

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE E BIODEGRADAÇÃO NO CULTIVO DE *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* COM CORANTE AZUL DE METILENO

Tailena Naiara R. FABRÍCIO (1); Marylia A. BRAGA (1); Thamara Rosy S. GOMES (1); Ana Karine P. VASCONCELOS (2) Marisete Dantas de AQUINO (2), Rinaldo ARAÚJO (3)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Avenida 13 de Maio, 2081, Benfica, 60411-220, Fortaleza – CE – Brasil, Fone: (85) 33073611, e-mail: tailena@hotmail.com

(2) Universidade Federal do Ceará/Departamento de Engenharia Hidráulica e Ambiental (DEHA)/Pós-graduação em Saneamento Ambiental

(3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará/Pós-graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental, e-mail: rinaldo@ifce.edu.br.

RESUMO

Os corantes, que apresentam uma variedade de usos, são descartados, muitas vezes, junto com os efluentes nos corpos aquáticos, devido a perdas nos processos, o que constitui um grave problema ambiental. O tratamento biológico é uma importante alternativa a ser considerada entre as tecnologias disponíveis. Assim este trabalho objetiva estudar a produção de biossurfactante associada à biodegradação de um corante de propriedades bastante recalcitrantes, o azul de metileno, em condição aeróbia e termofílica e na ausência de fontes adicionais de carbono. Durante o cultivo foram avaliadas as variáveis de cor, pH, proteínas totais, biomassa e atividade de emulsificação. Os resultados mostraram que houve degradação do corante azul de metileno por *G. stearothermophilus* nas condições investigadas, o que foi evidenciado pela redução de cor, especialmente para a menor concentração inicial em estudo do corante (10 mg/L). Foi observado ainda biossorção do corante devido às interações com a parede celular do microrganismo. A produção de biossurfactante pode ser considerada satisfatória, sendo superior a 30% após 24 h na menor concentração de cultivo.

Palavras-chave: azul de metileno, *Geobacillus stearothermophilus*, biossurfactante, biodegradação

1. INTRODUÇÃO

Os corantes, que apresentam uma variedade de usos, são descartados, muitas vezes, junto com os efluentes nos corpos aquáticos, devido a perdas nos processos, o que constitui um grave problema ambiental. O tratamento biológico é uma importante alternativa a ser considerada entre as tecnologias disponíveis.

Águas residuárias são fontes de poluição para os corpos aquáticos, degradando a qualidade dos mananciais e prejudicando a biota e os usos mais nobres relacionados ao consumo humano. Segundo Guarantini e Zaoni (2000), o lançamento não controlado de corantes provoca uma acentuada mudança de coloração da água, interferindo na absorção da luz pelos seres do ambiente aquático, contaminando os mananciais e a água distribuída à população.

O azul de metileno é um corante tiazínico, tipo catiônico, comumente aplicado na produção de papel e outros materiais como poliésteres e nylons. Seu uso original no setor têxtil envolve o tingimento em seda, lã e algodão, apesar de não apresentarem boa solidez à luz e à lavagem. Alguns corantes básicos apresentam atividade biológica e são utilizados como anti-sépticos (Hunger, 2003). O azul de metileno apresenta em sua composição a estrutura da fenotiazina, composto que está presente em antihistamínicos e antipsicóticos.

O desenvolvimento de tecnologia adequada para tratamento de efluentes tem sido objeto de grande interesse nos últimos tempos devido ao aumento da conscientização e rigidez das leis ambientais. As principais técnicas disponíveis na literatura para descoloração das águas de rejeito envolvem principalmente processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica, fotoquímica, biodegradação, etc (Guaratini e Zanoni, 2000).

O tratamento biológico constitui-se em uma tecnologia onde se emprega microrganismos com a finalidade de degradar completamente os contaminantes do efluente ou de reduzir os contaminantes e gerar um efluente de acordo com a legislação. Para este fim, o *Geobacillus stearothermophilus* surge como um microrganismo de características biotecnologicamente (Paz, 2005). O *G. stearothermophilus* pertence à nova classificação dos microrganismos da família *Bacillae*, sendo uma bactéria Gram-positiva, termofílica e halofílica além de ter uma excelente capacidade de produção de biossurfactante, com estabilidade em condições adversas de pH, temperatura e salinidade e grande redução de tensão superficial.

Os biossurfactantes possuem vantagens especiais sobre surfactantes químicos, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, produção a partir de substratos renováveis, e a capacidade de modificação estrutural através da engenharia genética ou técnicas bioquímicas. Porém, ainda não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos, principalmente devido ao seu alto custo (Colla et. al., 2003).

Diante disso, neste trabalho propõe-se avaliar a produção de biossurfactantes associada à degradação de corante durante o cultivo de *G. stearothermophilus* na presença de azul de metileno, sob condições de termofilia e sem fontes suplementares de carbono.

2. METODOLOGIA

2.1 Corante

O corante utilizado no experimento foi o azul de metileno (marca Vetec®), apresentado na Figura 1, o qual é um composto aromático heterocíclico, sólido, verde escuro, bastante solúvel em água ou em álcool, produzindo solução azul após dissolução. O azul de metileno é usado como corante bacteriológico e como indicador químico.

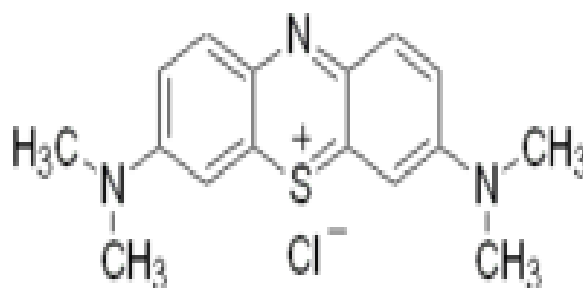


Figura 1 - Estrutura do corante azul de metileno.

2.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado para o estudo foi o *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986, Gram-Positivo, termofílico isolado de ambientes impactados por petróleo. A bactéria foi repicada para o meio líquido BHI e incubada por 24 h a 37 °C. Em seguida foi novamente repicada e preservada em meio sólido inclinado AN (Agar Nutrient – BIOLIFE ®) a 4 °C.

2.3 Tratamento Biológico

• **Inóculo** - Para o inóculo, o microrganismo foi cultivado em frascos Erlenmeyeres de capacidade 250 mL com 50 mL do meio Luria Bertani (LB) e incubado a 50 °C por 24 h sob agitação em shaker a 150 rpm. Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica da densidade óptica a 660 nm (DO = 1, 212).

• **Preparação do corante** – duas soluções estoque do corante azul de metileno foram preparadas (300 mg/L e 600 mg/L), para posteriormente ser adicionado ao meio de cultura nas concentrações finais de 10 mg/L e 20 mg/L a volumes finais de 150 mL. Esta solução foi previamente filtrada em membrana de 0,45µm para retirar as células tornando-a estéril.

• **Ensaio de degradação/produção de biossurfactante** - O experimento foi realizado em duplicata, em frascos Erlenmeyeres de 250 mL de capacidade nas concentrações de corante de 10 e 20 mg/L, além de um controle feito apenas com o meio LB (150 mL) e 1 mL de inóculo. O cultivo foi realizado por um período de 48 horas, sob agitação orbital (150 rpm) a temperatura de 50°C. Experimentalmente, foram feitas análises do líquido metabólico centrifugado referente aos horários de 12, 24, 36 e 48 h de cultivo. As amostras foram submetidas à centrifugação de 3500 rpm por 20 min, para separação das células do líquido metabólico, e posteriormente executaram-se as análises de cor, pH, proteínas totais, biomassa, atividade e índice de emulsificação.

2.4 Análises realizadas

• **Cor** - A determinação foi feita por absorbância a 668 nm do líquido metabólico livre de células (Budavari, 1989) usando espectrofotômetro UV-Visível Bioespectro®.

• **pH** – A determinação foi feita por potenciometria no líquido metabólico livre de células.

• **Proteínas totais** – A determinação foi feita via análise do líquido metabólico livre de células usando o kit de Proteínas totais (LABTEST®).

• **Biomassa** - A determinação foi feita por gravimetria após tratamento a 105° C durante 24 h.

• **Atividade de emulsificação** – A determinação foi feita por absorbância a 540 nm da fase emulsionada produzida pela mistura de 1 mL de querosene, 2 mL de líquido metabólico livre de células e 1 mL de tampão acetato de sódio (Cirigliano e Carman, 1984).

Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

3 RESULTADOS

3.1 Biodegradação/Descoloração

A Figura 2 mostra a cinética de degradação do corante azul de metileno por *G. stearothermophilus*. Particularmente observa-se que na concentração inicial de estudo de 10mg/L a maior eficiência de remoção de cor. Na concentração de 20 mg/L a descoloração foi insignificante, praticamente inibitória. Esses dados mostram o potencial biotecnológico do microrganismo. Ong et al., (2007) verificaram em seus experimentos de tratamento de azul de metileno, em condições anaeróbias que concentrações altas do corante podem causar efeitos negativos na eficiência de remoção de cor por efeitos inibitórios do corante sobre a biomassa.

A biomassa separada por centrifugação ao longo do cultivo apresentava-se parcialmente colorida, indicando que parte do corante foi concomitantemente adsorvida na parede celular do microrganismo, conforme observado anteriormente por Aksu (2004).

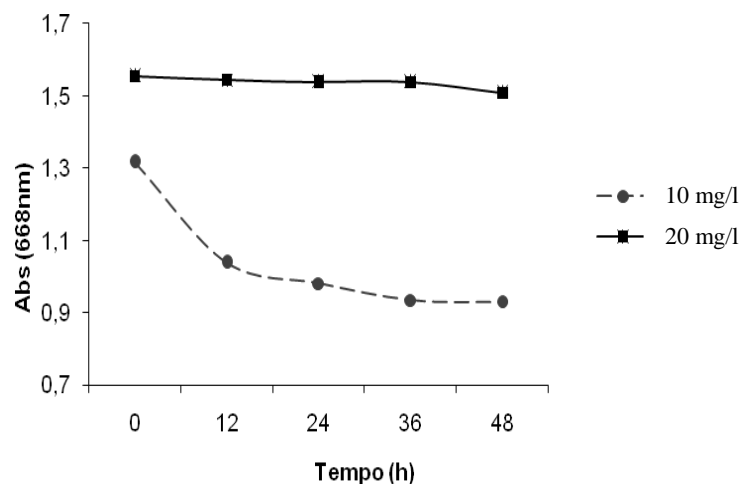


Figura 2 - Perfil de remoção de cor de azul de metileno por *G. stearothermophilus* após 48 horas de cultivo aeróbio.

A análise de pH realizada ao longo do cultivo mostrou resultados que estão acima da faixa de neutralidade (Figura 3) indicando presença de produtos do metabolismo com características alcalinas, o que é explicado também pelo fato do próprio corante apresentar propriedade básica, principalmente aminas aromáticas (Ong et al., 2007).

O cultivo com menor variação de pH (Figura 3) se refere a maior concentração inicial de corante, o que pode significar uma adaptação mais lenta do microrganismo ao composto confirmado, também, pela baixa descoloração (Figura 2).

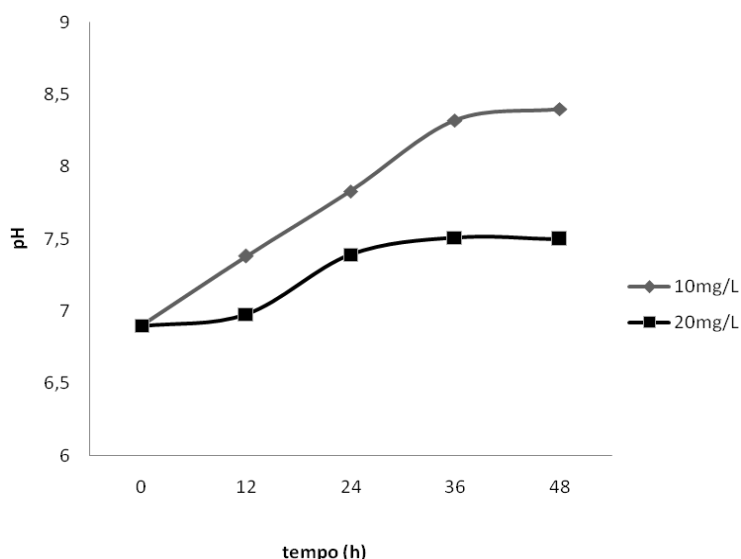


Figura 3: Variações de pH durante cultivo com *G. stearothermophilus* na presença de azul de metileno.

O perfil de proteínas totais (Figura 4) realizado do líquido metabólico centrifugado mostra o decaimento de nutrientes ao longo do cultivo, indicando sua utilização pelo microrganismo para desenvolvimento, crescimento e manutenção celular. Os resultados mostraram concentrações sempre maiores de proteínas para

o cultivo com 20 mg/L do corante, e tendência à liberação de proteínas no líquido metabólico a partir de 36 h de tratamento.

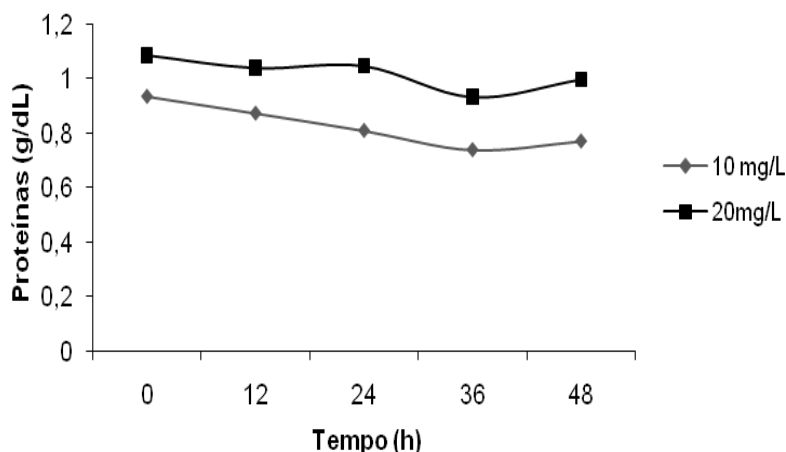


Figura 4 - Perfil de Proteínas Totais durante cultivo de *G. stearothermophilus* na presença de corante azul de metileno.

Os resultados de crescimento de biomassa ao longo do cultivo estão apresentados na Figura 5, sendo observado que a maior quantidade de biomassa cresceu para os ensaios com corante na concentração inicial de 10mg/l (menor valor testado). Quanto ao crescimento na presença do corante na concentração de 20 mg/l infere-se certa toxicidade ao corante, inibindo-se o desenvolvimento, quando comparado às condições padrões. Quando bactérias são expostas a corantes antimicrobiais, estes são primeiramente adsorvidos sobre os sítios aniônicos da membrana, substituindo os cátions divalentes, e posteriormente danificando a parede celular (Liu e Sun, 2008).

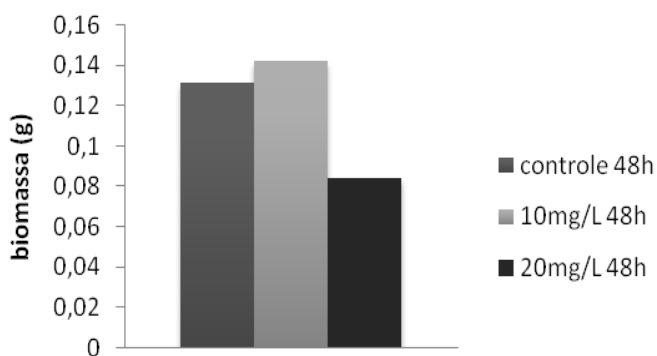


Figura 5 - Valores da biomassa produzida durante cultivo de *G. stearothermophilus* na presença de corante azul de metileno.

3.2 Produção de Biossurfactante

O biossurfactante é uma molécula anfipática produzida por microrganismos, possui, portanto, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica conferindo propriedade solubilizante. A maior vantagem dos biossurfactantes quando comparados aos surfactantes sintéticos reside na sua diversidade estrutural, baixa toxicidade e biodegradabilidade. Devido a essas propriedades podem ser usados para diversas aplicações, dentre elas, a biorremediação de poluentes (Costa et. al, 2008).

Sendo o *G. stearothermophilus* um microrganismo produtor de biossurfactante (Paz, 2005), o estudo foi complementado com as análises de atividade de emulsificação (Figura 6).

Os resultados de atividade de emulsificação (U.A. E), onde se avalia qualitativamente o biossurfactante presente no líquido metabólico, indicam valores satisfatórios para ambas as concentrações de estudo já a

partir de 24 h de cultivo. Em geral, há uma tendência à estabilização dessa variável, destacando-se os maiores valores a concentração inicial de corante de 10mg/L após 24 e 36 h de cultivo.

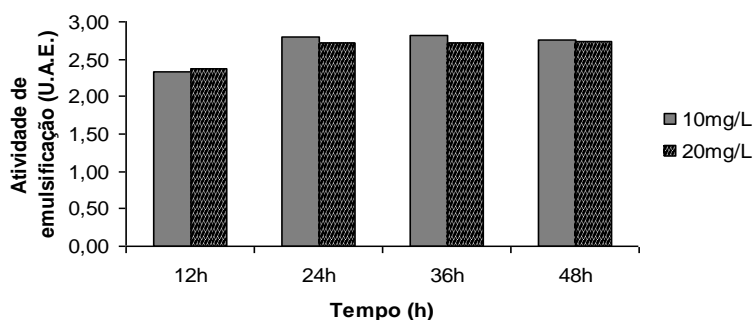


Figura 6 - Perfil de Atividade de Emulsificação para o cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* na presença de azul de metileno.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos dados expostos, pode-se observar que:

- Houve degradação do corante azul de metileno pelo *G. stearothermophilus* em condições aeróbia e termofílica, evidenciadas pelos resultados de cor, pH e proteínas, especialmente para a menor concentração inicial em estudo (10mg/L de corante).
- Ocorreu biossorção do corante devido às interações com a parede celular do microrganismo.
- Nas condições empregadas houve produção de biossurfactante, o que pode ter contribuído para os níveis de descoloração obtidos na solução de azul de metileno.

REFERÊNCIAS

- APHA. **STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER**. 19ed., 1995.
- AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry** 40, 997–1026, 2004.
- BUDAVARI, S. (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. New. Jersey, U.S.A, 11ed., 1989.
- CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology** 48, 747-750, 1984.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. **Vetor** 13, 85-103, 2003.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology** 53, 2, 224-229, 1987.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 28, 1, 34-38, 2008.
- GUARATINI, C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Quím. Nova** 23, 1, 2000.
- HUNGER, K. (Ed.). **Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications**. Germany, VCH Publishers, 2003.
- LIU, J.; SUN, G. The biocidal properties of anthraquininoid dyes. **Dyes and Pigments** 81, 231-234, 2008.

ONG, S.; TOORISAKA, E.; HIRATA, M.; HANO, T. Treatment of methylene blue-containing wastewater using microorganisms supported on granular activated carbon under packed column operation. **Environ Chem Lett.**, 5, 95–99, 2007.

PAZ, M. C. F. **Identificação e caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*: Produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (DBT) – por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, Brasil, 2005.