III CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ON-LINE 2023

BIODEGRADAÇÃO DO CORANTE AZO VERMELHO REATIVO 239 POR *BACILLUS THURINGIENSIS*

CAROLINA ANDRELLA GOMES; JULIANA FEIJÓ DE SOUZA DANIEL

RESUMO

Os corantes azoicos representam cerca de 70% dos corantes sintéticos utilizados na indústria, principalmente na têxtil, em diversos tipos de fibras. Entretanto, o descarte incorreto desses compostos e o desconhecimento do seu potencial carcinogênico causam problemas à fotossíntese, além da bioacumulação na fauna local. Apesar de apresentarem alto custo, existem diversos tipos de tratamentos para recuperação de ambientes contaminados. Uma das alternativas é a biorremediação utilizando fungos e outros microrganismos. Desse modo, o estudo analisou a resistência do microrganismo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) na presença do corante Vermelho Reativo 239 em meio sólido e a descoloração e produção de enzima lacase em meio líquido. O microrganismo apresentou crescimento em meio sólido e resistência na presença do azo corante com concentração de 400 mg/L. O resultado obtido em meio líquido foi de 33,84% de descoloração e 83,333 U/L de atividade enzimática de lacase em 50 mg/L de corante, pH 6 e 12 horas, caracterizando um composto de difícil degradação, ou seja, recalcitrante. A literatura cita o *B. thuringiensis* como um potencial na biorremediação de corantes têxteis, havendo ainda outras metodologias que podem e serão aplicadas, em busca da obtenção de resultados de mais de 90% de descoloração, como mostram a maioria das pesquisas atuais. Em relação à produção de enzimas, o *Bt* é bastante associado à lacase e os estudos mostram que essas enzimas estão diretamente ligadas à descoloração. Dessa forma, o próximo passo da pesquisa é a otimização do experimento, assim como a análise enzimática de lacase e lignina peroxidase.

Palavras-chave: Azoico; biorremediação; carcinogênico; descoloração; recalcitrante.

1 INTRODUÇÃO

Os corantes são substâncias amplamente aplicadas na indústria, principalmente como forma de agregar valor aos produtos finais de diversas indústrias, assim como padronização da apresentação final da linha de produção. Devido a presença de grupos cromóforos, os corantes são capazes de colorir diversos tipos de fibras, a partir da sua capacidade de absorver luz no espectro visível, além de apresentar grupos auxiliares, como ácido carboxílico, ácido sulfônico, amino etc. Dentre os principais tipos de corantes utilizados no mercado atual, encontram-se os corantes ácidos, azoicos e dispersos (GUARATINI; ZANONI; 2000).

Os azo corantes, ou azoicos, são substâncias que possuem em sua composição ao menos uma dupla ligação entre nitrogênios (-N=N-), o que confere maior resistência à degradação, assim como proporciona a formação de metabólitos tóxicos quando há quebra dessas moléculas, sendo considerados recalcitrantes. Além disso, esses compostos apresentam grande potencial carcinogênico, visto que, quando entram em contato com o metabolismo humano, após ser metabolizado por enzimas, geram subprodutos tóxicos

DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931

potencialmente cancerígenos (KING- THOM, 2016).

Além dos perigos oferecidos à saúde humana, é importante ressaltar os problemas ambientais desencadeados pelo descarte incorreto de efluentes contaminados, como efluentes de indústrias têxteis, que possuem alta concentração de azo corantes. A presença de substâncias indesejadas nas águas fluviais traz prejuízos à fauna e flora locais, como nas atividades de fotossíntese, devido à dificuldade da passagem de luz e as trocas gasosas na interface da água e ar. Desse modo, é preciso encontrar formas de tratamento para essas águas contaminadas, de forma a remediar o ambiente e devolver a saúde aos animais e plantas locais, além de evitar a contaminação posterior dos seres humanos, caso ocorra o consumo dessa água contaminada (KING-THOM, 2016; ALMEIDA, 2016).

Como formas de remediação, é possível citar procedimentos como a precipitação química, adsorção, troca iônica, processo eletroquímico e a biodegradação. A biodegradação consiste na degradação da molécula de corante em subprodutos menos tóxicos que podem ser tratados de maneira mais eficaz, realizado por microrganismos, como fungos e bactérias, sendo uma opção viável em comparação com os atuais mecanismos utilizados. Há diversas literaturas que citam a utilização de microrganismos na biorremediação de ambientes contaminados, chegando em 95% de descoloração, além do bônus que está acarretado à produção de enzimas, que possuem grande valor à indústria (ORLANDELLI et al., 2012).

Como exemplo, o *Bacillus thuringiensis (Bt)* apresenta ótimo desempenho tanto na descoloração dos efluentes, quanto na produção de enzimas lacases e ligninas peroxidases, que são induzidas pela presença de compostos como corantes azoicos. Os corantes Azul de Metileno e Vermelho Congo são exemplos de corantes azo degradados por *B. thuringiensis*, apresentando mais de 90% de descoloração em ambos, além da produção de enzimas lacases (WU et al, 2022; OLUKANNI, 2013). Dessa forma, o objetivo dessa pesquisa foi analisar o crescimento do *B. thuringiensis* em meio sólido na presença do corante Vermelho Reativo 239, além de sua capacidade de descoloração e produção de enzima lacase em meio líquido.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

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

2.2 REATIVAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

O meio de cultivo foi preparado com 0,1% de extrato de carne, 0,2% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 2% de ágar, 20 ml de água destilada e 400 mg/L de corante Vermelho Reativo 239. O meio foi disposto em erlenmeyers de 125 ml, que foram levados à autoclave por 20 minutos a 121°C e 2 atm. Foi preparado 2 ml de solução salina (0,89% NaCl) para a suspensão bacteriana do Bt em forma de esporos liofilizados, apresentando leitura de densidade óptica de 0,1 a 620 nm. A suspensão bacteriana foi estriada pelas placas com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, sendo vedadas e levadas à estufa a 37°C por 24 horas, visualizando o crescimento das colônias puras de *B. thuringiensis*. O ensaio foi realizado em triplicata (BIROLLI adaptado, 2021).

2.3 ENSAIO EM MEIO LÍQUIDO

DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931

A preparação do inóculo para o meio líquido consistiu no *Bt* reativado com a presença do corante sendo adicionado a 100 ml do meio LB e deixado sob agitação de 140 rpm a 30 °C por 14 horas. O meio líquido foi preparado com 1 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de NaCl, 1 g/L de glucose, 1 g/L de Na_2HPO_4, 1 g/L de KH_2PO_4, 0,5 g/L de $MgSO_4.7\ H_2O$ e 0,1 g/L de $CaCl_2.2\ H_2O$, formando 50 ml de meio nutriente para cada frasco erlenmeyer de 125 ml, que foram autoclavados por 20 minutos, a 121°C e 2 atm. O pH do meio foi ajustado com solução aquosa de HCl 0,5 M e NaOH 0,5 M (WU et al, 2022).

Adicionou-se 4% (v/v) de inóculo e 1 ml de corante Vermelho Reativo 239, com concentração de 50 mg/L. O experimento foi acompanhado por 12 horas, e alíquotas foram tiradas a cada 3 horas. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 6000 rpm para separação do meio líquido e da biomassa bacteriana. Alíquotas de 2 ml foram retiradas de cada tratamento e mantidas em *eppendorfs*, para posterior análise de atividade enzimática e descoloração.

2.4 ANÁLISE DE DESCOLORAÇÃO

Para o ensaio, foi realizado uma diluição 1:3 da amostra em água destilada, com o ensaio sendo realizado em um espectrofotômetro de luz UV-visível. O comprimento de onda para leitura do corante Vermelho Reativo 239 corresponde ao de 545 nm. A porcentagem de descoloração foi calculada a partir da Equação 1.

$$\%descoloração = \frac{Ainicial - Afinal}{Ainicial} * 100 \quad (1)$$

Onde $A_{inicial}$ corresponde à leitura da absorbância do controle abiótico e A_{final} à leitura da absorbância da amostra do tratamento (WU et al, 2022).

2.5 ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi determinada pela Equação 2 e utilizou valores como o fator de diluição (Fd), volume de amostra empregado (V) e coeficiente de extinção molar do substrato (ε), além do tempo e absorbâncias das reações, sendo R a reação principal, C1 o controle da reação sem substrato e C2 o controle sem enzimas.

$$U/ml = \frac{R-(C1+C2)}{\varepsilon * V} * FD * 1000 \quad (2)$$

Para a atividade de lacase, o sistema de incubação foi montado com 0,2 ml de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) (0,001 M), 0,6 ml de solução de tampão citrato-fosfato (0,1 M; pH 5,0), 0,2 ml de água destilada, 1,0 ml de enzima, com leitura realizada em 420 nm. As reações ocorreram durante 5 minutos em temperatura de 50 °C (WU *et al*., 2022).

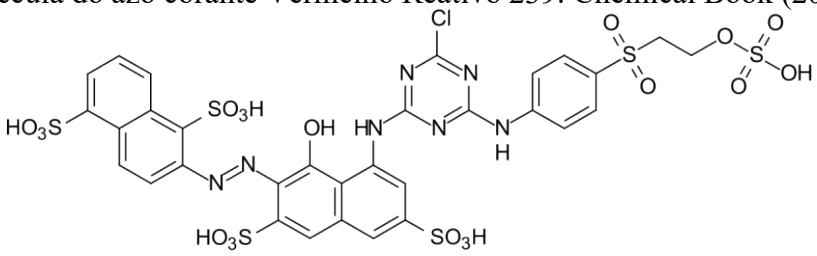
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 REATIVAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

O azo corante utilizado nos ensaios foi o Vermelho Reativo 239, representado na Figura 1, na qual é possível observar a presença de uma ligação azo (-N=N-) em sua molécula, assim como grupos auxiliares e cromóforos que absorvem no máximo de 545 nm.

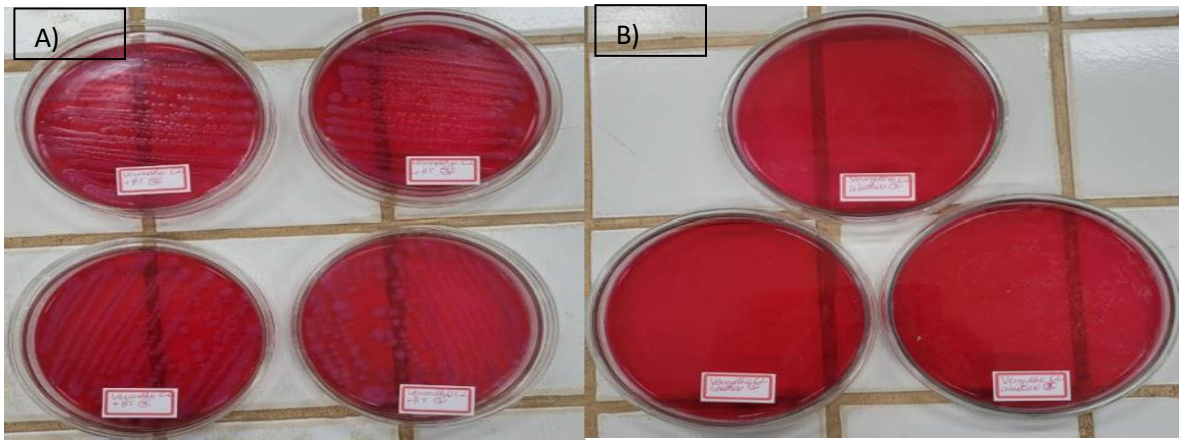
DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931

Figura 1 – Molécula do azo corante Vermelho Reativo 239. Chemical Book (2022).



A reativação em meio sólido foi realizada com 400 mg/L de corante Vermelho Reativo 239, a fim de avaliar a resistência do *Bt* ao composto tóxico. A Figura 2 mostra o crescimento normal e formação de colônias, o que representa boa resistência do Bt ao ambiente contaminado com corante. Entretanto, não houve descoloração visual do meio sólido, o que já seria um bom indicativo do microrganismo conseguir degradar a molécula recalcitrante. Por fim, esse primeiro contato do *Bt* com o corante promoveu uma adaptação ao composto tóxico, o que pode melhorar seu desempenho em meio líquido.

Figura 2 - *Bacillus thuringiensis* cultivado em meio sólido na presença do corante Vermelho Reativo 239. A) Bt + Vermelho Reativo 239; B) Controle abiótico do corante Vermelho Reativo 239.



É válido ressaltar que as colônias de *Bt* apresentaram coloração rosada quando em contato com o corante, podendo indicar adsorção do corante na bactéria. São necessárias outras análises microscópicas para analisar a capacidade de adsorção do microrganismo, porém visualmente é perceptível que a bactéria apresentou afinidade com o composto colorido.

3.2 ENSAIO EM MEIO LÍQUIDO

A metodologia utilizada para o ensaio em meio líquido foi realizada por Wu et al. (2022), que mostrou um meio líquido suplementado com micronutrientes, como a presença de sulfato de magnésio e cloreto de cálcio, que auxiliam e incentivam o crescimento de microrganismos. O experimento foi realizado em 12 horas, com pH 6, rotação de 140 rpm, 50 mg/L de corante e 30 °C, que foi mostrada como temperatura ótima de ação do *Bt* na pesquisa citada.

DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931

3.3 ANÁLISE DE DESCOLORAÇÃO

A análise de descoloração foi realizada em alíquotas retiradas a cada 3 horas, totalizando 12 horas de experimento. Os principais resultados obtidos foram apresentados na Tabela 1. O ensaio CA1 corresponde ao controle abiótico do corante Vermelho Reativo 239, o qual foi utilizado como absorbância inicial, visto que representa o meio sem tratamento de descoloração por Bt. Os demais ensaios correspondem as alíquotas retiradas no tempo estipulado previamente. As absorbâncias foram medidas três vezes, sendo utilizada nos cálculos apenas a média entre elas. A porcentagem máxima de descoloração obtida foi de 33,84%.

Tabela 1 – Resultados da análise de descoloração de 50 mg/L do corante Vermelho Reativo 239 por *Bacillus thuringiensis.*

Tempo (h)	Ensaio	A1	A2	A3	AMédia	Descoloração (%)
0	CA1	0,96	1,094	0,963	1,006	-
3	E1	0,791	0,804	0,803	0,799	20,52
5	E2	0,77	0,76	0,759	0,763	24,13
8	E3	0,691	0,7	0,691	0,694	30,99
10	E4	0,669	0,683	0,683	0,678	32,55
12	E5	0,66	0,669	0,667	0,665	33,84

O comportamento da curva de descoloração foi mostrado na Figura 2, sendo possível observar um crescimento exponencial nas primeiras 3 horas, seguindo para um crescimento linear mais brando nas outras 9 horas de ensaio. Comparado com a literatura, pode-se dizer que o gráfico apresentou características esperadas, apesar do resultado da descoloração não ter sido maior.

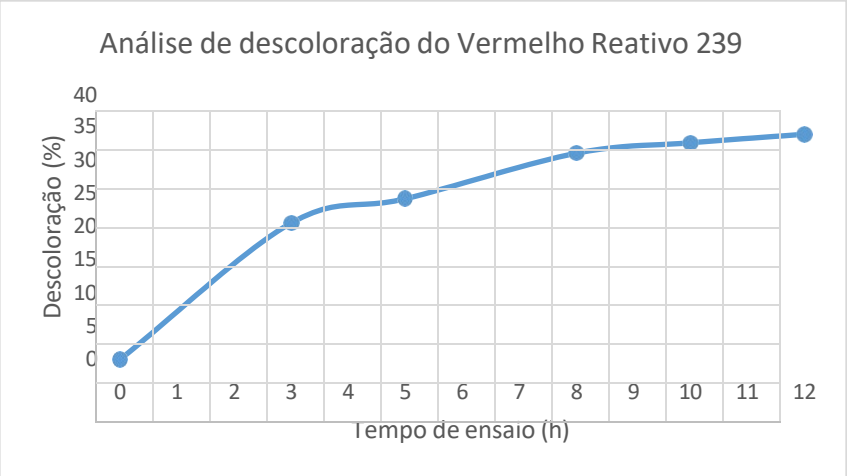


Figura 3 – Gráfico da análise de descoloração do corante Vermelho Reativo 239 por *Bacillus thuringiensis.*

Quanto à porcentagem de descoloração, os resultados dessa pesquisa inicial estão abaixo da maioria dos trabalhos que descoloriram diferentes classes de corantes em 70-95%, como citado na Tabela 2. Entretanto, o melhor resultado foi obtido após 12 horas, correspondendo a 33,84%, o que pode significar que o Vermelho Reativo 239 corresponde a um composto recalcitrante, assim como citado por Olukanni *et al.* (2013) em relação ao

DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931

Violeta Cristal, cuja descoloração chegou a 22,62%. Essa dificuldade de degradação pode estar relacionada à produção de subprodutos tóxicos que inibem a ação das bactérias, prejudicando o processo de descoloração.

Tabela 2 – Alguns trabalhos com corantes biodegradados por *Bacillus thuringiensis.*

Corante	Classificação do corante	Tempo (h)	%descoloração	Metodologia
Azul de metileno	Azo	12	95	WU *et al*. 2022
Vermelho de metila	Azo	6	91,15	Olukanni *et al*. 2013
Azul reativo 13	Azo	6	97,3	Olukanni *et al*. 2013
Vermelho Congo	Azo	12	72,84	Olukanni *et al*. 2013
Verde malaquita	Trifenilmetano	24	82,02	Olukanni *et al*. 2013
Violeta cristal	Trifenilmetano	24	22,62	Olukanni *et al*. 2013

3.4 ANÁLISE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi analisada em relação a metodologia da lacase e buscou observar a produção de enzima vinculada com a descoloração do corante azoico. Na Tabela 3 estão os resultados obtidos pela metodologia de Wu *et al.* (2022), com o melhor resultado sendo obtido após 12 horas, mostrando que a produção de enzima pode estar vinculada à descoloração do meio líquido. Pela metodologia seguida, a produção de lacase chegou a cerca de 17 U/ml, enquanto que essa pesquisa chegou a 83,333 U/L.

Tabela 3 – Resultados obtidos a partir da análise da atividade enzimática de lacase no meio líquido.

Horas	Ensaio (mg/L)	Lacase U/L
0	50	7,333
3	50	8,333
6	50	12,500
9	50	2,778
12	50	83,333

É importante ressaltar que há diversos parâmetros a serem avaliados e variados no novo experimento, como a porcentagem (v/v) de inóculo presente no meio, já que influenciam diretamente na produção de esporos, enzimas e nos resultados de descoloração. Além disso, parâmetros físicos como temperatura e rotação do *shaker* também podem ser variados, a fim de esgotar todas as possibilidades que podem auxiliar ou prejudicar no tratamento de biorremediação.

A pesquisa está em andamento, na tentativa de aumentar a porcentagem de descoloração a partir do *Bt*, além de analisar também a influência do corante na produção de enzimas lacases e ligninas peroxidases. A literatura aponta o *Bt* como potencial na biorremediação de corantes têxteis (90% de descoloração), havendo ainda outras metodologias a serem exploradas, em busca da obtenção de resultados excelentes. Em relação a produção de enzimas, o *Bt* produz lacase, de acordo com estudos recentes. Dessa forma, o próximo passo da pesquisa é a otimização do experimento, visando melhores resultados de descoloração e atividade enzimática.

4 CONCLUSÃO

DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931

O microrganismo *B. thuringiensis* apresentou crescimento em meio sólido na presença do corante azoico Vermelho Reativo 239 na concentração de 400 mg/L. Além disso, em meio líquido, seguindo a metodologia do Wu *et al*. (2022), a descoloração do meio teve como melhor resultado 33,84% e a atividade enzimática chegou a 83,333 U/L, podendo ser comparada à descoloração apresentada por Olukanni *et al.* (2013) em relação ao corante Violeta Cristal, que apresentou 22,62%, caracterizando um composto recalcitrante. É válido ressaltar que esse ensaio não foi otimizado estatisticamente, ou seja, a metodologia pode trazer resultados ainda melhores para a biodegradação de corantes azoicos.

A literatura aponta o *B. thuringiensis* como um potencial na biorremediação de corantes têxteis, havendo ainda outras metodologias que podem e serão aplicadas, em busca da obtenção de resultados de mais de 90% de descoloração, como mostra a maioria das pesquisas atuais. Em relação à produção de enzimas, o Bt é bastante associado à lacase e os estudos mostram que essas enzimas estão diretamente ligadas à descoloração, ao passo que quanto maior a produção de lacase, maior será a descoloração. Dessa forma, o próximo passo da pesquisa é a otimização do experimento, assim como a análise enzimática de lacase e lignina peroxidase relacionadas à descoloração.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. *et al*. **A indústria têxtil no Brasil**: Uma revisão dos seus impactos ambientais e possíveis tratamentos para os seus efluentes. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro - SP, 2016.

BIROLLI, 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.

GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Química Nova** [online]. 2000, v. 23, n. 1, pp. 71-78. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100013>. Epub 14 Out 2000. ISSN 1678-7064. Acesso em: 4 set. 2022.

FIOROTTO, Nilton. **Química dos corantes**. In: PORTAL SENAI - SP. São Paulo - Brás, 2022. Disponível em: https://textil.sp.senai.br/5725/quimica-dos-corantes. Acesso em: 4 out. 2022.

KING-THOM, Chung. 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. Disponível em: < https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10590501.2016.1236602>. Acesso em: 7 out. 2022.

OLUKANNI, O. D.; OSUNTOKI, A. A.; KALYANI, D. C.; GBENLE, G. O.; GOVINDWAR, S. P. Decolorization and biodegradation of Reactive Blue 13 by Proteus mirabilis LAG. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, n. 1–3, p. 290–298, 2010. Elsevier B.V.

OLUKANNI, O.D. Decolorization of Dyehouse Effluent and Biodegradation of Congo Red by Bacillus thuringiensis RUN1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 23, 2013. Disponível em: https://koreascience.kr/article/JAKO201331056191838.page. Acesso

em: 6 jul. 2022.

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**, [s. l.], v. 156, 2022.

DOI: 10.51189/iii-conbiotec/13931