

Biodegradação de corantes têxteis por *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*

Biodegradation of textile dyes by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*

Carolina Andrella Gomes¹, Juliana Feijó de Souza Daniel²

RESUMO

O descarte incorreto de efluentes contaminados por corantes sintéticos é um dos principais problemas ambientais relacionados à indústria têxtil. A biodegradação de corantes utilizando fungos e bactérias é um tipo de tratamento utilizado nos efluentes têxteis, possuindo diversas vantagens, entre elas o baixo custo envolvido e a produção de enzimas atrelada à descoloração. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo principal analisar a descoloração dos corantes têxteis azul de metileno (MB) e vermelho reativo 239 (VR239), quando expostos ao metabolismo das bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*. Esses bacilos são citados na literatura como degradadores de moléculas complexas de corantes sintéticos. Foi realizado um experimento inicial em meio sólido e posterior avaliação da descoloração dos corantes por espectrofotômetro de luz UV-visível, nas condições de 220 rpm e 37°C para o MB e 180 rpm e 30 °C para o VR239, ambos em pH neutro. O *B. cereus* apresentou 100% de descoloração para o corante azul de metileno e 12,49% para o vermelho reativo 239 e *B. thuringiensis* apresentou descoloração de 51,35% para o MB e 37,24% do VR239, em 24 horas. Com os resultados obtidos, a próxima etapa será a realização de análises de DQO (demanda química de oxigênio) e fitotoxicidade, para aprofundar as análises na biodegradação. Os resultados mostram que o microrganismo *Bacillus cereus* apresenta potencial no tratamento de efluentes contaminados por corante sintético azul de metileno.

PALAVRAS-CHAVE: descoloração; azul de metileno; biorremediação.

ABSTRACT

Incorrect disposal of effluents contaminated with synthetic dyes is one of the main environmental problems associated with the textile industry. The biodegradation of dyes using fungi and bacteria is a type of treatment used in textile effluents, with several advantages. Among these, the low cost involved and the production of enzymes linked to discoloration are noteworthy. Therefore, the present study aimed to analyze the discoloration of the textile dyes methylene blue (MB) and reactive red 239 (RR239) when exposed to the metabolism of the bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. These bacilli are mentioned in the literature as degraders of complex molecules of synthetic dyes. An initial experiment was conducted on solid medium, followed by the evaluation of dye discoloration using a UV-visible spectrophotometer, under the conditions of 220 rpm and 37°C for MB and 180 rpm and 30°C for RR239, both at neutral pH. *B. cereus* showed 100% discoloration for methylene blue and 12.49% for reactive red 239, while *B. thuringiensis* showed 51.35% discoloration for MB and 37.24% for RR239, within 24 hours. Based on the results obtained, the next step will involve chemical oxygen demand (COD) and phytotoxicity analyses to further explore biodegradation. The results indicate that the microorganism *Bacillus cereus* demonstrates potential in the treatment of effluents contaminated with synthetic methylene blue dye.

KEYWORDS: decolorization; blue methylene; bioremediation.

1 INTRODUÇÃO

A indústria têxtil é uma das atividades mais antigas, visto que a coloração de tecidos é uma das atividades mais atraentes aos seres humanos. Após centenas de anos desenvolvendo novas práticas e utilizando diversos tipos de materiais, foram desenvolvidos novos corantes sintéticos (Adane *et al.*, 2021).

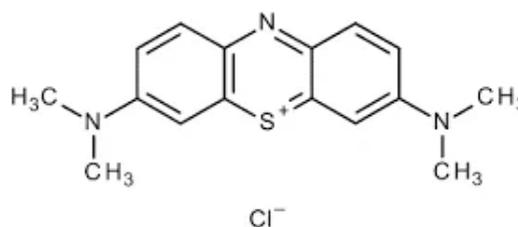
Os corantes são moléculas capazes de absorver radiação luminosa no espectro visível, de forma seletiva, a partir de grupos funcionais chamados cromóforos. Existem

¹ Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: carolinag@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1239459470906607

² Docente no Departamento Acadêmico de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: julianasouza@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5816358738260783

diversas formas de caracterizar corantes, sendo elas de acordo com sua estrutura química ou pelo método no qual ocorre sua fixação à fibra têxtil. O azul de metileno (MB), Figura 1, é um dos corantes mais utilizados, possuindo aplicações não só no tingimento de tecidos, como também na medicina, na cosmetologia e na indústria de papel. É classificado como corante básico aromático heterocíclico que possui comprimento de onda (λ_{\max}) de 664 nm, sendo um corante catiônico da classe de fenotiazinas, apresentando alta solubilidade em água (Benkhaya *et al.*, 2020; Guaratini, Zanoni, 2000).

Figura 1 - Estrutura molecular do corante azul de metileno (MB).



Fonte: Borges, W. *et al.*, 2016.

O vermelho reativo 239 (VR239) é um corante recalcitrante classificado como azóico, devido à presença de uma ou mais ligações azo (-N=N-). É muito utilizado na indústria têxtil devido ao fato de possuir cor vibrante e baixo custo operacional. Entretanto, apesar do amplo uso industrial, o descarte de efluentes contaminados ainda é uma preocupação, já que corantes tendem a dificultar o tratamento de efluentes, devido à alta demanda química de oxigênio (DQO). Esse fato aumenta o custo de tratamento adequado, o que faz algumas indústrias descartarem de forma incorreta em ambientes aquáticos (Chung, 2016).

A presença de corantes na água, mesmo em pequenas concentrações, diminui a transparência e prejudica a fotossíntese realizada pelas plantas, comprometendo todo o equilíbrio do ecossistema local. Além disso, as trocas gasosas na interface água-ar são prejudicadas, o que traz problemas aos peixes e outras espécies aquáticas, além do fato de serem compostos bioacumulativos e com potencial cancerígeno (Adane, 2021; Benkhaya *et al.*, 2020).

Os tratamentos como adsortivos, oxidativos avançados, consorciados e a biodegradação são usados em efluentes têxteis. A biodegradação consiste na conversão de moléculas complexas em uma mais simples e geralmente menos tóxica, utilizando o metabolismo dos microrganismos, como fungos e bactérias. Esse tipo de tratamento possui baixo investimento, sendo uma aplicação direta da biotecnologia. Além disso, apresentam produção de enzimas atrelado à degradação de efluentes, que são compostos com alto valor na indústria, por se tratar de biocatalisadores que desempenham diversas funções nos processos industriais (Almeida, 2016; Adane, 2021).

Os *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* são utilizados na degradação de outros corantes (Deng, 2008; Liao *et al.*, 2013; Wu, 2022). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar a capacidade de descoloração de corantes têxteis MB e VR239 por *B. thuringiensis* e *B. cereus*, para possível aplicação no tratamento de efluentes contaminados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O corante Vermelho Reativo BG-3B (Red 239) foi fornecido pela empresa Golden Technology (2021); o corante azul de metileno foi obtido na Synth; o ágar bacteriológico e o extrato de levedura foram adquiridos na NEOGEN®; a peptona bacteriológica foi obtida na Himedia®; o extrato de carne foi obtido no INLAB; o NaCl foi adquirido na Fmaia; o microrganismo *B. thuringiensis* liofilizado foi obtido por meio de parceria com a UFSCAR e o *B. cereus* em parceria com a UEL.

2.2 ENSAIO EM MEIO SÓLIDO

O meio de cultivo sólido foi preparado com 0,1% de extrato de carne, 0,2% de extrato de levedura, 0,5% de peptona e 2% de ágar e 400 mg/L de corante, diluídos em água destilada. O meio foi disposto em erlenmeyers de 125 ml e levados à autoclave por 15 minutos a 121°C e 2 atm para esterilização. Foram dispostos em placas de petri de vidro de 90 cm de diâmetro para solidificar. Foi preparado 2 ml de solução salina (0,89% NaCl) para a suspensão bacteriana de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*, até obter escala N° 1 na escala de McFarland, com aproximadamente $3 \cdot 10^8$ células.

A suspensão bacteriana foi depositada em estrias sobre o meio sólido, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, sendo levadas à estufa a 37°C e acompanhadas por 24 horas, visualizando o crescimento das colônias puras de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. O ensaio foi realizado em triplicata (Birolli adaptado, 2021).

2.3 PRÉ-INÓCULO

Após 24 horas, uma solução salina foi preparada individualmente para cada bactéria cultivada em meio sólido e adicionada em uma proporção de 2% v/v no pré-inóculo, que foi preparado a partir da composição do meio Luria Bertani (LB): 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C e 2 atm antes da adição da suspensão bacteriana.

O pré-inóculo foi colocado em shaker orbital a 140 rpm por 16 horas antes de ser utilizado no ensaio de descoloração em meio líquido.

2.4 DESCOLORAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

2.4.1 Azul de metileno

O meio líquido escolhido foi o LB, utilizando 50 mg/L do corante azul de metileno, no qual 25 ml de meio foi adicionado a frascos erlenmeyers de 125 ml, colocados em agitação de 220 rpm por 24 horas, com sua descoloração sendo acompanhada inicialmente em intervalos de 3 horas até atingir 12 horas de experimento.

2.4.2 Vermelho Reativo 239

O meio líquido utilizado foi adaptado de Birolli (2021), com composição de 5 g/L de peptona, 2 g/L de extrato de levedura, 1/L de extrato do carne e 5 g/L de sal, além de 50

mg/L de VR239. Foram colocados 25 ml de meio em frascos erlenmeyers de 125 ml, colocados em agitação de 180 rpm por 24 horas, com sua descoloração sendo acompanhada inicialmente em intervalos de 3 horas até atingir 12 horas de experimento.

2.4.3 Análise de descoloração

As amostras retiradas de cada ensaio foram analisadas em espectrofotômetro de luz UV-visível, utilizando a absorbância como parâmetro de descoloração. O comprimento de onda (λ_{max}) para o corante Azul de Metileno foi de 664 nm e o do Vermelho Reativo 239 foi de 545 nm. A porcentagem de descoloração foi calculada a partir da Equação 1.

$$\%_{descoloração} = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Na qual $A_{inicial}$ corresponde à absorbância da amostra inicial, representando o controle de cor e A_{final} a absorbância da amostra após o tratamento. (WU *et al*, 2022).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ENSAIO EM MEIO SÓLIDO

A avaliação visual das placas mostrou que a cor permaneceu a mesma quando comparado ao controle de cor, na presença de 400 mg/L dos corantes MB e VR239. Porém, não foi observado prejuízo no crescimento das colônias de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, mostrando o potencial para ser utilizado em meio líquido.

3.2 DESCOLORAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO

O ensaio em meio líquido foi realizado utilizando o *B. thuringiensis* e *B. cereus* com os corantes MB e VR239. Os resultados obtidos foram mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos no experimento de descoloração do azul de metileno e vermelho reativo 239 por *B. cereus* e *B. thuringiensis*.

Tempo (h)	Corantes	<i>B. cereus</i>		<i>B. thuringiensis</i>	
		$A_{média}$	Desc. (%)	$A_{média}$	Desc. (%)
0	MB	0,289	-	0,686	-
	VR239	0,565	-	0,862	-
3	MB	0,194	32,99	0,599	12,63
	VR239	0,565	0	0,618	28,36
6	MB	0,112	61,25	0,545	20,49
	VR239	0,565	0	0,591	31,44
9	MB	0,093	67,94	0,540	21,26
	VR239	0,554	2,12	0,590	31,55
12	MB	0,060	79,35	0,512	25,31
	VR239	0,535	5,36	0,589	31,67
24	MB	0	100,00	0,334	51,35
	VR239	0,494	12,49	0,541	37,24

Fonte: Autoria própria (2023).

(-) Não apresentou leitura;
MB: Azul de metileno;
VR239: Vermelho reativo 239;
 $A_{\text{média}}$: Absorbância média entre as triplicatas;
Desc.: Descoloração.

A partir dos resultados, foi possível observar que o *B. cereus* foi capaz de descolorir em 100% a amostra contendo 50 mg/L de azul de metileno após 24 horas de experimento, sendo esse o primeiro trabalho da literatura utilizando apenas esse microrganismo na descoloração de azul de metileno, sem adição de surfactantes ou demais compostos que facilitam o processo de descoloração. A descoloração de MB com a utilização de *B. subtilis* apresentou 92% de descoloração após 6 horas, assim como 95% após 12 horas por *B. thuringiensis* (Upendar, 2017; Wu, 2022). Nesse presente estudo, o *B. thuringiensis* descoloriu o corante MB em 51,35% após 24 horas e esse resultado demonstra como o metabolismo de cada cepa de bacilos difere dependendo das condições de conservação, entre outros motivos.

Já com o corante azóico vermelho reativo 239 classificado como recalcitrante, foi descolorido 37,24% por *B. thuringiensis* em 6 horas de tratamento e 12,49% por *B. cereus*. Segundo Olukkani (2013), a descoloração de 80-95% de corantes azóicos foi atingida utilizando *B. thuringiensis*, o que mostra a mesma diferença de metabolismo entre os microrganismos citada anteriormente. Os resultados desse trabalho serão complementados através de análises de DQO, relacionada a quantidade de matéria orgânica presente no efluente, além do teste de fitotoxicidade, realizado em sementes, para analisar a inibição ou mutação no crescimento da radícula.

4 CONCLUSÃO

A descoloração máxima do corante azul de metileno foi de 100% de descoloração usando *B. cereus* e 51,35% por *B. thuringiensis*. Já o vermelho reativo 239 foi descolorido em 12,49% por *B. cereus* e 37,24% por *B. thuringiensis*, ambos em 24 horas. Esses resultados mostram o potencial de utilização de ambos os microrganismos no tratamento de efluentes têxteis, baseado na degradação das moléculas dos corantes utilizados, apesar de diferenças nos metabolismos das cepas terem sido analisadas.

Agradecimentos

Agradeço à UTFPR pela bolsa de estudos, ao Laboratório de Química de Microrganismos e Bioatividade, à professora orientadora do projeto e os colegas de laboratório, ao Laboratório Multiusuário do Câmpus Londrina pelas análises realizadas e os demais técnicos que colaboraram com a pesquisa.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ADANE, T.; ADUGNA, A. T.; ALEMAYEHU, E. Textile industry effluent treatment techniques. **Journal of Chemistry**, v. 2021, p. 1-14, 2021.

BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; EL HARFI, A.. A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 115, p. 107891, 2020.

BIROLI, W. G.; DOS SANTOS, A.; PILAU, E.; RODRIGUES-FILHO, E. New Role for a Commercially Available Bioinsecticide: *Bacillus thuringiensis* Berliner Biodegrades the Pyrethroid Cypermethrin. **Environmental Science and Technology**, v. 55, n. 8, p. 4792–4803, 2021.

BORGES, W. *et al.* Produção, caracterização e avaliação da capacidade adsorviva de carvões ativado em forma de briquete. **Matéria (Rio de Janeiro)**, 2016. 21. 930-942. 10.1590/s1517-707620160004.0086.

CHUNG, K.T. Azo dyes and human health: A review, **Journal of Environmental Science and Health**, 2016, Part C, 34:4, 233-261, DOI: 10.1080/10590501.2016.1236602

DENG, D. *et al.* Decolorization of anthraquinone, triphenylmethane and azo dyes by a new isolated *Bacillus cereus* strain DC11. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 3, p. 263-269, 2008.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova**. 2000, v. 23, n. 1, pp. 71-78. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100013>>. Epub 14 Out 2000. ISSN 1678-7064.

LIAO, C. S.; HUNG, C. H.; CHAO, S. L. Decolorization of azo dye reactive black B by *Bacillus cereus* strain HJ-1. **Chemosphere**, v. 90, n. 7, p. 2109-2114, 2013.

OLUKANNI, O.D. Decolorization of Dyehouse Effluent and Biodegradation of Congo Red by *Bacillus thuringiensis* RUN1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, 2013.

UPENDAR, G. *et al.* Bioremediation of methylene blue dye using *Bacillus subtilis* MTCC 441. **Water Science and Technology**, v. 75, n. 7, p. 1572-1583, 2017.

WU, Kangli *et al.* Decolourization and biodegradation of methylene blue dye by a ligninolytic enzyme-producing *Bacillus thuringiensis*: Degradation products and pathway. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 156, 2022.