

## II-392 - BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL REATIVO REMAZOL BLACK B 133% POR BACTÉRIA ISOLADA DE SOLO DE ATERRO SANITÁRIO

**Paulo Eduardo Gonçalves de Oliveira**

Graduando em Engenharia Sanitária e Ambiental pela Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá.

**Rossean Golin**

Técnica do Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá.

**Frederico Carlos Martins de Menezes Filho**

Professor Assistente, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de Viçosa - Campus de Rio Paranaíba.

**Zoraidy Marques de Lima**

Bióloga do Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental e Professora do Programa de Pós-graduação em Recursos Hídricos da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Campus Cuiabá.

**Eduardo Beraldo de Moraes<sup>(1)</sup>**

Professor Adjunto do Depto de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). Professor do Programa de Pós-graduação em Recursos Hídricos (UFMT), Campus Cuiabá.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Mato Grosso, Av. Fernando Correa da Costa, 2367, Bloco F, FAET, Cuiabá – MT, CEP 78060-900 - Brasil. [ebmoraes@ufmt.br](mailto:ebmoraes@ufmt.br)

### RESUMO

Vinte e quatro linhagens bacterianas isoladas de solo de aterro sanitário foram avaliadas quanto à capacidade de biodegradar o corante reativo Remazol Black B 133% em caldo nutriente. A bactéria codificada como G5-03, um bastonete gram negativo, se destacou ao remover a cor do meio entre seis e oito horas e por isso a sua capacidade biodegradativa foi avaliada com mais detalhes em água residuária sintética (ARS) com concentração inicial de 100 mg.L<sup>-1</sup> de corante. Assim, foi possível identificar que após uma fase lag com duração de duas horas teve início uma fase de máxima degradação com duração de três horas (entre 2-5 horas) ocorrendo posteriormente a redução na taxa de biodegradação. Na presença de salinidade moderada (20 g/L) a bactéria não teve sua capacidade de biodegradação reduzida. Quando a concentração do corante na ARS foi aumentada para até 1000 mg.L<sup>-1</sup> verificou-se que a eficiência na biodegradação foi reduzida mas a taxa de biodegradação horária do corante aumentou, o que indica que a bactéria estudada possui alta performance na descoloração de concentrações mais elevadas. Verificou-se ainda, a capacidade da bactéria em biodegradar o corante na presença de diferentes fontes de carbono (glicose, amido lactose e extrato de malte). Este estudo comprova que o tratamento biológico de efluentes têxteis pode ser uma alternativa menos onerosa e ambientalmente mais interessante do que as demais técnicas físicas e químicas e que micro-organismos que degradam corantes têxteis devem ser prospectados não somente em ambientes que tiveram contato prévio com estes compostos como relatados pela maioria dos estudos na literatura científica, mas também em ambientes inóspitos como solos de aterros sanitários. As características inóspitas deste tipo de ambiente podem garantir vantagens adaptativas aos micro-organismos durante possíveis aplicações em processos biorremediativos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Efluente Têxtil, Biorremediação, Descoloração.

### INTRODUÇÃO

Os corantes em efluentes de indústrias têxteis apresentam persistência e recalcitrância, sendo na maioria das vezes tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos. Além disto, o descarte deste efluente em corpos hídricos ocasiona problemas estéticos e dificulta a penetração de luz e transferência de oxigênio para a água afetando a vida aquática.

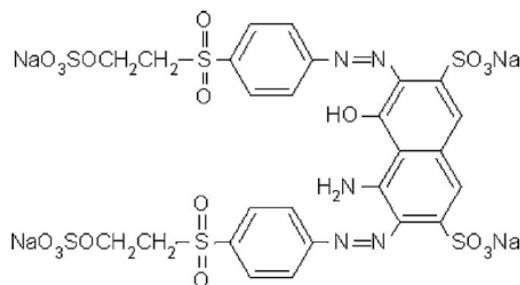
Dos corantes descartados nos efluentes de indústrias têxteis 76% pertencem à classe dos reativos (36%), ácidos (25%) e diretos (15%) (ANJALI et al. 2007). Os corantes reativos tem sua ampla aplicação devido à

capacidade de se ligar covalentemente com as fibras celulósicas (por exemplo, algodão), apresentarem ampla variedade de cores e facilidade de aplicação com baixo consumo de energia (LEE e PAVLOSTATHIS, 2004). Os principais grupos cromóforos desta classe de corante são azo, antraquinona e ftalocianina (AXELSSON et al. 2006). O corante remazol Black B 133% é um exemplo de corante reativo com grupo cromóforo diazo ( $-N=N-$ ) (Figura 1).

O tratamento de águas residuárias de indústria têxtil envolve métodos químicos e físicos como adsorção, coagulação, oxidação, filtração, ozonização e aplicação da radiação ionizante. Cada método possui suas particularidades quanto à velocidade de operação e capacidade de descoloração, que geralmente é eficiente. Entretanto, os custos destes métodos são elevados e pode ocorrer a formação de resíduos contendo o corante que deve ser descartado corretamente (MAIER et al. 2004; PARK et al. 2007).

Nas últimas décadas, os processos biológicos têm se destacado como alternativa para a descoloração de efluentes têxteis devido ao seu baixo custo e compatibilidade ambiental uma vez que micro-organismos que possuam a capacidade de biodegradar as diferentes estruturas químicas dos corantes sintéticos são utilizados. Os fungos filamentosos e leveduras têm apresentado grande potencial de aplicação no tratamento de efluentes têxtil devido às características que os permitem crescer em uma ampla faixa de pH e temperatura e resistir a toxicidade dos corantes (KAUSHIK e MALIK, 2009). Da mesma forma, as bactérias possuem alta taxa de crescimento e alto tempo de detenção hidráulico o que as tornam eficazes no tratamento de diversos efluentes orgânicos, como os gerados na indústria têxtil (SARATALE et al. 2011).

Neste estudo, a capacidade de bactérias isoladas de solo de aterro sanitário em degradar o corante têxtil reativo Remazol Black B 133% foi avaliada. Tais bactérias foram estudadas devido às características inóspitas do ambiente que foram isoladas o que pode garantir vantagens adaptativas às mesmas durante aplicações em processos biorremediativos. Foram avaliados ainda: a.) a capacidade de remoção da cor deste corante em água residuária sintética (ARS) pela linhagem bacteriana mais eficiente; b.) a influência da concentração de NaCl e diferentes fontes de carbono adicionadas à ARS no processo biodegradativo e, c.) a toxicidade do corante à esta linhagem bacteriana.



**Figura 1: Estrutura química do corante Reativo Remazol Black B.**

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Isolamento das bactérias

A partir de uma amostra de solo do aterro sanitário de Cuiabá-MT foram isoladas 24 linhagens de bactérias segundo a metodologia apresentada por Caciano et al. (2012) e estas foram codificadas. Para testar a capacidade das mesmas em degradar o corante têxtil reativo Remazol Black B 133% fez-se um primeiro teste no qual as linhagens foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de cultura caldo nutriente acrescido de 200 mg L<sup>-1</sup> do corante e incubados a 35°C por 48 horas. Neste período avaliou-se visualmente a descoloração do meio e a linhagem bacteriana G5-03 demonstrou a maior capacidade de degradação.

### Teste de biodegradação do corante

A bactéria G5-03 foi selecionada para avaliar sua capacidade de degradação do corante estudado em água residuária sintética (ARS) constituída de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,6 g L<sup>-1</sup>); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 g L<sup>-1</sup>); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,0 g L<sup>-1</sup>); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2 g L<sup>-1</sup>); FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g L<sup>-1</sup>); NaCl (0,1 g L<sup>-1</sup>); CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O (0,02 g L<sup>-1</sup>); glicose (3,0 g L<sup>-1</sup>).

<sup>1</sup>); extrato de levedura ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e pH 7,0 (FRANCISCON, et al, 2009). A ARS foi autoclavada a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e posteriormente o corante foi adicionado na concentração de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  após esterilização por filtração. O experimento desenvolveu-se em triplicata utilizando 100 mL de ARS acrescido de inóculo (bactéria G5-03) na proporção de 2% e incubação a  $35^{\circ}\text{C}$  por 24h em condições estáticas. Tal inóculo foi preparado a partir da suspensão da bactéria em água salina estéril (0,85%) padronizando sua absorbância igual a 1,0 ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) por meio de espectrofotômetro UV/VIS.

Para o acompanhamento da degradação foram feitas leituras do espectro de absorção do corante reativo Remazol Black B 133% em espectrofotômetro UV/VIS nos tempos 0, 3, 6, 8, 10 12 e 24 horas após o início dos experimentos. Acompanhou-se também a porcentagem de degradação do corante por meio da mensuração de suas concentrações no comprimento de onda  $\lambda = 598 \text{ nm}$  (para isso foi feita previamente uma curva padrão absorbância x concentração) segundo a fórmula:

$$\% \text{ Biodegradação do corante} = \frac{\text{Concentração inicial} - \text{Concentração observada}}{\text{Concentração inicial}} \times 100$$

As leituras nesta etapa foram efetuadas a cada hora nas primeiras seis horas de experimento; leitura a cada duas horas até 12 horas do início do experimento e em 24 horas. Anterior às leituras, as alíquotas retiradas dos frascos foram centrifugadas a 3600 rpm por 15 minutos para a sedimentação das células. Assim, foi possível avaliar a biomassa bacteriana durante o processo biodegradativo, uma vez que as células sedimentadas foram ressuspensas e lavadas em água salina (0,85%) por três vezes e posteriormente foi medida a densidade óptica no comprimento de onda  $\lambda = 600\text{nm}$ .

### **Influência da concentração de NaCl, da fonte de carbono e concentração do corante no processo biodegradativo**

A influência de diferentes concentrações de NaCl (1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/L) no processo de descoloração do corante em ARS foi avaliada uma vez que efluentes derivados de indústria têxtil apresentam altas salinidades e isso permitirá avaliar a aplicabilidade desta linhagem bacteriana no tratamento deste efluente. Da mesma forma, avaliou-se a influência de outras fontes de carbono (lactose, amido e extrato de malte) em substituição à glicose na ARS.

Em relação à concentração do corante na ARS, diversas concentrações (100; 250; 500; 750 e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram estudadas para avaliação do potencial tóxico do corante para a bactéria estudada. As condições de incubação e produção e utilização do inóculo nestas etapas foram as mesmas relatadas anteriormente e as leituras de absorbância das amostras ocorreram nos tempos 6, 12 e 24h.

### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos a análise de variância a um critério (ANOVA) seguido pelas comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos. Os testes foram efetuados no software BioEstat 5.3.

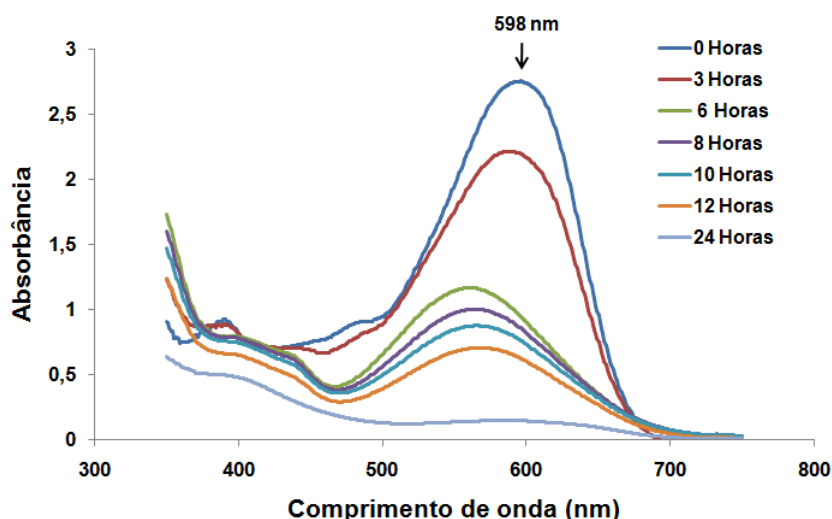
## **RESULTADOS**

A bactéria codificada como G5-03 foi a que demonstrou maior capacidade de degradação, removendo a cor do corante entre seis e oito horas no meio de cultura caldo nutriente acrescido de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  do corante. Quanto à morfologia, essa linhagem possui a forma de bastonete e em resposta a coloração diferencial de Gram, é uma Gram-negativa.

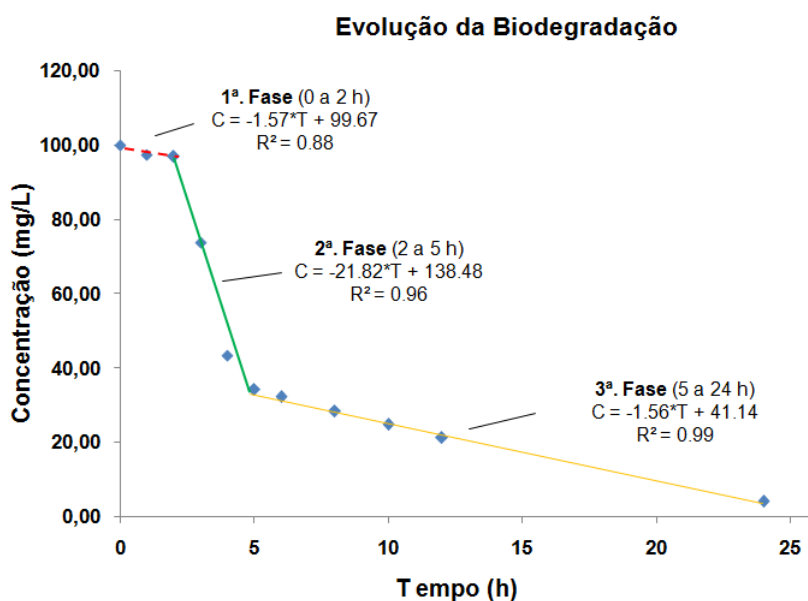
As Figuras 2 e 3 apresentam, respectivamente, os espectros de absorção do corante reativo Remazol Black B 133% e a concentração deste corante submetido à biodegradação pela bactéria G5-03 em ARS por 24 h. É possível verificar que o pico de absorção máxima do grupo cromóforo (598 nm) decresceu no período estudado, indicando a biodegradação do corante pela bactéria (Figura 1). Consoante a Figura 2, constatou-se a presença durante o período estudado de três etapas constituintes da evolução da biodegradação. Na primeira etapa (0 a 2h) denominada de fase lag, a biodegradação é baixa (3,14%), devido esta ser uma fase de adaptação do inóculo ao novo ambiente com a atividade metabólica voltada principalmente ao reparo celular e produção enzimática. Na segunda etapa (2 a 5h), ocorre a maior taxa de biodegradação horária representando 62,65%

nesta fase e uma degradação acumulada de 65,79%. Por fim, no terceiro estágio, aqui referenciado ao período de 5 a 24 h, verifica-se a diminuição desta taxa, com degradação de 30,03% na fase sendo 12,92% no período entre 5 e 12h e 17,11% no período de 12 a 24 h. Ao final destas três etapas houve degradação acumulada de 95,82% do corante estudado.

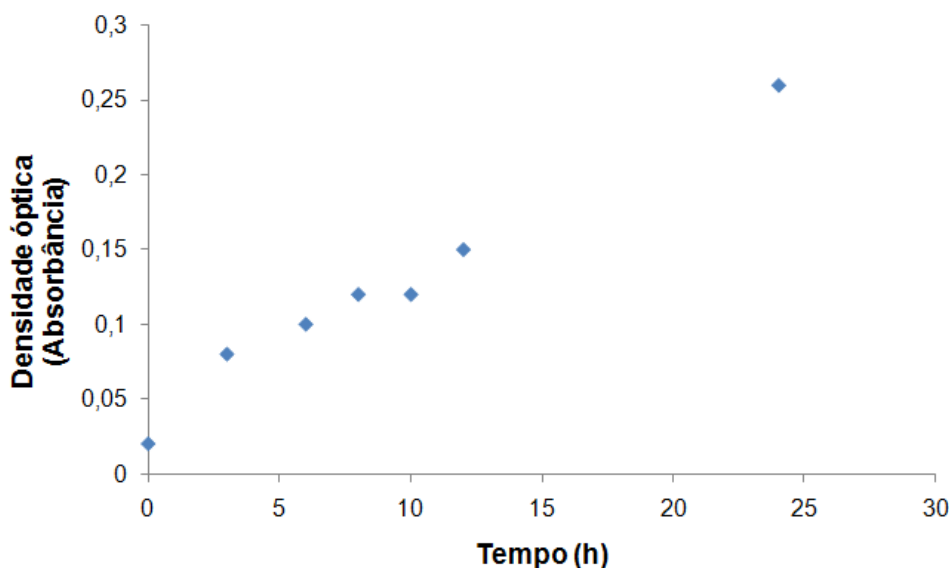
A Figura 4 apresenta a curva de crescimento da bactéria (biomassa bacteriana) medida pela densidade óptica durante o período de biodegradação mostrando o crescimento exponencial da bactéria durante as 12 primeiras horas.



**Figura 2.** Espectros de absorção do corante Remazol Black B 133% durante os testes de biodegradação em ARS inoculada pela bactéria G5-03.



**Figura 3:** Evolução da biodegradação do corante Remazol Black B 133% em ARS inoculada com a bactéria G5-03.



**Figura 4:** Biomassa bacteriana na ARS durante o período de biodegradação medida pela densidade óptica.

#### Efeito da salinidade na biodegradação do corante Remazol Black B 133%

A influência da salinidade no processo de biodegradação do corante Remazol Black B 133% foi avaliada uma vez que efluentes de indústria têxteis apresentam, dentre outras substâncias, altas concentrações de sais o que influencia o tratamento biológico dos mesmos. A Tabela 1 apresenta as porcentagens de biodegradação do corante em ARS contendo diferentes concentrações de NaCl.

**Tabela 1:** Porcentagem da biodegradação do corante Remazol Black B em ARS com diferentes concentrações de NaCl.

	NaCl (mg.L <sup>-1</sup> )					
Período (horas)	1	3	5	10	15	20
6	75,23 ± 0,44	78,91 ± 0,52	80,15 ± 0,35	76,23 ± 0,23	77,87 ± 0,43	70,78 ± 0,54
12	85,40 ± 4,11	90,41 ± 0,45	93,36 ± 2,66	88,92 ± 0,03	90,26 ± 0,31	85,14 ± 0,43
24	94,00 ± 4,56	98,36 ± 0,10	98,73 ± 0,66	95,62 ± 0,29	97,18 ± 0,05	96,06 ± 0,04

\* Concentração inicial do corante: 100 mg.L<sup>-1</sup>

Os valores são médias de três repetições acompanhadas do desvio padrão.

A análise de variância a 5% de significância demonstrou que não há diferença estatística ( $F = 0,1936$ ;  $P = 0,9578$ ) entre as médias de biodegradação do corante em ARS com diferentes concentrações de NaCl. A aplicação de micro-organismos no tratamento de efluentes industriais deve considerar a capacidade microbiana em tolerar altas variações de salinidade comum neste tipo de efluente. A bactéria isolada neste estudo apresentou boa capacidade de se adaptar a estas variações não tendo afetado o seu potencial de biodegradação do corante. Vale ressaltar que tal bactéria foi isolada de solo de aterro sanitário, ambiente este com grandes variabilidades de salinidade e outros compostos perigosos, como metais pesados, conferindo à mesma vantagens adaptativas em ambientes com tais características. Ainda em relação à salinidade, Gopinath et al. (2011) afirmaram que por meio de aclimatização prévia dos micro-organismos é possível obter inóculos eficientes em biodegradar corantes em efluentes que apresentem alta salinidade.

### Efeito da concentração do corante na biodegradação

A concentração do corante no efluente pode influenciar sua descoloração devido à combinação de fatores que incluem a toxicidade do mesmo e habilidade da enzima reconhecer eficientemente o corante em baixas concentrações (PEARCE et al. 2003). Foi observado que o aumento da concentração inicial do corante Remazol Black B 133% diminui a eficiência de descoloração em um mesmo intervalo de tempo (Tabela 2). Entretanto, ao considerar a quantidade de corante degradada por hora nas concentrações 100,0; 250,0; 500,0; 750,0 e 1000,0 mg.L<sup>-1</sup> verificou-se que há um aumento na taxa de biodegradação: 3,99 mg.h<sup>-1</sup>; 8,15 mg.h<sup>-1</sup>; 15,38 mg.h<sup>-1</sup>; 21,63 mg.h<sup>-1</sup>; 28,89 mg.h<sup>-1</sup>, respectivamente. Este resultado indica que a bactéria estudada possui alta performance na descoloração de concentrações mais elevadas do corante.

**Tabela 2: Influência da concentração do corante Remazol Black B 133% no processo biodegradativo.**

	Concentração do Corante (mg.L <sup>-1</sup> )				
Período (horas)	100	250	500	750	1000
6	67,74 ± 0,68	48,64 ± 3,51	34,05 ± 5,83	24,89 ± 5,83	23,80 ± 6,41
12	78,71 ± 0,45	67,65 ± 0,07	67,48 ± 10,24	64,42 ± 10,24	62,30 ± 13,15
24	95,82 ± 0,34	78,26 ± 3,56	73,82 ± 2,16	69,23 ± 2,16	69,33 ± 2,40

### Efeito da fonte de carbono na ARS na biodegradação do corante

A redução de corantes azo e consequentemente sua descoloração depende da presença e disponibilidade no meio de co-substratos que atuam como doadores de elétrons para clivagem reductiva das ligações azo (MODI et al. 2010). A bactéria G5-03 apresentou capacidade de descoloração do corante na presença das fontes de carbono avaliadas: glicose (95,82%), amido (88,17%), lactose (85,97%) e extrato de malte (96,89%) (Tabela 3) após 24 horas de incubação. Ao contrário do que foi observado neste estudo, Saratale et al. (2009) não verificou descoloração do corante Scarlet R em meio semi-sintético quando foi utilizado amido como fonte de carbono e apenas 10% do corante foi degradado quando se utilizou extrato de malte.

**Tabela 3: Influência da fonte de carbono na biodegradação do corante Remazol Black B 133%.**

	Fonte de Carbono na ARS			
Período (horas)	Glicose	Amido	Lactose	Extrato de Malte
6	67,74 ± 0,68	62,82 ± 0,10	65,13 ± 0,78	69,73 ± 0,23
12	78,71 ± 0,45	72,66 ± 0,52	72,76 ± 0,55	87,27 ± 0,30
24	95,82 ± 0,34	88,17 ± 0,57	85,97 ± 1,71	96,89 ± 0,16

## CONCLUSÕES

O tratamento biológico de efluentes de indústria têxtil utilizando micro-organismos é uma alternativa com custos menores e ambientalmente correta quando comparado às demais técnicas de tratamento físicas e químicas. A bioprospecção de micro-organismos degradadores de corantes deve considerar não somente aqueles ambientes que tiveram contato prévio com o composto a ser degradado mas também ambientes inóspitos como solo de aterro sanitário, como ficou comprovado neste estudo. Tais ambientes impactados podem prover micro-organismos com capacidade adaptativa de interesse à aplicação da biorremediação.

A bactéria G5-03 mostrou a capacidade de biodegradar e remover a cor do corante remazol Black B 133% em água residuária sintética no período de 24h com maior taxa de degradação entre 2 e 5h. Esta bactéria demonstrou a capacidade de biodegradar o corante em diferentes fontes de carbono (glicose, amido, lactose e extrato de malte), e não teve a capacidade biodegradativa afetada em salinidade moderada (20 mg.L<sup>-1</sup>). Os estudos sobre a toxicidade do corante para a bactéria indicaram que esta possui melhor capacidade biodegradativa em concentrações mais elevadas do corante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANJALI, P.; POONAM, S.; LEELA, I. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.59, p.73–84, 2007.
2. AXELSSON, J.; NILSSON, U. TERRAZAS, E.; ALIAGAA, T. A.; WELANDER, U. Decolorization of the textile dyes Reactive Red 2 and Reactive Blue 4 using *Bjerkandera* sp. Strain BOL 13 in a continuous rotating biological contactor reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.32–37, 2006.
3. CACIANO, F. I.; SILVA, E. A. A.; GOLIN, R. F.; LIMA, Z. M.; MORAIS, E. B. Bactérias redutoras de cromo hexavalente isoladas de solos de aterro sanitário. In: XV SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL. 2012. Anais. Belo Horizonte, MG. 2012.
4. FRANCISCON, E.; ZILLE, A.; DIAS, G. F.; RAGAGNIN, M. C.; DURRANT, L. R.; CAVACO, P. A. Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.63, p.280-288, 2009.
5. GOPINATH, K. P.; KATHIRAVAN, M. N.; SRINIVASAN, R.; SANKARANARAYANAN S. Evaluation and elimination of inhibitory effects of salts and heavy metal ions on biodegradation of Congo red by *Pseudomonas* sp. mutant. **Bioresource Technology**, v.102, p.3687-3693, 2011.
6. KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. **Environment International**, v.35, p.127–141, 2009.
7. LEE, Y. H.; PAVLOSTATHIS, S. G. Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions, **Water Research**, v.38, p.1838–1852, 2004.
8. MAIER, J.; KANDELBAUER, A.; ERLACHER, A.; CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, M. G. A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.837–844, 2004.
9. MODI, H. A.; RAJPUT, G.; AMBASANA, C. Decolorization of water soluble azo dyes by bacterial cultures, isolated from dye house effluent. **Bioresource Technology**, v.101, p.6580-6583, 2010.
10. PARK, C.; LEE, M.; LEE, B.; KIM, S. W.; CHASE, H. A.; LEE, J.; KIM, S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia troglia*. **Biochemical Engineering Journal**, v.36, p. 59–65, 2007.
11. PEARCE, C. I.; LLOYD, J. R.; GUTHRIE, J. T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes and Pigments**, v.58, p.179-196, 2003.
12. SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D. CHANG, J. S. GOVINDWAR, S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.42, p.138–157, 2011.