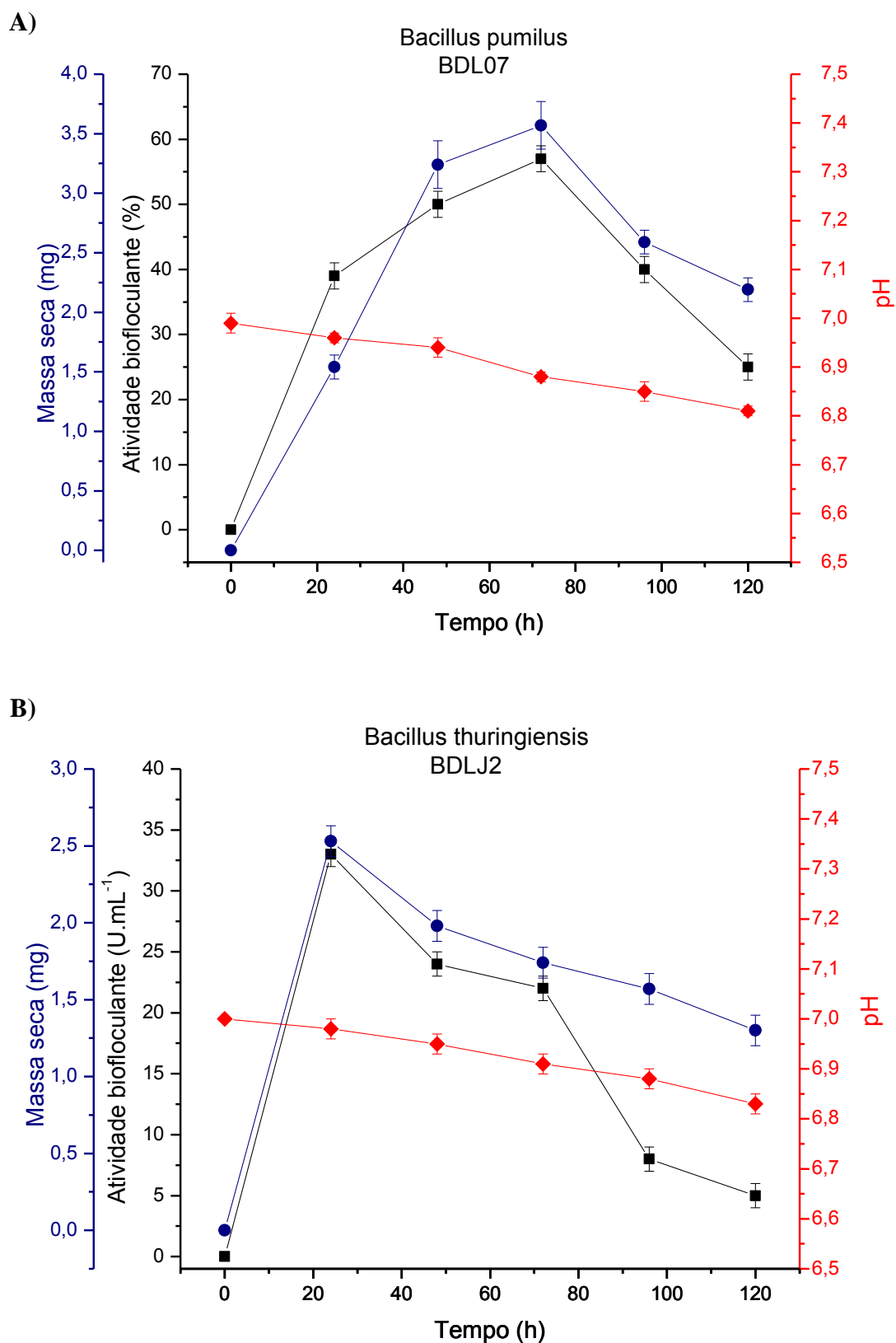
A máxima atividade floculante (MAF) foi de 57 % para o isolado de *B. pumilus* LBPMA-BDL07, após 72 h de cultivo, enquanto para *B. thuringiensis* LBPMA-BDLJ2, *B. toyonensis* LBPMA- ACO.PR1 Isox e *B. megaterium* LBPMA-ACO.SG3 Isox esta foi respectivamente de 33 %, 21 % e 34 %, após 24 h de cultivo. A partir desse tempo, a AF foi diminuindo, também proporcionalmente à biomassa seca no meio estudado. Os resultados obtidos corroboram com observações de Xia *et al.* (2008), que afirmam que MAF é atingida no início da fase estacionária. Isso é compreensível, pois à medida que o número de células decresce (em face da exaustão dos nutrientes), a secreção de produtos como biofloculantes também diminui (NWODO & OKOH, 2013). Os resultados dos parâmetros analisados ao longo do tempo podem ser observados nas **Figuras 20 e 21**.

Resultado semelhante foi observado por Yang *et al.* (2012), que relataram que o biofloculante produzido por *Klebsiella* sp. atingiu sua MAF (86,5 %) às 60 h de cultivo, assim como o biofloculante MBF-6 produzido por *Klebsiella pneumoniae* YZ-6 (MAF= 91,5 %, 60h). Okaiyeto *et al.* (2016), verificaram que estirpes de *Bacillus* sp. AEMREG7 obtiveram MAF de 85,8 % após 72 h de cultivo ativo. Outros estudos relatam que *B. mojavensis*, *B. licheniformis* X-14 e *Klebsiella* sp. TG-1 atingiram a MAF respectivamente após 24, 20 e 28 h (LI, 2009; ELKADY, 2011; COSA, 2013). Apesar do crescimento de fungos e bactérias apresentar tendências progressivas diferentes, o pico de velocidade de crescimento de *Aspergillus flavus* também foi associado à sua MAF (87,2%) após 60 h de incubação (ALJUBOORI *et al.*, 2013).

**Figura 20** - Atividade biofloculante (%), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio contendo glicose e avaliado com suspensão de caolim. Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



**Figura 21** - Atividade biofloculante (%), massa seca (mg) e pH durante 120 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de culturas dos isolados de: A) *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e B) *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo glicose e avaliado com suspensão de caolim. Os resultados estão expressos como média de triplicatas. **Fonte:** Autor, 2015.



As enzimas responsáveis pela produção de biofloculante são ativadas numa faixa de temperatura ótima, a qual varia entre 25 °C e 37 °C (SALEHIZADEH & SHOJAOSADATI, 2001, ZHANG *et al.*, 2007). No presente estudo, a temperatura constante de 37 °C favoreceu tanto o crescimento bacteriano como também a produção de biofloculante pelos isolados testados. Considerando-se que o pH inicial (7,0) do meio ao longo do cultivo não sofreu alterações significativas, é possível afirmar que o mesmo é eficiente para a produção de biofloculante.

Prasertsan *et al.* (2006) verificaram que a AF do biofloculante extraído de *Enterobacter cloacae* WD7 foi ótima quando o pH tem o valor de 6,0. Por outro lado, Li *et al.* (2010) verificaram que o biofloculante produzido por *Agrobacterium sp.* M-503 manteve uma elevada AF em pH neutro a alcalino (7-12).

Wang *et al.* (2011) observaram que a MAF do biofloculante CBF-F26 (cultura mista de *Rhizobium radiobacter* F2 e *B. sphaeicus* F6) ocorreu em condições alcalinas neutras e fracas, e Xiong *et al.* (2010) detectaram MAF de *B. licheniformis* CGMCC 2876 em pH 7,5. Com organismos não bacterianos, Deng *et al.* (2005) relataram que o biofloculante secretado pelo fungo *A. parasiticus* num intervalo de pH de 5-6, e o aumento do pH diminuiu a produção de biomassa e da AF, enquanto o pH mais baixo favoreceu a síntese, secreção e acúmulo do biofloculante no meio. Observou-se que a eficiência de floculação do biopolímero produzido pelo dinoflagelado *Gyrodinium impudicum* KG03 foi ótima dentro de um intervalo de pH de 3-6 (MAF em pH 4) (YIM *et al.*, 2007).

Vários outros fatores, além do pH (SALEHIZADEH & YAN, 2014), temperatura (NAKATA & KURANE, 1999), concentração de células e macro e micronutrientes, podem afetar a MAF num determinado meio. A velocidade de agitação, por exemplo, determina a concentração de oxigênio dissolvido disponível, o que interfere na absorção de nutrientes e reações enzimáticas de produção do floculante (LOPEZ *et al.*, 2003). À medida que os nutrientes se esgotam na cultura, o nível de oxigênio disponível aos microrganismos torna-se reduzido também, assim como aumentam os produtos de resíduos tóxicos da atividade metabólica, como a presença de alguma enzima defloculadora entre eles inclusive, o que afeta drasticamente o número de células ainda viáveis e o acúmulo de floculantes secretados (ZHENG *et al.*, 2008). Li *et al.* (2009) relataram que a ótima velocidade de agitação para produção de biofloculante pela cepa de *B. licheniformis* X14 é de 140-160 rpm.

## 5.4 Otimização dos componentes do meio de cultivo para produção de biofloculante

### 5.4.1 Efeito da fonte de carbono sobre atividade biofloculante

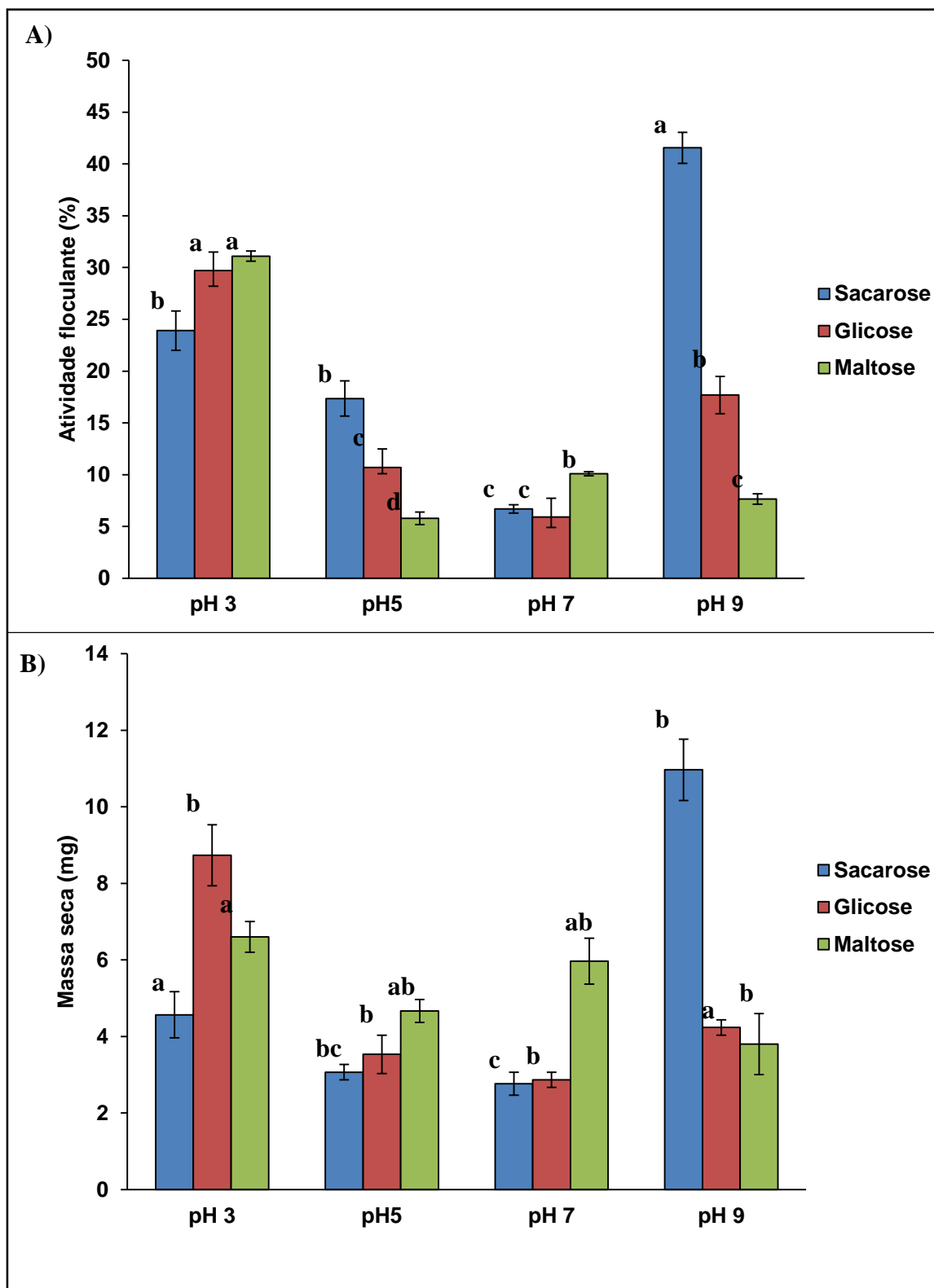
Várias fontes de carbono estimulam de forma distinta microrganismos específicos a produzirem de biofloculantes (PIYO *et al.*, 2011). O efeito de diferentes fontes de carbono (Sacarose, Glicose e Maltose), em quatro valores de pH 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0), para a produção de biofloculantes pelas estirpes estudadas de *Bacillus spp.* são apresentados nas **Figuras 22, 23, 24 e 25**.

Entre elas, a sacarose foi a fonte de carbono mais favorável para a produção de biofloculantes pelas estirpes de *B. megaterium* (LBPMA-APF. SG3 Isox) e *B. toyonensis* (LBPMA-ACO. PR1 Isox) ora estudadas, respectivamente com atividade biofloculante de 41 % e 39 % após 24 h de incubação. Já para os isolados de *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2) a maltose mostrou-se como a melhor fonte de carbono para estimular tal atividade biofloculante, respectivamente de 13 % e 25% após 24 h de incubação. Achados semelhantes foram relatados por Makapela *et al.* (2016) sobre a produção de biofloculantes por *B. pumilus*, em que a maltose e a sacarose foram as fontes de carbono favoráveis para a produção de biofloculante com 71,7 % e 69,8 %, respectivamente após 120 h de incubação. Da mesma forma, Wan *et al.* (2013) relataram que a maltose era a fonte de carbono preferida para a produção de biofloculantes por *Solibacillus silvestris* apresentando atividade floculante de 88,7 %, após as 72 h de incubação. Além disso, Luo *et al.* (2016) utilizando uma estirpe de *Bacillus megaterium* e sacarose como fonte de carbono, obtiveram valores de atividade biofloculante superiores a 80 % após 72 h de incubação.

Segundo Okaiyeto *et al.* (2016), a habilidade do microrganismo utilizar sacarose como fonte de carbono para a síntese de biofloculantes aponta para a possibilidade de se usar melaço na produção desse polímero em escala industrial. Essas descobertas sustentam as observações de que as preferências por fontes de carbono para produção de biofloculantes variam entre microrganismos (SALEHIZADEH & YAN, 2014).

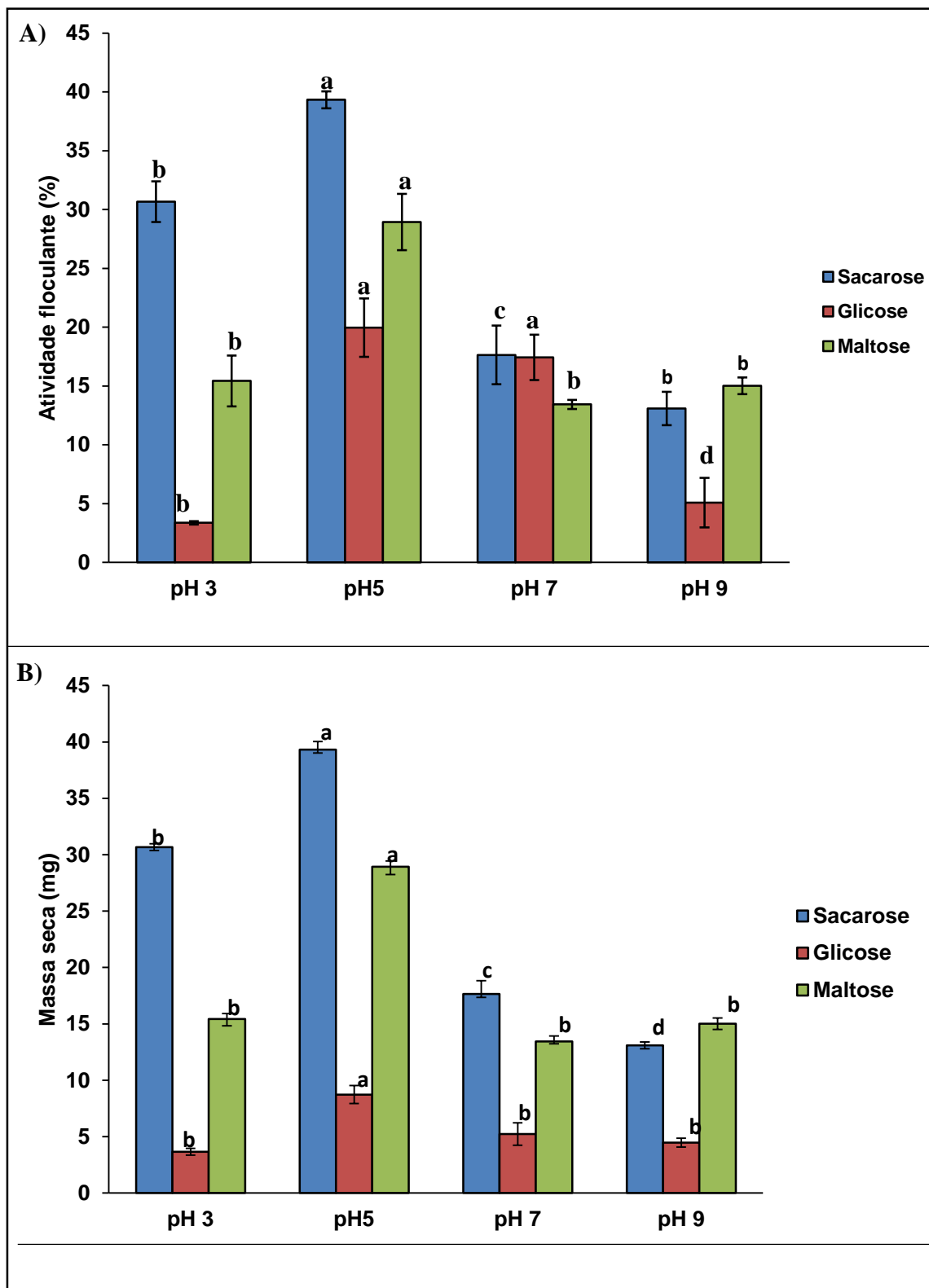
Com relação ao pH inicial dos cultivos, os melhores resultados para a produção de biofloculante foram obtidos em pH 5,0 para *B. toyonensis* (LBPMA- ACO.PR1 Isox) e *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2), pH 3,0 para o isolado de *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e pH 9,0 para o isolado de *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox).

**Figura 22** – Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) durante 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox). Os resultados estão expressos como média de triplicatas. As barras da mesma cor com letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Fonte:** Autor, 2016.

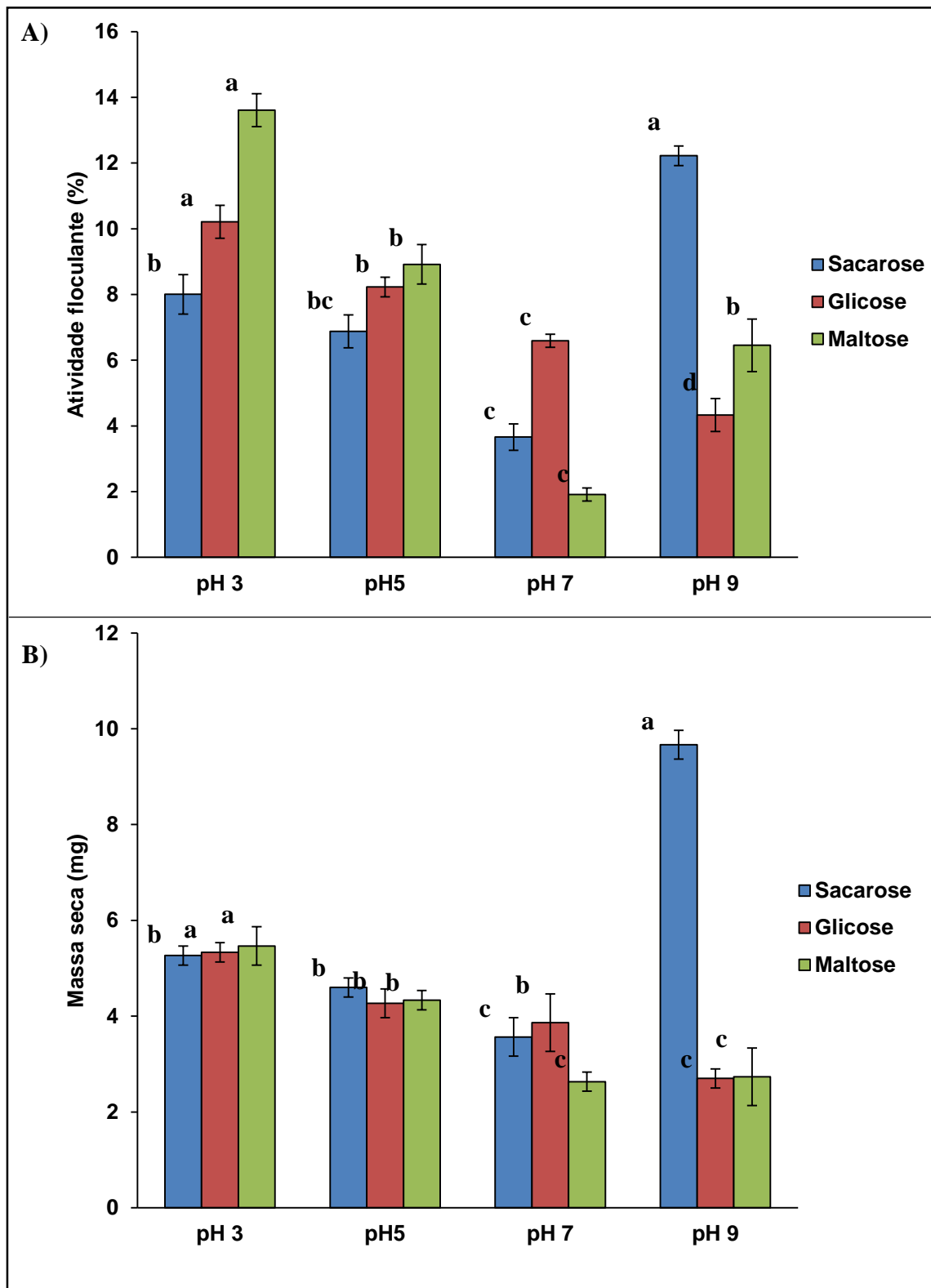




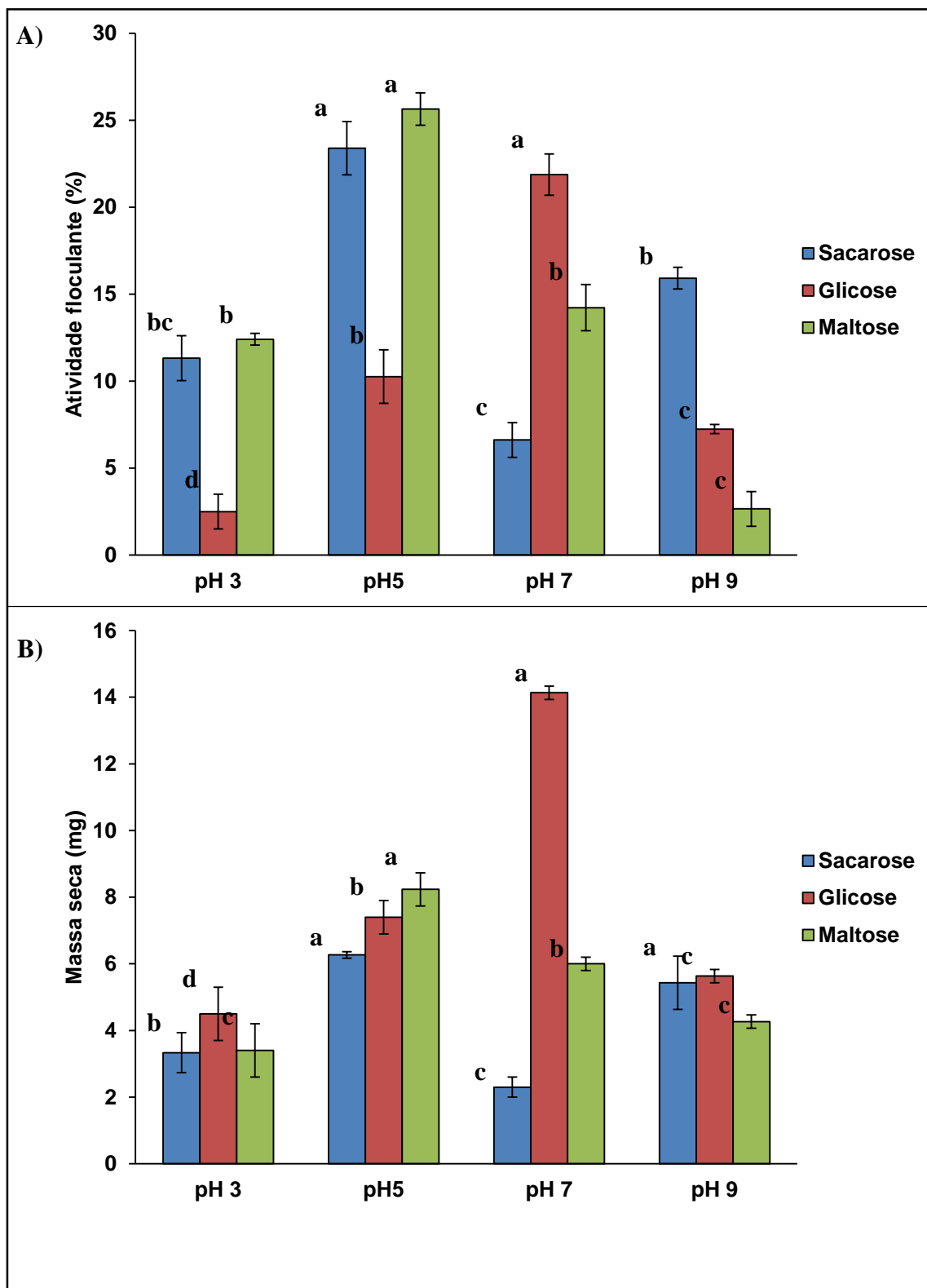
**Figura 23** – Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) durante 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox). Os resultados estão expressos como média de triplicatas. As barras da mesma cor com letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Fonte:** Autor, 2016.



**Figura 24** – Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) durante 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de *B. pumilus* (LBPMA- BDL07). Os resultados estão expressos como média de triplicatas. As barras da mesma cor com letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Fonte:** Autor, 2016.



**Figura 25** – Efeito das fontes de carbono e pH sobre: A) produção de biofloculante e B) massa seca (mg) durante 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) de cultura do isolado de *B. thuringiensis* (LBPMA- BDL07). Os resultados estão expressos como média de triplicatas. As barras da mesma cor com letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Fonte:** Autor, 2016.



De acordo com os achados de Choi *et al.* (1988) e de Zheng *et al.* (2008), estudando respectivamente os biofloculantes polissacarídicos da cianobactéria *Anabaera* sp. PC-1 e da bactéria *Bacillus* sp. F19, cujo pH de meio ideal para produção dos mesmos foi respectivamente 3,0 e 5,0, a atividade floculante diminui com o aumento do pH e isso pode ser devido à interferência do íon hidroxila (OH<sup>-</sup>) com a formação do complexo biofloculantes-argila, mediado pelos íons metálicos, levando à suspensão desta.

Por outro lado, com uma estirpe de *B. megaterium* cultivada em meios com pH variando de ácido a muito alcalino, Zheng *et al.* (2008) observaram atividade de floculação máxima em pH inicial 9,0. He *et al.* (2010), por sua vez, estudando a atividade de um biofloculante produzido por *Halomonas* sp. V3a, constataram que esta mostrou-se superior a 80 % na faixa de pH de 3-11, e a maior atividade de floculação (97 %) foi registrada em pH 7,0. O pH inicial ótimo do meio de crescimento para a produção de biofloculantes pelas estirpes *Bacillus* xn12 e *Streptomyces* xn17 com maior atividade de floculação (97 %) foi observada no pH 5,0 para ambas as cepas (ZHANG *et al.*, 2013). Por outro lado, Okaiyeto *et al.* (2015), utilizando uma estirpe de *B. toyonensis*, observaram que a melhor produção de biofloculantes ocorreu em condições ácidas, sendo a mais alta (65 %) em meio com pH inicial 5,0.

Portanto, diferentes bactérias produzem distintos biofloculantes em diferentes pHs, conforme a composição dos meios de cultivo e da classe química dos floculantes.

#### 5.4.2 Efeito da fonte de nitrogênio sobre atividade biofloculante

Para avaliar o efeito das fontes de nitrogênio, inicialmente foram escolhidas as melhores fontes de carbono e valores de pH do meio inicial de cultivo para a produção do biofloculante por cada isolado, utilizando-se a razão de sua atividade de floculação pela sua biomassa seca (A/m). Esses resultados são mostrados na **Tabela 7**. Por outro lado, vários microrganismos requerem a presença de fontes de nitrogênio orgânico ou inorgânico para produção de biofloculantes (UGBENYEN *et al.*, 2012), e o efeito das fontes de nitrogênio (orgânicas: peptona e uréia; inorgânica: sulfato de amônia) testadas na produção de biofloculantes pelas estirpes de *Bacillus* spp. estudadas, é mostrado na **Figura 26**.

A melhor fonte de carbono em termos de relação entre atividade floculante e biomassa para os isolados de *B. megaterium* (APF.SG3 Isox), *B. thurigiensis* (BDLJ2) e *B. toyonensis* (ACO.PR1 Isox) foi a sacarose, com razões de 5,66, 3,73 e 7,92, respectivamente. Para o isolado de *B. pumilus* (BDL07), a maior razão (2,49) foi obtida quando o microrganismo foi cultivado na presença de maltose.

O pH ótimo para a produção de biofloculante para os isolados de *B. megaterium* (APF.SG3 Isox) e *B. pumilus* (BDL07) foi 3,0, já para os outros dois isolados – *B. thuringiensis* (BDLJ2) e *B. toyonensis* (ACO.PR1 Isox) –, o melhor pH foi 5,0.

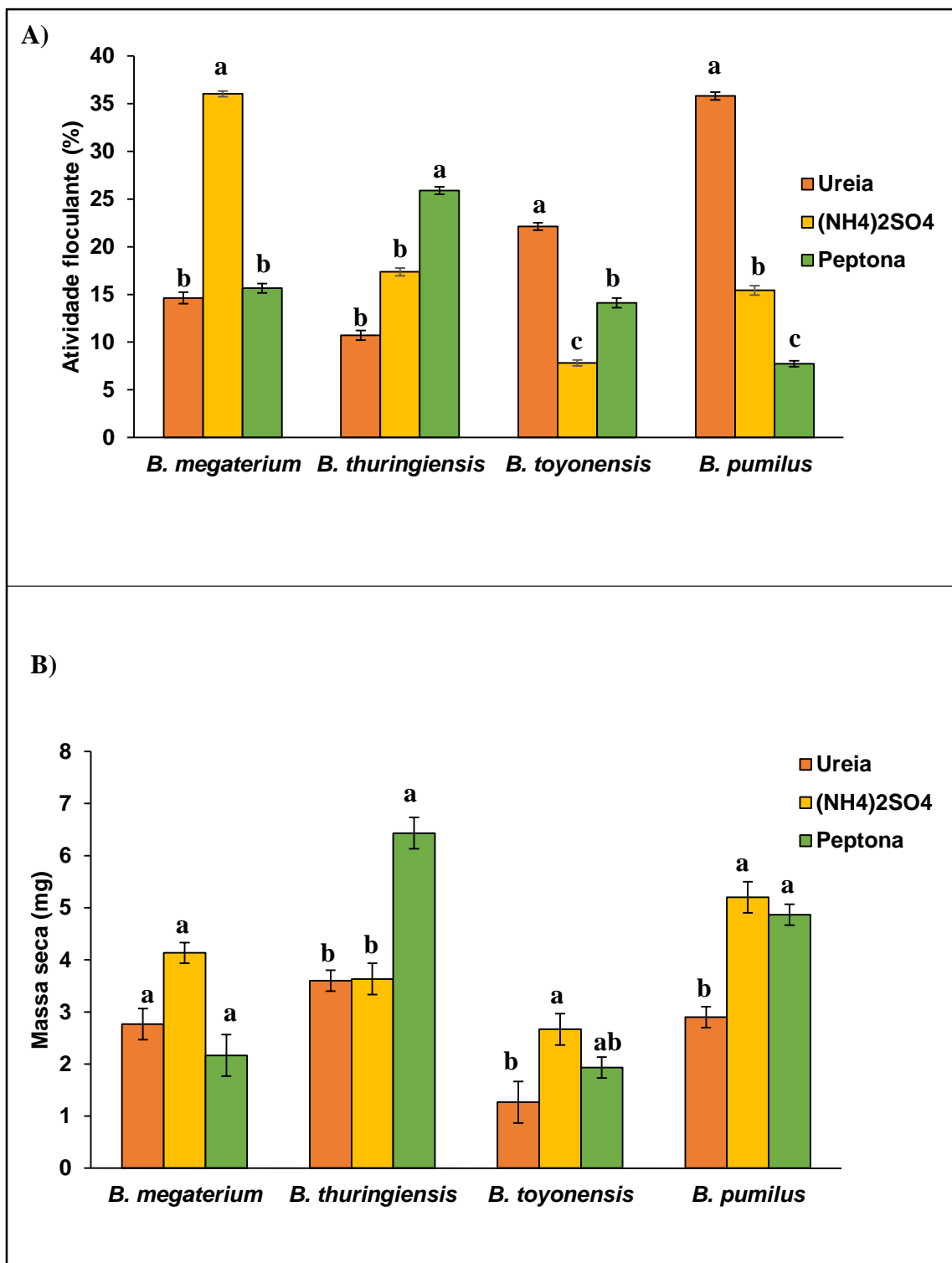
**Tabela 7** – Razão da atividade floculante pelo crescimento celular, para os isolados de *Bacillus* spp. testados após 24 h de incubação (160 rpm a 37 °C, no escuro). **Fonte:** Autor, 2016.

Fontes de Carbono Microrganismos	pH	GLICOSE	MALTOSE	SACAROSE
<i>B. megaterium</i> (APF.SG3 Isox)	3,0	3,40	4,71	<b>5,66</b>
	5,0	3,03	1,24	5,24
	7,0	2,06	1,69	2,42
	9,0	4,18	2,01	3,79
<i>B. toyonensis</i> (ACO.PR1 Isox)	3,0	0,92	4,72	7,30
	5,0	2,28	5,17	<b>7,92</b>
	7,0	3,33	2,86	6,96
	9,0	1,14	3,49	6,66
<i>B. pumilus</i> (BDL07)	3,0	1,91	<b>2,49</b>	1,52
	5,0	1,93	2,06	1,50
	7,0	1,70	0,73	1,03
	9,0	1,60	2,36	1,26
<i>B. thuringiensis</i> (BDLJ2)	3,0	0,55	3,65	3,40
	5,0	1,39	3,11	<b>3,73</b>
	7,0	1,55	2,37	2,88
	9,0	1,29	0,62	2,93

Entre as fontes de nitrogênio examinadas,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  provou ser a melhor para o isolado de *B. megaterium* (LBPMA-APF. SG3 Isox) com atividade floculante de 36 %. Já para os isolados de *B. pumilus* (LBPMA- BDL07) e *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox), a melhor fonte de nitrogênio foi a uréia, com valores de atividade floculante de 36 % e 22 %, respectivamente. Já para o isolado *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2), a melhor fonte de nitrogênio foi a peptona, com 26 % de atividade floculante.

Shadia *et al.* (2011) relataram que  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  estava entre as fontes de nitrogênio mais eficazes para a produção de biofloculantes por *B. alvei* NRC-14. Utilizando essa mesma fonte de nitrogênio e uma estirpe de *Bacillus* sp. marinho, Okaiyeto *et al.* (2016) também observaram atividade floculante (79,89 %) após 72 h de incubação. Sheng *et al.* (2006), por outro lado, estudando a produção de biofloculante por uma estirpe de *Klebsiella* sp., observaram que úrea foi a fonte de nitrogênio mais estimulante para tal atividade. Aljuboori *et al.* (2013), por sua vez, constataram que peptona foi a melhor fonte de nitrogênio para a produção de biofloculantes pelo fungo *Apergillus flavus*, e Li *et al.* (2013) evidenciaram o mesmo em relação a bactéria *Paenibacillus elgii* B69.

**Figura 26** – Efeito das fontes de nitrogênio sobre: A) produção de biofloculante (%) e B) massa seca (mg) após 24 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) dos isolados de: *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox); *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox); *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2), em meio contendo as melhores fontes de carbono e pH. Os resultados estão expressos como média de triplicatas. As barras da mesma cor com letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). **Fonte:** Autor, 2016.



Relacionando as atividades de floculação dos isolados testados para as diferentes fontes de nitrogênio estudadas (**Tabela 8**), verificou-se que individualmente estas foram menos eficientes após 24 h de cultivo dos isolados de *Bacillus spp.* do que a fonte combinada padrão [uréia, extrato de levedura e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ].

**Tabela 8** – Comparação dos valores de atividade floculante utilizando diferentes fontes de nitrogênio, para os isolados de: *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. toyonensis* e *B. thuringiensis*, após incubação durante 24 h (160 rpm a 37 °C, no escuro). **Fonte:** Autor, 2016.

<b>Fontes de Nitrogênio</b>	<b>Uréia, extrato de levedura e <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math></b>	<b>Peptona</b>	<b>Uréia</b>	<b><math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math></b>
<b>Microrganismos</b>				
<i>B. megaterium</i> (APF.SG3 Isox)	34	16	15	<b>36</b>
<i>B. toyonensis</i> (ACO.PR1 Isox)	21	8	<b>22</b>	14
<i>B. pumilus</i> (BDL07)	39	8	<b>36</b>	15
<i>B. thuringiensis</i> (BDLJ2)	33	<b>26</b>	11	17

Cepas bacterianas podem utilizar fontes de nitrogênio combinadas para produzirem biofloculante (DENG *et al.*, 2005; GONG *et al.*, 2008; XIA *et al.*, 2008). Por exemplo, Deng *et al.* (2005) relatou que a peptona combinada com nitrato de sódio é a fonte de nitrogênio mais adequada para a produção de biofloculantes por *A. parasiticus*. Por outro lado, quando combinado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , nenhum biofloculante foi produzido.

Xia *et al.* (2008) evidenciaram que a combinação de extrato de peptona, levedura e carne bovina como fonte de nitrogênio foi bastante eficaz, mas a peptona somente (fonte de nitrogênio orgânico) foi a mais rentável com alta produção de biofloculantes pela estirpe de *Proteus mirabilis* TJ-1 utilizada. Cosa *et al.* (2013) relataram que uma fonte complexa de nitrogênio consistindo em úreia, extrato de levedura e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  suportou produção ótima de biofloculante por *Virgibacillus sp.* Do mesmo modo, Gong *et al.* (2008) indicaram que uma fonte mista de nitrogênio que compreende ureia e extrato de carne de bovino mostrou uma melhoria substancial na produção de biofloculantes por *Serratia ficaria*, entre outras pesquisadas.

## 5.5 Caracterização do biofloculante produzido

O espectro de absorção no infravermelho (FTIR) de um composto é provavelmente a sua propriedade física mais original, por isso o espectro é muitas vezes chamado de impressão digital de uma molécula (KACURÁKOVÁ & WILSON, 2001).

A análise FTIR do biofloculante produzido pelas estirpes de *Bacillus spp.* foi realizada para detectar a presença de quaisquer grupos funcionais que pudessem contribuir para a sua atividade de floculação. Nos espectros obtidos, foi possível analisar um pico intenso de

alongamento largo a  $3261\text{ cm}^{-1}$  para *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox),  $3269\text{ cm}^{-1}$  para *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox),  $3263\text{ cm}^{-1}$  para *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e  $3259\text{ cm}^{-1}$  para *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2), que é uma característica do grupo hidroxilo (-OH).

Além disso, um pico de estiramento assimétrico na região de  $1600\text{ cm}^{-1}$  analisado, o que mostrou a presença de vibração de alongamento do grupo carbonilo no péptido. As bandas  $1309\text{ cm}^{-1}$  para *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox),  $1377\text{ cm}^{-1}$  para *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2) e  $1402\text{ cm}^{-1}$  para *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) são características de estiramento simétrico (C = O) no carboxilato (DENG *et al.*, 2003), que representam a presença de grupo carboxilo na estrutura do biofloculante produzido pelas estirpes estudadas.

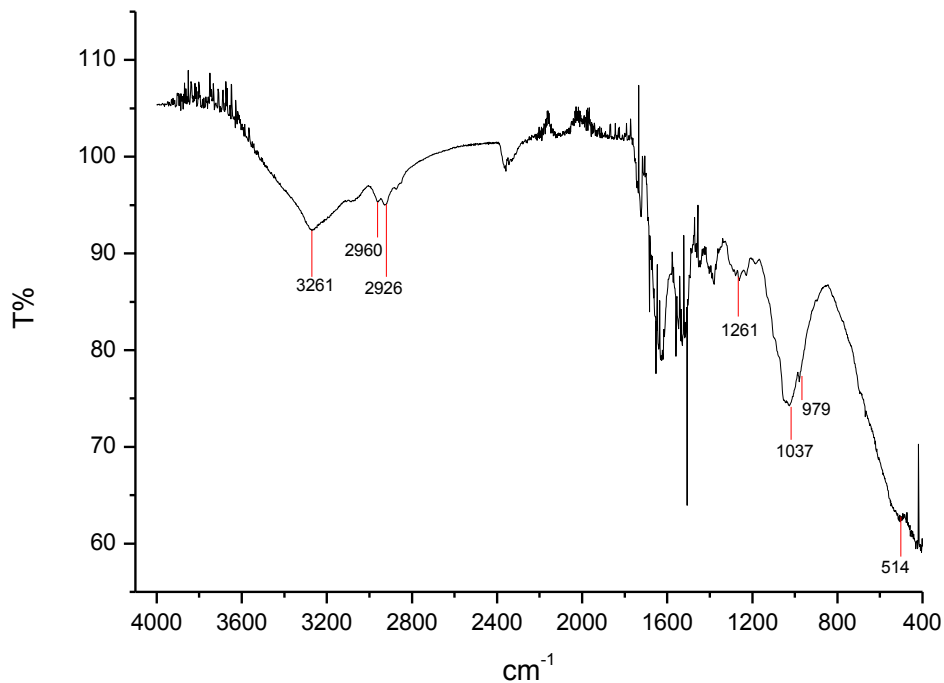
Uma faixa de vibração de alongamento (C-H) fraca foi observada a  $2960\text{ cm}^{-1}$  para *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox),  $2916\text{ cm}^{-1}$  para *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox),  $2960\text{ cm}^{-1}$  para *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e  $2958\text{ cm}^{-1}$  para *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2).

As bandas a  $1037\text{ cm}^{-1}$  para *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox),  $1051\text{ cm}^{-1}$  para *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox),  $1020\text{ cm}^{-1}$  para *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e  $1022\text{ cm}^{-1}$  para *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2) representam o grupo metoxilo (ZHENG *et al.*, 2008). O pico de sorção a  $1261\text{ cm}^{-1}$  para três dos isolados testados (*B. megaterium*, *B. toyonensis* e *B. thuringiensis*) e  $1228\text{ cm}^{-1}$  para *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) indicam a presença de alongamento (C-O) em éter ou álcool (DESOUKY *et al.*, 2008). Os picos de absorção em torno de  $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  são conhecidos por serem característicos de todos os derivados do açúcar (ZHENG *et al.*, 2008). Os espectros FTIR mostraram a presença de grupos carboxilo, hidroxilo e metoxilo (**Figuras 27 e 28**), que são os grupos preferidos para floculação, sendo assim caracterizados como polissacarídeos (NTSANGANI *et al.*, 2017).

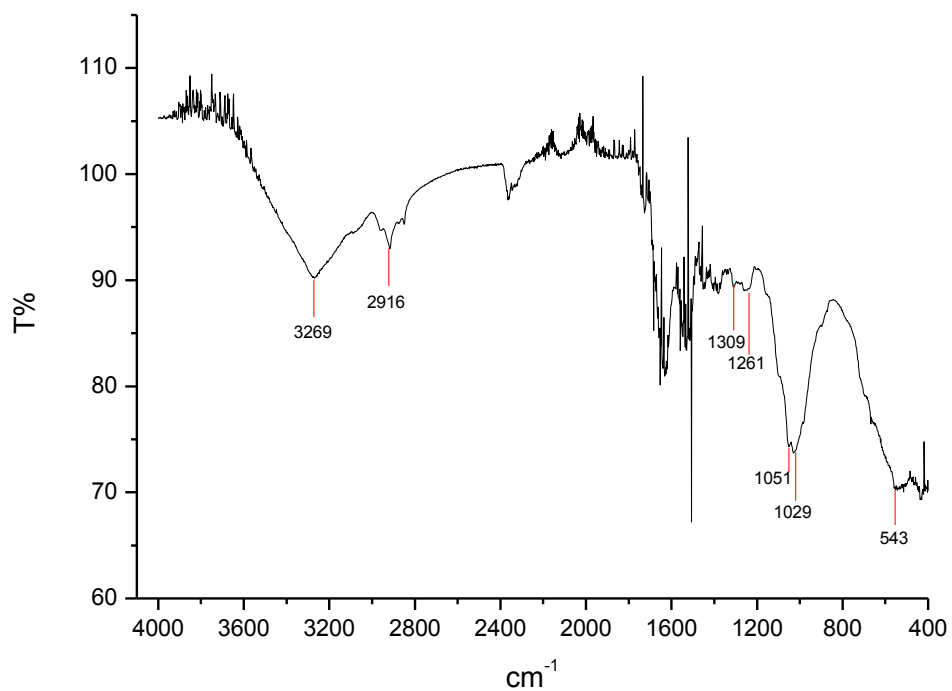


**Figura 27** – Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) dos biofloculantes produzidos, após 72 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) dos isolados de: A) *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox) e B) *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox), em meio para produção de biofloculante. **Fonte:** Autor, 2017.

**A) *B. megaterium* (LBPMA- APF. SG3 Isox)**

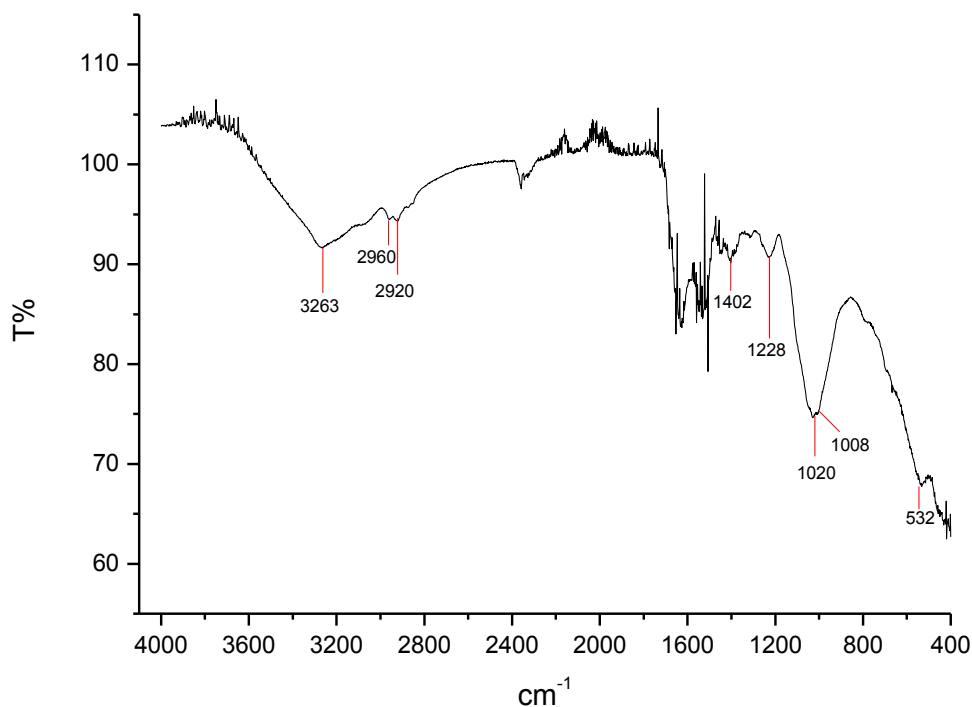


**B) *B. toyonensis* (LBPMA- ACO. PR1 Isox)**

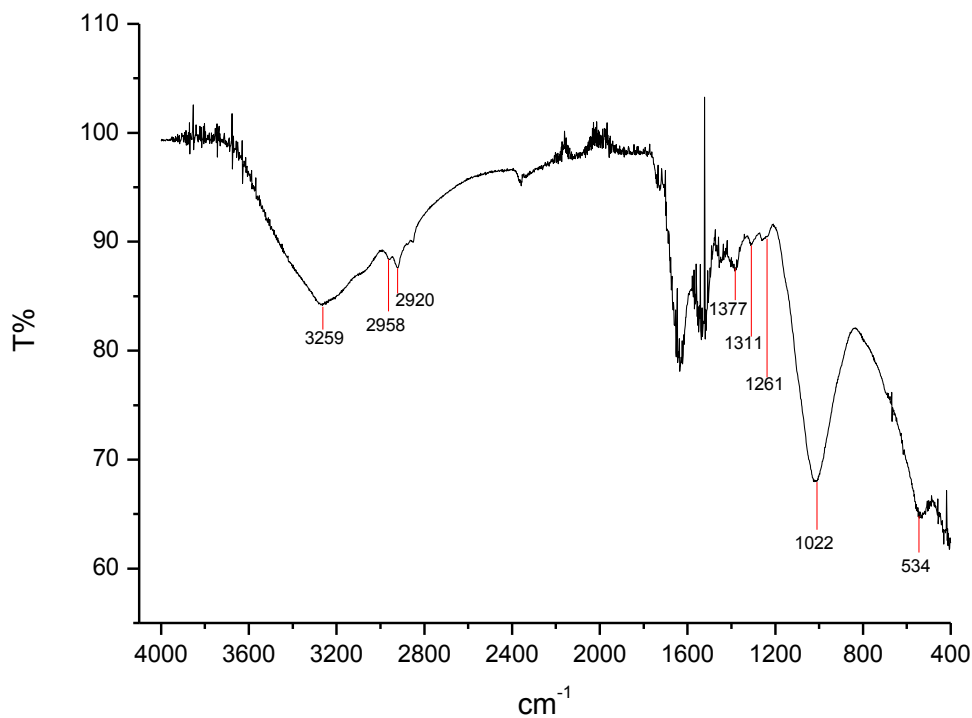


**Figura 28** – Espectro de infravermelho (FTIR-ATR) dos biofloculantes produzidos, após 72 h de incubação (160 rpm a 37°C, no escuro) dos isolados de: A) *B. pumilus* (LBPMA-BDL07) e B) *B. thuringiensis* (LBPMA-BDLJ2), em meio para produção de biofloculante. **Fonte:** Autor, 2017.

**A) *B. pumilus* (LBPMA- BDL07)**



**B) *B. thuringiensis* (LBPMA- BDLJ2)**



Polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxilas, que apresentam uma ampla banda de absorção arredondada acima do comprimento de onda 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Como a mesma é encontrada nos compostos estudados sugere que as substâncias se tratam de um polissacarídeo (HOWE; ISHIDA & CLARK, 2002).

Deng *et al.* (2003) documentaram que o biofloculante MBFA9 secretado por *B. mucilaginosus* é um polissacarídeo composto principalmente de açúcar aminado, ácido urônico e açúcar neutro. A análise do espectro de infravermelho revelou a presença de carboxilo e hidroxilo como as principais porções funcionais. Feng & Xu (2008) observaram que o biofloculante ácido produzido por *Bacillus sp.* BF3-3 é composto de polissacarídeo e proteína. Gao *et al.* (2006) descobriram que o biofloculante produzido por *Vagococcus sp.* W31 é um heteropolissacarídeo formado principalmente por glicídeo neutro e ácido urônico. Gooma (2012), utilizando uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* para produção de biofloculante, observou que após a análise dos espectros, os mesmos indicaram a presença de grupos derivados de carboxilo, hidroxilo, amino e açúcar, características de exopolímeros. Zhang *et al.* (2013) e Kumari *et al.* (2013) utilizando estirpes de *Phanerochaete chrysosporium* e *Vibrio campbellii*, respectivamente, observaram que os espectros de FTIR apresentaram grupos característicos de um composto polissacarídeo.

Os grupos hidroxilo e carboxilo desempenham um papel fundamental na floculação de partículas em suspensão porque esses grupos funcionais fornecem locais de adsorção onde as partículas em suspensão podem ser anexadas (Okaiyeto *et al.*, 2016).

## 6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

- As técnicas de biologia molecular (amplificação das sequências 16S rDNA), aliadas aos testes culturais e bioquímicos, permitiram identificar com precisão as bactérias estudadas em nível de espécie. Por meio delas, os isolados codificados como LBPMA: ACO.SG3 Isox, APF. PR1 Isox, BDLJ2 e BDL07 foram identificados respectivamente como *Bacillus megaterium*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus thurigiensis* e *Bacillus pumilus*.
- Na avaliação qualitativa em meio sólido, para as atividades enzimáticas estudadas, todas as estirpes analisadas de *Bacillus* apresentaram resposta positiva para produção de celulases, lipases e proteases, sendo o isolado *B. pumilus* o que apresentou melhor índice de atividade celulásica e proteolítica. Já para a atividade lipolítica, o isolado de *B. toyonensis* foi o que apresentou melhor resposta.
- As culturas submersas com substratos específicos também se mostraram eficazes na produção das enzimas estudadas, bem como de biofloculantes, pelos isolados testados. Para quantificação de atividade celulolítica, *B. megaterium* e *B. toyonensis* apresentaram maiores valores de atividade enzimática após 24 e 48 h de cultivo, respectivamente.
- O isolado de *B. toyonensis* apresentou melhor valor para atividade proteolítica após 48 h de incubação, valor próximo ao da atividade proteolítica máxima dos isolados *B. pumilus* e *B. megaterium*, porém esta ocorreu após 72 h de incubação. Já para a produção da enzima lipolítica, o isolado de *B. megaterium* destacou-se por apresentar maior atividade enzimática após 72 h de cultivo.
- Todos os isolados secretaram moléculas capazes de atuar como biofloculantes na temperatura constante de  $37\pm 1$  °C. A atividade floculante aumentou com o tempo de cultivo, a princípio, chegando ao valor máximo de 57 % às 72 h de cultivo de *B. pumilus*.
- As eventuais divergências entre resultados observados e os já descritos na literatura para as mesmas ou outras espécies devem-se às diferentes estirpes, composições dos meios utilizados e condições físico-químicas utilizadas nas pesquisas.
- A otimização dos constituintes dos meios e das condições de produção de biofloculantes são boas estratégias para melhorar os rendimentos e a atividade de

floculação, no entanto a mesma não apresentou resultados satisfatórios para os isolados testados.

- A análise química dos biofloculantes produzidos por FTIR-ATR permitiu a detecção dos grupos funcionais hidroxilos, carboxilos e metilo, o que os coloca dentro da classe de polissacarídeos. Tais compostos orgânicos biocompatíveis e biodegradáveis são possíveis substitutos de interesse industrial aos floculantes químicos atualmente utilizados em processos de tratamento de água.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. Z. M. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais.** Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 56 p., 2003.
- ABDEL-AZIZ, S. M., et al. Extracellular metabolites produced by a novel strain, *Bacillus alvei* NRC-14:3. Synthesis of a biofloculant that has chitosan-like structure. **Life Sci. J.**, v. 4, n. 8, p.883–890, 2011.
- ABIRAMI, V. et al. Partial purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. **Eur. J. Exp. Biol.**, v. 1, n. 3, p. 114-123, 2011.
- ADINARAYANA, K., ELLAIH, P. Response surface optimization of critical medium component for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp.*, **J. Pharm. Pharma. Sci.**, v. 5, n. 3, p. 272-278, 2002.
- AGUNBIADE, M. O., et al. A Review of the Application of Bioflocualnts in Wastewater Treatment. **Pol. J. Environ. Stud.**, v. 25, n. 4, p.1381-1389, 2016. DOI: 10.15244/pjoes/61063.
- ALJUBOORI, A. H. R., et al. Production and characterization of a biofloculant produced by *Aspergillus flavus*. **Bioresour. Technol.**, v. 127, p.489–493, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.09.016.
- ANNA, R., et al. The role and significance of extracellular polymers inactivated sludge. Part I: Literature review. **Acta Hydrochim. Hydrobiol.**, v. 34, p.411–424, 2006. DOI : 10.1002/ahch.200500640.
- ARCHANA, M., et al. Screening of cellulolytic bacteria for producing cellulase under solid state fermentation using water hyacinth as a substrate. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 8, n. 8, p. 352-356, 2016.
- ARIFFIN, H. et al. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus* EB3. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 106, n. 3, p. 231-236, 2008. DOI: 10.1263/jbb.106.231.
- ASSIS, T. S., RIBEIRO, A. R. P. **Bacillus – revisão de literatura.** Departamento de ciências agrárias e ambientais – Universidade Estadual de Santa Cruz, 2011. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAe4vAAG/bacillus>>. Acesso em: 25/11/2016.
- BACHA, A. B., et al. Purification and biochemical characterisation of ostrich pancreatic lipase. **Enzyme Microb. Technol.** v. 37, n. 3, p. 309-317, 2005. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.07.022.
- BAI, Y. X., et al. Enhanced Soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop. Science.**, v. 43, n. 5, p. 1774–1781, 2003. DOI : 10.2135/cropsci2003.1774.
- BARBEHENN, R. V., CONSTABEL, C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 551–1565, 2011. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040.

BARRETO, R. V. G. **Prospecção de microrganismos e genes envolvidos com a produção de biosurfactantes em solo de manguezal**. 2011. 148f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

BARROS, F. F. C., et al. Production of enzymes from agroindustrial wastes by biosurfactant-producing strains of *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Res. Int.**, v. 2013,p.9, 2013. DOI : 10.1155/2013/103960.

BE MILLER, J. N. **Industrial Gums, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**, John Wiley & Sons, v. 7, p. 589,1987.

BEG, Q. K., et al. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. **Process. Biochem.**, v. 37, n. 10, p. 1103–1109, 2002. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00320-X.

BEGUIN, P. Molecular Biology of Cellulose Degradation. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 219-48, 1990. DOI : 10.1146/annurev.mi.44.100190.001251.

BEVERIDGE, J. T., MURRAY, R. G. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 127, n. 3, p. 1502-1518, 1976.

BHAT, M. K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2.

BISPO, A. S. R. **Bioprospecção de actinomicetos isolados de solos no estado da Bahia e seu potencial na produção de enzimas lingocelulolíticas**. 2010. 104f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas-BA, 2010.

BOLTO, B., GREGORY, J. Organic polyelectrolytes in water treatment. **Water. Res.**, v. 41, n. 11, p. 2301-2324, 2007. DOI: 10.1016/j.watres.2007.03.012.

BORZANI, W., et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2005.

BÖTTCHER, S., et al. **Directed evolution of industrial biocatalysts. In: Industrial Biotechnology**, Soetaert, W., Vandamme, E. (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 173-205, 2010.

BOURGAIZE, D., et al. **Biotechnology: Demystifying the Concepts**. Benjamin/Cummings, San Francisco, 2000.

BRAGA, R. M., et al. Avaliação da produção de celulase por cepas de *Fusarium*. In: **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Natal. 2009.

BRAVO, A., et al. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4965- 4972, 1998.

BRAVO, A., et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, n. 7, p. 423– 431, 2011. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

CAO, Y., TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydr. Res.**, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

**CASTRO, A. M. Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos, Obtidas a Partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*).**

2006. 212f. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2006.

CASTRO, M. A., PEREIRA Jr, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Quím. Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010. DOI : 10.1590/S0100-40422010000100031.

CHANTAWANNAKUL, P., et al. Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soy bean in Northern Thailand. **Science Asia**, v. 28, p. 241-245, 2002. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.241.

CHATURVEDI, S. et al. Isolation and Optimization for Extracellular Lipase Using Ground Nut Shell Under Submerged Fermentation. **Indo Am. J. Pharm. Res.** v. 6, n. 3, 2016.

CHAUHAN, B., GUPTA, R., **Process Biochem.**, v. 39, p. 21-15, 2004.

CHEN, L., et al. Flocculating activities of polysaccharides released from the marine mat-forming cyanobacteria *Microcoleus* and *Lyngbya*. **Aquat Biol.**, v.11, p.243-248, 2011. DOI: 10.3354/ab00309.

CHEN, Z., et al. Identification of key genes involved in polysaccharide bioflocculant synthesis in *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 114, n. 3, p.645-655, 2016. DOI: 10.1002/bit.26189.

CHOI, C.W., et al. Characterization of an extracellular flocculating substance produced by a planktonic cyanobacterium, *Anabaena* sp. **Biotechnol. Lett.**, v. 20, n. 7, p.643–646, 1998. DOI: 10.1023/A:1005358204636.

CONAMA 430 – Conselho Nacional de Meio Ambiente, Legislação Ambiental Federal, Resolução nº 430, 2011. Disponível em: [www.mma.gov.br/conama/](http://www.mma.gov.br/conama/) Acesso em : Julho de 2016.

CONCEIÇÃO, D. M., et al. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e Refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

COSA, S., L. V., et al. Production and characterization of bioflocculant produced by *Halobacillus* sp. Mvuyo isolated from bottom sediment of Algoa Bay. **Environ. Technol.**, v. 33, n. 9, p. 967–973, 2012. DOI: 10.1080/09593330.2011.603755

COSA, S., et al. A marine bacterium, *Oceanobacillus* sp. Pinky, isolated from Algoa Bay sediment produces a thermostable glycoprotein flocculant. **Afri. J. Biotechnol.**, v. 12, n. 26, p. 4135–4146, 2013a. DOI: 10.5897/AJB2013.12041.

COSA, S., et al. Characterization of a thermostable polysaccharide bioflocculant produced by *Virgibacillus* species isolated from Algoa bay. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 7, n. 23, p. 2925–2938. 2013b. DOI: 10.5897/AJMR12.2371.

COSTA, A. C. A., DUTRA, F. P. Bioaccumulation of copper, zine, cadmium and lead by *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 1-5, 2001. DOI: 10.1590/S1517-83822001000100001.



- CRISTINA, Q., et al. Optimization of production of extracellular polymeric substances by *Arthrobacter viscosus* and their interaction with a 13X zeolite for the biosorption of Cr(VI). **Environ. Technol.**, v. 32, n. 14, p.1541–1549, 2011. DOI : 10.1080/09593330.2010.543930
- DENG, S. B., et al. Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, n. 5, p. 588–593, 2003. DOI: 10.1007/s00253-002-1159-5.
- DENG, S. B., et al. Production of a bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal. **Colloids Surf B: Biointerf.**, v. 44, n. 4, p.179–186, 2005. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2005.06.011.
- DENG, S. B., et al. Production of a bioflocculant by *Aspergillus parasiticus* and its application in dye removal. **Colloids Surf B: Biointerf.** v. 44, n. 4, p. 179–186, 2005. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2005.06.011
- DESOUKY, A. M., et al. Isolation and characterization of extracellular biofloculants produced by bacteria isolated from Quatari ecosystems. **Pol. J. Microbiol.** v. 57, n. 3, p.231–239, 2008.
- DHOUIB, A. et al. Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 4, n. 5, p. 431-436, 2005.
- DIENES, D., et al. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Ind. Crops Prod.**, v. 20, n. 1, p. 11-21, 2004. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.12.009.
- DONOT, F., et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydr. Polym.**, v. 87, n. 2, p.951–962, 2012. DOI : 10.1016/j.carbpol.2011.08.083.
- DOMINGUEZ, A., et al. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol. Lett.**, v. 25, n. 15, p. 1225-1229, 2003. DOI: 10.1023/A:1025068205961.
- EDWINOLIVER, N. G. et al. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 101, p. 6791–6796, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.091.
- EMMYRAFEDZIAWATI, A. K. R., STELLA, M. Hydrolysis of carboxymethyl cellulose (CMC) by *Bacillus* isolated from compost. **J. Trop. Agric. and Fd. Sc.**, v. 43, n.2, p.129–135, 2015.
- ESPÓSITO, E., AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 510p., 2004.
- FANG, Y., et al. Optimization of antioxidant exopolysaccharides production by *Bacillus licheniformis* in solid state fermentation. **Carbohydr. Polym.**, v. 98, p.1377–1382, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.07.076.
- FARINAS, C. S. et al. Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 28, n. 1, p. 17-26, 2011.

FEITOSA, I. C., et al. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Sci. Technol.**, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2010 DOI: 10.4025/actascitechnol.v32i1.7550.

FENG, D. L., e XU, S. H. Characterization of biofloculant MBF3-3 produced by an isolated *Bacillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 24, n. 9, p.1627–1632, 2008. DOI:10.1007/s11274-008-9654-1.

FERNADES, M. L. M. **Hidrólise de triacilglicerídeos e síntese de éster de ácido graxo em sistema de micelas reversas.** 2002. 109f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002.

FERRO, L.A. **Produção, purificação e caracterização da enzima B-1,3 glucanase de Cellulomonas cellulans YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras.**2002. 175p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2002.

FLEMMING, H., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, p.623–633, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2415.

FLORENCIO, C., et al. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. **Enzyme Res.**, p.1-7, 2012. DOI : 10.1155/2012/793708.

FOTOUH, D. M. A., et al. Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry. **Enzyme Res.**, v. 2016, p. 2-9, 2016. DOI: 10.1155/2016/9034364.

FUCIÑOS, P., et al. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. **J. Biotech.**, v. 117, n. 3, p. 233-241, 2005. DOI : 10.1016/j.jbiotec.2005.01.019.

FUNGARO, M. H. P, et al. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas a Indústria de Alimentos. In: MELO, I. S, VALADARES

INGLIS, M. C., NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., ed. **Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismo.** Jaguariúna, São Paulo, Brasil: Embrapa Meio Ambiente, p. 426-453, 2002.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola.** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz – FEALQ, 2002. 920p.

GEETHANJALI, S., SUBASH, A. Optimization of protease production by *Bacillus subtilis* isolated from Mid Gut of Fresh Water Fish *Labeo rohita*. **World J. Fish and Marine Sci.**, v. 3, n. 1, p. 88-95, 2011.

GHOSH, M., et al. Application of a novel biopolymer for removal of *Salmonella* from poultry wastewater. **Environ. Technol.**, v. 30, n. 4, p.337–344, 2009. DOI: 10.1080/09593330902732093.

GILL, S. S., et al. Isolation and identification of protease producing bacteria through biodegradation of protein content of kitchen wastes in Gwalior, India. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, v. 5, n. 10, p. 204-211, 2016. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.510.022.

GOO, B. G., et al. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresour. Technol.**, v. 129, p.343–350, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.077.

GONG, X. Y., et al. Culture conditions for flocculant production by *Paenibacillus polymyxa* BY-28. **J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.**, v. 38, n. 4, p.657–663, 2003.

GONG, W. X., et al. Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 11, p.4668–4674, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.077.

GOMAA, E. Z. Production and Characteristics of a Heavy Metals Removing Biofocculant Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Pol. J. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p.281-9, 2012.

GOMES, A. M. A., et al. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Hortic. Bras.**, v. 21, n. 4, p. 699-703, 2003. DOI: 10.1590/S0102-05362003000400026.

GOMES, M. **Gênero *Bacillus* spp.** Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013. Disponível em:

<<http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAneros%20Bacillus%204-2013-1%20vers%C3%A3o%202013.pdf>>. Acesso em: 10/11/2016.

GUO, J., YU, J. Sorption characteristics and mechanisms of Pb (II) from aqueous solution by using bioflocculant MBFR10543. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 98, n. 14, p.6431–6441, 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-5681-z.

GUPTA, R. et al. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 37, p. 63–71, 2003. DOI: 10.1042.

HADDAR, A. et al. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **J. Biosci. Bioeng.** v. 110, n. 3, p. 288-94. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.03.015. Epub 2010 May 10.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for identification of enzyme production by fungi. **Mycol.**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975. DOI: 10.2307/3758395.

HASAN, F., et al. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

HAKI, G. D., RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour Technol.**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HE, N., et al. Identification of a novel bioflocculant from a newly isolated *Corynebacterium glutamicum*. **Biochem. Eng. J.**, v. 11, n. 2-3, p.137–148, 2002. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00018-9.

HE, N., et al. Production of a novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 by *Corynebacteria glutamicum*. **Bioresour. Technol.**, v. 94, n. 1, p.99–105, 2004. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.11.013.

HEREDIA, J. B, MARTÍN, J. S. Removing heavy metals from polluted surface water with a tannin-based flocculant agent. **J. Hazard. Mater.**, v. 165, n. 1-3, p. 1215–1218, 2009. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.09.104.

HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, n. 4, p. 735-50,1999.

JAEGER, K. E., REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, n. 9, 396–403, 1998. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01195-0.

JAIN, R., et al. Proteolytic actinomycetes from Indian habitats. **J. Culture Collections.**, v. 6, p. 28- 37, 2009.

JANG, J. H., et al. Production of a novel biofloculant by fed- batch culture of *Citrobacter* sp. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, n. 8, p.593-597, 2001. DOI: 10.1023/A:1010312607171.

JANG, H. D; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 19, n. 3, p. 263-268, 2003. DOI: 10.1023/A:1023641806194.

JOHNVESLY, B., NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process. Biochem.**, v. 37, n. 2, p. 139–144, 2001. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00191-1.

JOSÉ, S. C. B. J., et al. Padrões eletroforéticos da enzima  $\alpha$ -amilase em sementes de milho submetidas a alta temperatura de secagem. **Ver. Bras. Sementes**, v. 26, n. 1, p. 77-83, 2004. DOI: 10.1590/S0101-31222004000100012.

JOSEPHINE, S. F. et al. Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus* sp isolated from soil sample. **Microbiol. Biotech. Res.**, v. 2, n. 1, p. 163-168, 2012.

JURTSHUK J. R., P., LIU, J. K. Cytochrome oxidase analyses of *Bacillus* strains: existence of oxidase-positive species. **Int. J. System. Bacteriol.**, v. 33, n. 4, p. 387-891, 1983. DOI : 10.1099/00207713-33-4-887.

KAMBOUROVA, M. et al. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 22, n. 5-6, p. 307-313, 2003. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00045-6.

KANEKAR, P. P., et al. Optimization of Protease Activity of Alkaliphilic Bacteria Isolated From na Alkaline Lake in India. **Biores. Technol.**, v. 85, n. 1, p. 87-93, 2002. DOI : 10.1016/S0960-8524(02)00018-4.

KARANJA, E. N. Optimization of growth conditions and characterization of enzymatic activity of selected novel *Streptomyces* species from Kenyan soils. **Scientific Conference Proceedings**, p. 17-30, 2010.

KHATIWADA, P., Isolation, screening and characterization of cellulase producing bacterial isolates from municipal solid wastes and rice straw wastes. **J. Bioprocess. Biotech.** v. 6, n. 4, p.280, 2015. DOI: 10.4172/2155-9821.1000280

KIM, Y. K. et al. Enchancemente of protealytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearthermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. **Bioresour. Technol.**, v. 82, p.157-164, 2002.

KIM, D. G., et al. Harvest of *Scenedesmus* sp. with biofloculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 3, p.3163–3168, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.10.108.

- KUMAR, R., VATS, V. Protease production by *Bacillus subtilis* immobilized on different matrices, **N. Y. Sci. J.** v. 3, n. 7, p. 20–24, 2010.
- KUMARI, B. L., SRI, M. H., SUDHAKAR, P. Isolation of cellulase producing fungi from soil, optimization and Molecular characterization of the isolate for maximizing the enzyme yield. **World J. Sci. Technol.**, v. 5, p. 01-09, 2011.
- KUMAR, D. et al. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. **Arch. Appl. Sci. Res.**, v. 4, n. 4, p. 1763-1770, 2012.
- KUMARI, K., et al. Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. **Carbohydr. Polym.**, v. 94, n. 2, p. 882-888, 2013. DOI : 10.1016/j.carbpol.2013.02.010.
- KUMARI, K., et al. Characterisation and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. **Carbohydr. Polym.**, v. 101, p. 29–35, 2014. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.08.099.
- KURANE, R. et al. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 58, n. 2, p. 428–429, 1994. DOI: 10.1271/bbb.58.428.
- KWON, G. S., et al. A novel flocculants biopolymer produced by *Pestalotiopsis* sp. KCTC 8637P. **Biotechnol. Lett.**, v. 18, n. 12, p.1459–1464, 1996. DOI: 10.1007/BF00129355.
- LADEIRA, S. A. et al. Protease production using agroindustrial residues by thermophilic *Bacillus* sp. in submerged fermentation: optimization of the culture medium using an experimental design approach. **Quím. Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.
- LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quím. Nova.**, v. 32, n. 3, 2016. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300011.
- LEE, S. H., et al. Improvement of water treatment performance by using polyamine flocculants. **Environ. Technol.**, v. 22, n. 6, p. 274–278, 2001. DOI: 10.1080/09593332208618237.
- LEE, K., MOON, S. H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **J. Biotechnol.**, v. 102, n. 3, p. 261-268, 2003. DOI: 10.1016/S0168-1656(03)00027-0.
- LEE, C. S., et al. A review on application of flocculants in wastewater treatment. **Process Saf Environ**, v. 92, n. 6, p. 489-508, 2014. DOI: 10.1016/j.psep.2014.04.010.
- LI, Y., et al. A novel polygalacturonic acid bioflocculant REA-11 produced by *Corynebacterium glutamicum*: A proposed biosynthetic pathway and experimental confirmation. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 63, n. 2, p.200–2006, 2003. DOI: 10.1007/s00253-003-1365-9.
- LI, X. Y., YANG, S. F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. **Water Res.**, v. 41, n. 5, p.1022–1030, 2007. DOI: 10.1016/j.watres.2006.06.037.

LI, W. W., et al. Flocculation behavior and mechanism of an exopolysaccharide from the deep-sea psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 15, p.6893–6899, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.050.

LI, Z., et al. Characterization and flocculating properties of a novel bioflocculant produced by *Bacillus circulans*. **World J Microb. Biot.**, v. 25, p. 745–752, 2009 a. DOI: 10.1007/s11274-008-9943-8.

LI, Z., et al. Production of a novel bioflocculant by *Bacillus licheniformis* X14 and its application to low temperature drinking water treatment. **Bioresour. Technol.**, v. 100, n. 14, p. 3650–3656, 2009 b. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.029.

LI, O., et al. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. **Bioresour. Technol.**, v. 134, p. 87–93, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.02.013.

LIMA, V. M. G. **Produção e purificação de lipases de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos.** 2004. 151p. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2004.

LIMA, C. A. et al. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM362. **Biochem. Eng. J.**, v. 43, n. 4, p. 315-320, 2009. DOI: 10.1590/1809-4392201305074.

LIMA, L. A. **Proteases com atividade colagenolíticas produzidas por *Bacillus spp.* de solo amazônico.** 2013. 50f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Am, 2013.

LIN, J. E., CHANG, D. C. N., SHEN, G. J. Correlations among several screening methods used for identifying wood-decay fungi that can degrade toxic chemicals. **Biotechniques**, v. 5, n. 4, p. 275-280, 1991.

LIN, J., HARICHUND, C. Production and characterization of heavy-metal removing bacterial bioflocculants. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 11, n. 40, p.9619–9629, 2012.

LIU, W., et al. Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium. **Bioresour. Technol.**, v. 101, n. 3, p.1044-1048, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.08.108.

LIU, L. F., CHENG, W. Characteristics and culture conditions of a bioflocculant produced by *Penicillium* sp. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 23, n. 3, p.213–218, 2010. DOI: 10.1016/S0895-3988(10)60055-4.

LIU, Z. Y., et al. Production of novel microbial flocculants by *Klebsiella* sp. TG-1 using waste residue from the food industry and its use in defecating the trona suspension. **Bioresour. Technol.**, v. 139, p. 265–271, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.165.

LU, W. Y., et al. A novel bioflocculant produced by *Enterobacter aerogenes* and its use in defaecating the trona suspension. **Biochem. Eng. J.**, v. 27, n. 1, p.1–7, 2005. DOI: 10.1016/j.bej.2005.04.026.

LU, L., et al. A novel acrylamide-free flocculant and its application for sludge dewatering. **Water Res.**, v. 57, p. 304-312, 2014. DOI: 10.1016/j.watres.2014.03.047.

LUO, Z., et al. Production and characteristics of a bioflocculant by *Klebsiella pneumonia* YZ-6 isolated from human saliva. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 172, n. 3, p.1282–1292, 2014. DOI: 10.1007/s12010-013-0601-8.

LYND, L.R., et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LÓPEZ, A. M. Q., et al. Molecular identification of bacteria tolerant to diuron, isoxaflutole and sulfentrazone, producer of auxin, from soil continuously cultivated by sugarcane. *Revista Brasileira de Ciências de Solo* (no prelo).

MABINYA, L. V., et al. *Halomonas* sp. OKOH-A marine bacterium isolated from the bottom sediment of Algoa Bay-produces a polysaccharide biofloculant: partial characterization and biochemical analysis of its properties. **Molecules**, v. 16, n. 6, p.4358–4370, 2011. DOI: 10.3390/molecules16064358.

MACÊDO, J. A. B. **Águas & Águas**. 2ª Edição. Belo Horizonte/MG: CRQ-MG, 2004.

MADIGAN, M. T., et al. **Brock Biology of Microorganism**, 8 Edição, Ed. Pretince Hall, New Jersey, 986p, 1996.

MAKAPELA, B., et al. Assessment of *Bacillus pumilus* isolated from Fresh Water Milieu for biofloculant production. **Appl. Sci.** v. 6, n. 8, p. 211, 2016. DOI:10.3390/app6080211.

MANDAL, A. K. et al. Partial characterization and flocculating behavior of an exopolysaccharide produced in nutrient-poor medium by a facultative oligotrophic *Klebsiella sp.* PB12. **J. Biosci. Bioeng.** v. 115, n. 1, p. 76–81, 2013. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.08.006.

MANFIO, G. P. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a diversidade microbiana no Brasil. Microbiota (versão preliminar)**. In: Projeto Estratégia Nacional de Diversidade Biológica (BRA 97 G 31) MMA/GEF/PNUD. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 80p, 2003.

MARTÍN-CERECEDA, M., et al. Characterization of extracellular polymeric substances in rotating biological contactors and activated sludge flocs. **Environ. Technol.**, v. 22, n. 8, p.951–959, 2001. DOI : 10.1080/09593332208618231.

MARTINS, R. F., e HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation. **Enzyme Microb. Technol.**, 30: 116-124, 2002. DOI : 10.1016/S0141-0229(01)00461-6.

MARTINS, L. F. et al. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 5, p. 1417-1424, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.060.

MARTINS, V. G., KALIL, S. J., COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 8, p. 1942-1947, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000800005.

MASTER, C., et al. Neuronal origin of a cerebral amyloid: neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease contain the same protein as the amyloid of plaque cores and blood vessels. **EMBO J.**, v. 4, n. 11, p.2757–2763, 1985.

MATA, Y. N., et al. Sugar-beet pulp pectin gels as biosorbent for heavy metals: preparation and determination of biosorption and desorption characterization. **Chem. Eng. J.**, v. 150, n. 2-3, p.289–301, 2009. DOI: 10.1016/j.cej.2009.01.001.

MENDONÇA, E. G. et al. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, criada em diferentes dietas. **Rev. Ceres.**, v. 56, n. 1, p. 18-24, 2009.

MENEZES, A. C. M. A, et al. Perfil enzimático de cepas de rizóbios isolados do semiárido. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.24; p. 1263, 2016. DOI: 10.18677/EnciBio\_2016B\_117.

MERRETTE, M. M, TSAI, J. J, RICHARDSON, P. H. **Starches for use in papermaking**. US Pat. 6.843.888 B2, Jan 18, 2005.

MESSIAS, J. M., et al. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 45, n. 6-7, p. 426–431, 2009. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.08.013.

MESSIAS, J. M. et al. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234, 2011. DOI: 10.5433/1679-0375.2011v32n2p213.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 3, p. 426-429, 1959. DOI: 10.1021/ac60147a030.

MINOTTO, E. et al. Enzyme characterization of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants. **J. Adv. Sci. Res.**, v. 5, n. 2, p. 16-23, 2014.

MISHRA, S., et al. Microwave initiated synthesis and application of polyacrylic acid grafted carboxymethyl cellulose. **Carbohydr. Polym.**, v. 87, n. 3, p. 2255-2262, 2012. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.057.

MONNERAT, R.G., et al. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003, 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Comunicado técnico, 98).

MOREIRA, M. A. B., et al. Feromônios associados aos coleópteros-praga de produtos armazenados. **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 472-477, 2005. DOI : 10.1590/S0100-40422005000300019.

MOUSSAS, P. A., ZOUBOULIS, A. I. A new inorganic–organic composite coagulant, consisting of polyferric sulfate (PFS) and polyacrylamide (PAA). **Water Res.** v. 43, n. 14, p. 3511–3524, 2009. DOI: 10.1016/j.watres.2009.05.015.

MULLIGAN, C. N., et al. Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. **J. Ferment. Technol.** v. 62, n. 4, p. 311 – 314, 1984.

MUSSATTO, S.I., et al. Enzimas: poderosa ferramentas na industria. **Ciência Hoje**, v. 41, p. 28-33, 2007.

NASCIMENTO, W. C. A., MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000300016.

NEDER, R. **Microbiologia. Manual de Laboratório**, Livraria Nobel, São Paulo, 1992.



NEHETE, P. N., et al. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnol. Lett.**, v. 7, n. 6, p. 413-418, 1985. DOI:10.1007/BF01166214.

NICHOLS, C. M., et al. Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 7, p.3519–3523, 2005. DOI : 10.1128/AEM.71.7.3519-3523.2005.

NICHOLSON, W. L. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 3, p. 548–572, 2000. DOI: 10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000.

NIE, M., et al. Production of a novel biofloculant MNXY1 by *Klebsiella pneumoniae* strain NY1 and application in precipitation of cyanobacteria and municipal wastewater treatment. **J. Appl. Microbiol.** v. 111, n. 3, p. 547–558, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05080.x.

NOGHABI, K. A., et al. The production of a cold-induced extracellular biopolymer by *Pseudomonas fluorescens* BM07 under various growth conditions and its role in heavy metals absorption. **Proc. Biochem.**, v. 42, n. 5, p.847–855, 2007. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.02.004.

NTSANGANI, N., et al. Bioflocculation potentials of a uronic acid-containing glycoprotein produced by *Bacillus* sp. AEMREG4 isolated from Tyhume River, South Africa. **3 Biotech.** v. 7, n. 1, p. 78, 2017. DOI: 10.1007/s13205-017-0695-8.

NTSALUBA, L., et al. Studies on biofloculant production by a mixed culture of *Methylobacterium* sp. Obi and *Actinobacterium* sp. Mayor. **BMC Biotechnol.**, v. 13, p. 62, 2013. DOI: 10.1186/1472-6750-13-62.

NWODO, U. U., et al. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 11, p.14002–14015, 2012. DOI: 10.3390/ijms131114002.

NWODO, U. U., OKOH, A. I. Characterization and flocculation properties of biopolymeric flocculant (glycosaminoglycan) produced by *Cellulomonas* sp. Okoh. **J. Appl. Microbiol.**, v. 114, n. 5, p.1325–1337, 2013. DOI: 10.1111/jam.12095.

OKAIYETO, K., et al. Characterization of a biofloculant produced by a consortium of *Halomonas* sp. Okoh and *Micrococcus* sp. Leo. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, v. 10, n. 10, p.5097–5110, 2013. DOI: 10.3390/ijerph10105097.

OKAIYETO, K., et al. Characterization of a biofloculant (MBF-UFH) produced by *Bacillus* sp. AEMREG7. **Int. J. Mol. Sci.** v.16, n. 6, p.12986–13003, 2015. DOI: 10.3390/ijms160612986.

OKAIYETO, K., et al. Implications for public health demands alternatives to inorganic and synthetic flocculants: biofloculants as important candidates. **Microbiology Open.**, v. 5, n. 2, p.177–211, 2016. DOI: 10.1002/mbo3.334.

OKAIYETO, K., et al. Evaluation of flocculating performance of a thermostable biofloculant produced by marine *Bacillus* sp. **Environ. Technol.** v. 37, n. 14, p.1829-1842, 2016. DOI: 10.1080/09593330.2015.1133717.

OLIVEIRA, M.G.A., et al. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. **Comp. Biochem.**

**Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 140, n. 3, p. 369-380, 2005. DOI: 10.1016/j.cbpc.2004.10.018.

OLIVEIRA, S. D. et al. **Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados com petróleo: estado da arte**. Rio de Janeiro: CTEM/MCT, 67p., 2008.

OLIVEIRA, J. G. **Produção de Biossurfactante por *Bacillus pumilus* e Avaliação da Biorremediação de Solo e Água Contaminados com Óleo**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 2010.

ORGENA, M., JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008. DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009.

OTOBONI, A. M. M. B. Estudo de exopolissacarídeos de bactérias fitopatogênicas. **Rev. Cientific. Electr. Agron.**, n. 11, 2007.

ÖZACAR, M., SENGIL, A. Effectiveness of tannins obtained from valonia as a coagulant aid for dewatering of sludge. **Water Res.**, v. 34, n. 4, p. 1407–1412, 2000. DOI: 10.1016/S0043-1354(99)00276-6.

PADILHA, I. Q. M. et al. Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulose synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation. **Braz. J. Chem. Eng.** v. 32, n. 01, p. 35-42, 2015. DOI: 10.1590/0104-6632.20150321s00003298.

PALLADINO, F. **Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2008.

PALOMER, X., et al. Study of the strawberry Cell endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase protein accumulation and characterization of its in vitro activity by heterologous expression in *Pichia pastoris*. **Plant Sci.**, v. 167, n. 3, p. 509-518. 2004. DOI : 10.1016/j.plantsci.2004.04.017.

PANT, G. et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **J. Taibah Univ. Sci.** v. 9, p. 50–55, 2015. DOI: 10.1016/j.jtusci.2014.04.010

PASTOR, M. D., et al. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium of different aeration rate, **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 6-9, 2001. DOI: 10.1590/S1517-83822001000100002.

PATHAK, M., et al. Application of bioflocculating property of *Pseudomonas aeruginosa* strain IASST201 in treatment of oil-field formation water. **J. Basic Microbiol.**, v. 54, n. 7, p.1–12, 2014. DOI: 10.1002/jobm.201301011.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops, **Trends Biotechnol.**, v. 15, n. 5, p. 173-177,1997. DOI : 10.1016/S0167-7799(97)01018-4.

PENG, L., et al. Characterization and application of bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis* using sludge and livestock waste-water as a cheap culture

media. **Appl Microbial Biotechnol.**, v. 98, n. 15, p.6847-6858, 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-5725-4.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado.** 2013. 101f. Dissertação (Mestre em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PERES, M. B., et al. Avaliação do Estado de Conservação da Fauna Brasileira e a Lista de Espécies Ameaçadas: o que significa, qual sua importância, como fazer? **Biodiversidade Bras.**, v. 1, n. 1, p.45-48, 2011.

PHADATARE, S. U., et al. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 15, n. 1, p. 72-76, 1993. DOI: 10.1016/0141-0229(93)90119-M.

PIGOTT, C. R., ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007. DOI : 10.1128/MMBR.00034-06.

PIVETTA, D. H. **Clonagem e expressão do gene engXCA de *Xanthomonas campestris pv. campestris* em *Saccharomyces cerevisiae* e estudo das endoglucanases nativa e recombinante.** 2014. 76f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2014.

PIYO, N., et al. Assessment of biofloculant production by *Bacillus sp.* Gilbert, a marine bacterium isolated from the bottom sediment of Algoa Bay. **Mar. Drugs.** v. 9, n. 7, p.1232-1242, 2011. DOI : 10.3390/md9071232.

POSZYTEK, K., et al. Microbial consortium with high cellulolytic activity (MCHCA) for enhanced biogas production. **Front. Microbiol.** v. 7, p. 324, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00324

PRASERTSAN, P., et al. Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydr. Polym.** v. 66, n.3, p. 289–297, 2006. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.03.011.

PUKANČÍKOVÁ L. et al. Natural microflora of raw cow milk and their enzymatic spoilage potential. **Nova Biotechnologica et Chimica.**, v. 15, n. 2, p. 142-155, 2016. DOI: 10.1515/nbec-2016-0015.

PYLRO, V. S., et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity—Challenges and Prospects. **Microb. Ecol.**, v. 67, n. 2, p. 237-241, 2014. DOI : 10.1007/s00248-013-0302-4.

RAMAKRISHNA, T., PANDIT, M. W. Self-association of  $\alpha$ -chymotrypsin: Effect of amino acids. **J. Biosci.** v. 13, n. 3, p. 215-222, 1988. DOI: 10.1007/BF02712143.

RAO, M. B., et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998. DOI : 10.1128/MMBR.66.4.739.2002.

RENAULT, F., et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. **Eur. Polym. J.**, v. 45, n. 5, p. 1337-1348, 2009. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027.

REOCITIES. Disponível em :

<http://reocities.com/CapeCanaveral/launchpad/9071/amido.gif>, acessado em : 20/12/2016.

RIFFEL, A. et al. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Arch. Microbiol.**, v. 179, n. 4, p. 258-265, 2003. DOI: 10.1007/s00203-003-0525-8.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Prog. Polym. Sci.**, v. 31, n. 7, p. 603–632, 2006. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.

RODRIGUES, D. H. S., OLIVEIRA, A. C. Avaliação de uma proposta contextualizada sobre o ensino de polarimetria nos cursos de farmácia e engenharia de alimentos, na Universidade Federal do Ceará. **Quím. Nova**, v. 32, n.1, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000100042.

ROSALAM, S., e ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 39, n. 2, p.197–207, 2006. DOI : 10.1016/j.enzmictec.2005.10.019.

ROSSELLÓ-MÓRA, R., AMANN, R. Past and future species definitions for *Bacteria* and *Archaea*. **Syst. Appl. Microbiol.** v. 38, n. 4, p. 209-216, 2015. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.02.001.

RUEGGER, M. J. S., TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Rev. Bra. Bot.**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004. DOI : 10.1590/S0100-84042004000200001.

RUIZ, C. et al. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 217, n. 2, p. 263- 267, 2002.

SAHA, P. et al. Enzymatic hydrolysis of rice straw to fermentable sugar: kinetic study. **J. Chem. Eng.** v. 27, n. 2, p. 15–19, 2012. DOI: 10.3329/jce.v27i2.17778.

SANGKHARAK, K., PRASERTSAN, P.J. Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. **J. Gen. Appl. Microbiol.** v. 58, n. 3, p. 173-182, 2012. DOI: 10.2323/jgam.58.173.

SALAM, M. A. et al. Conversion of Cellulosic waste into fermentable sugar: process optimization. **J. Chem. Eng.** v. 28, p. 27–31, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.06.055

SALEHIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S. A. Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnology importance. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, n. 5, p.371–385, 2001. DOI: 10.1016/S0734-9750(01)00071-4.

SALEHIZADEH, H., SHOJAOSADATI, S. A. Removal of metal ions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. **Water Res.**, v. 37, n. 17, p.4231-4235, 2003. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00418-4.

SALEHIZADEH, H., YAN, N. Recent advances in extracellular biopolymer flocculants. **Biotechnol. Adv.**, v. 32, n. 8, p. 1506–1522, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.004.

SATHIYANARAYANAN, G., et al. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide biofloculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. **Colloids Surf B: Biointerf.**, v. 102, p.13–20, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.032.

SANTANA, F. S. C. *Bacillus thuringiensis* como endofíticos em algodão: avaliação na promoção de crescimento e controle de *Spodoptera frugiperda*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

SCHALLMEY, M., et al. Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production. **Can. J. Microbiol.**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004. DOI: 10.1139/w03-076.

SCHEID, D., et al. Identification of rice root associated nitrate, sulfate and ferric ion reducing bacteria during root decomposition. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 50, n. 2, p. 101-110, 2004. DOI: 10.1016/j.femsec.2004.06.001.

SEVINC, N., DEMIRKAN, E. Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. **J. Biol. Environ. Sci.**, v. 5, n. 14, p. 95-103, 2011.

SHAINI, V. P., JAYASREE, S. Isolation and Characterization of Lipase Producing Bacteria from Windrow Compost. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.**, v. 5, n.5, p. 926-933, 2016. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.505.097.

SHARMA, R., et al. Research review paper: production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, n. 8, p. 627–662, 2001.

SHARMA, R. et al. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp RSJ-1. **Process Biochem.**, v. 37, n. 10, p. 1075 - 1084, 2002. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00316-8.

SHARMA, B. R., et al. Flocculants—an Ecofriendly Approach. **J. Polym. Environ.**, v. 14, n. 2, p. 195-202, 2006. DOI: 10.1007/s10924-006-0011-x.

SHENG, Y. L., et al. Screening and flocculating properties of biofloculant-producing microorganisms. **J. Univ. Sci. Technol. Beijing.**, v. 13, n. 14, p.289–292, 2006. DOI: 10.1016/S1005-8850(06)60061-3.

SHENG, G. P., et al. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. **Biotechnol. Adv.**, v. 28, n. 6 ,p.882–894, 2010. DOI : 10.1016/j.biotechadv.2010.08.001.

SHIH, I. L., et al. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresour. Technol.**, v. 79, n. 3, p. 207–225, 2001.

SHUKLA, B. N., DESAI, P. V. Isolation, Characterization and Optimization of Lipase Producing *Pseudomonas* spp. from Oil Contaminated Sites.

**Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.**, v. 5, n. 5, p. 902-909, 2016. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.505.093.

SILVA, N. **Testes Bioquímicos para Identificação de Bactérias em Alimentos.** Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos; Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Informes Técnicos, n.1, 87 p, 1996.

SILVA, K. F. S. **Prospecção e identificação molecular de bactérias de solo tolerantes a herbicidas com potencial para sua degradação e promoção de crescimento vegetal.** Tese de doutorado, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2015.

SILVA, A. L. S. et al. Seleção polifásica de microrganismos produtores de polihidroxicanoatos. **Quim. Nova**, v. 39, n. 7, p. 782-788, 2016. DOI: 10.5935/0100-4042.20160083.

SINGH, R. P., et al. Biodegradable drag reducing agents and flocculants based on polysaccharides: materials and applications. **Polym. Eng. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 46–60, 2000. DOI: 10.1002/pen.11138.

SINHA, P., et al. Characterization and optimization of alkaline protease enzyme produced by soil borne bacteria. **Trends Life Sci.**, v. 2, n. 2, p. 2319– 4731, 2013.

SIVAKUMAR, N. et al. Isolation and characterization of cellulolytic *Bacillus licheniformis* from compost. **Afr. J. Biotechnol.** v. 15, n. 43. p. 2434-2446, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15641

SLIFKIN, M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* Species. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 12, p. 4626-4628, 2000.

SOARES, V.F. et al. High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. In: Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. **Humana Press.**, p. 311-319, 2005. DOI : 10.1007/978-1-59259-991-2\_27.

SOCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, n. 2-3, p. 205-218, 2003. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00133-X.

SOETAERT, W. e VANDAMME, E. The impact of industrial biotechnology. **Biotechnol. J.**, v. 1, n. 7-8, p.756–769, 2006. DOI : 10.1002/biot.200600066.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro.** 2015. 125p. Tese- doutorado, faculdade de ciências farmacêuticas da universidade de são Paulo-sp, 2015.

SUOPAJÄRVI, T., et al. Coagulation–flocculation treatment of municipal wastewater based on anionized nanocelluloses. **Chem. Eng. J.**, v. 231, p. 59–67, 2013. DOI: 10.1016/j.cej.2013.07.010.

SYAFALNI, S., et al. Production of bioflocculant by *Chryseomonas luteola* and its application in dye water treatment. **Mod. Appl. Sci.**, v. 6, n. 5, p.13, 2012. DOI: 10.5539/mas.v6n5p13.

SZYGULA, A., et al. Removal of an anionic dye (Acid Blue 92) by coagulation–flocculation using chitosan. **J. Environ. Manage.**, v. 90, n. 10, p. 2979–2986, 2009. DOI: 10.1016/j.jenvman.2009.04.002.

TANG, J., et al.(a) Production, purification and application of polysaccharide-based bioflocculant by *Paenibacillus mucilaginosus*. **Carbohydr. Polym.**, v. 113, p.463–470, 2014a. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.07.045.

TANG, W., et al. Production, Characterization, and Flocculation Mechanism of Cation Independent, pH Tolerant, and Thermally Stable Bioflocculant from *Enterobacter* sp. ETH-2. **PLoS One.**, v. 9, n. 12, p.e114591, (2014)b. DOI: 10.1371/journal.pone.0114591.

- TANUJA, R., et al. Ascending migration of endophytic *Bacillus thuringiensis* and assessment of benefits to different legumes of N.W. Himalayas. **Eur. J. Soil Biol.**, v. 56, p. 56-64, 2013. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2013.02.004.
- TRIGIANO, R. N., et al. Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. xiv, 575 p.
- TRIPATHY, T., DE, B. R. Flocculation: A New Way to Treat the Waste Water. **J. Physic. Scienc.**, v. 10, p. 93-127, 2006.
- TUMANG, T. R., COSTA, É. S. da. Maldi-tofms aplicada à produção, purificação e caracterização de lipases de interesse biotecnológico. **XIV Seminário de Iniciação Científica**. PIBIC –PUC-RIO, 2006.
- WAN, C., et al. Biofloculant production from *Solibacillus silvestris* W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga *Nannochloropsis oceanica* by flocculation. **Bioresour. Technol.**, v. 135, p.207–212, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.004.
- WANG, L., et al. Characterization of a compound biofloculant produced by mixed culture of *Rhizobium radiobacter* F2 and *Bacillus sphaericus* F6. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 27, . 11, p. 2559–2565, 2011. DOI: 10.1007/s11274-011-0726-2
- WANG, S. G., et al. Production of a novel biofloculant by culture of *Klebsiella mobilis* using dairy wastewater. **Biochem. Eng. J.**, v. 36, n. 2, p.81–86, 2007a. DOI: 10.1016/j.bej.2007.02.003.
- WANG, Y., et al. The characterization and flocculation efficiency of composite flocculant iron salts – polydimethyldiallylammonium chloride. **Chem. Eng. J.**, v. 142, n. 2, p.175–181, 2007b. DOI: 10.1016/j.cej.2007.11.022.
- WANG, M., et al. Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, *Chlorella* sp. and *Micractinium* sp., in wastewater treatment. **Bioresour. Technol.**, v. 154, p.131–137, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.12.047.
- WANG. T., et al. Acta Agriculturae Scandinavica, **Section B - Soil & Plant Science.**, v. 64, 2014.
- WINKLER, V. K., STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, n. 3, p. 663–670, 1979.
- WINSLEY, T. et al. Capturing greater 16S rRNA gene sequence diversity within the domain bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, n. 16, p. 5938-5941, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01299-12.
- WISEMAN. A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**, 3<sup>a</sup> ed., Ellis Horwood: London, 1995.
- WONG, P. W., et al. Efficiency of the coagulation-flocculation method for the treatment of dye mixtures containing disperse and reactive dyes. **Water Qual. Res. J.**, v. 42, n. 1, p. 54–62, 2007.

WONG, Y. S., et al. Production of bioflocculant by *Staphylococcus cohnii* ssp. from palm oil mill effluent (POME). **Water Air Soil Pollut.** v. 223, n. 7, p. 3775–3781, 2012.

XIA, S., et al. Production and characterization of bioflocculant by *Proteus mirabilis* TJ-1. **Bioresour. Technol.** v. 99, n. 14, p. 6520–6527, 2008. DOI : 10.1016/j.biortech.2007.11.031.

XING, G. X., et al. The Proceedings of the Third International Conference on Functional Molecules, Dalian University of Technology, Dalian, pp. 13– 18, 2005. **Recent advances in modified starch as flocculant**, 2005.

XING, J., et al. Removal efficiency and mechanism of sulfamethoxazole in aqueous solution by bioflocculant MFX. **J. Analyt. Methods Chem.**, v. 2013, p.8, 2013. DOI: 10.1155/2013/568614.

XIONG, Y. Y., et al. Production and Characterization of a Novel Bioflocculant from *Bacillus licheniformis*. **Appl. Environ. Microb.** v. 76, n. 9, p.2778–2782, 2010. DOI: 10.1128/AEM.02558-09.

YAN, S., et al. Genes encoding the production of extracellular polysaccharide bioflocculant are clustered on a 30-kb DNA segment in *Bacillus licheniformis*. **Funct Integr. Genomics.**, v. 13, p.425–434, 2013. DOI :10.1007/s10142-013-0333-4.

YANG, X., et al. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochem.**, v. 40, n. 6, p. 2095–2103, 2005. DOI : 10.1016/j.procbio.2004.07.015.

YANG, Q., et al. A novel bioflocculant produced by *Klebsiella* sp. and its application to sludge de watering. **Water Environ. J.**, v. 26, n. 4, p.560-566, 2012. DOI: 10.1111/j.1747-6593.2012.00319.x.

YIM, J. H., et al. Lee.Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. **Bioresour. Technol.** v. 98, n. 2, p. 361–367, 2007. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.12.021.

ZAREVÚCKA, M., et al. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, n. 5, p. 481-486, 2005. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.07.021.

ZHANG, J., et al. Characterization of a bioflocculant produced by the marine *Myxobacterium nannocystis* sp. NU-2. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, n. 4-5, p.517–522, 2002. DOI: 10.1007/s00253-002-1023-7.

ZHANG, K., et al. Wastewater treatment efficiency of combined aluminum-starch flocculant. **J. Appl. Ecology.**, v. 15, n. 8, p. 1443-1446, 2004.

ZHANG, Z., et al. Production and application of a novel bioflocculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. **J. Environ. Sci.**, v. 19, n. 6, p. 667–673, 2007. DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60112-0.

ZHANG, D., et al. Experimental research on *Phanerochaete chrysosporium* as coal microbial flocculant. **Int. J. Mining Sci. Technol.**, v. 23, n. 4, p.521-524, 2013. DOI:10.1016/j.ijmst.2013.07.009.



ZHAO, H. J., et al. Characterization of a bioflocculant MBF5 by *Klebsiella pneumoniae* and its application in *Acanthamoeba* cysts removal. **Bioresour. Technol.**, v. 137, p.226–232, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.079.

ZHENG, Y., et al. Production and characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus* sp. F19. **Biosour. Technol.**, v. 99, n. 16, p. 7686–7691, 2008. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.068.

ZHI, L., BAOPING, H., HONG, L. Optimum conditions to treat high-concentration microparticle slime water with bioflocculants. **Min. Sci. Technol.** n. 20, n. 3, p. 478–484, 2010. DOI: 10.1016/S1674-5264(09)60229-5.