



Enriquecimento, isolamento e identificação de bactérias presentes em um reator UASB tratando azo-corante

Jorge Augusto Viana de Araújo¹, Silvana de Queiroz Silva²

¹Universidade Federal de Ouro Preto (gutto21jav@yahoo.com.br)

² Universidade Federal de Ouro Preto (silqueroz@yahoo.com.br)

RESUMO

As atividades humanas têm causado danos ao meio ambiente e vêm sendo realizadas numa escala de tempo muito curto. A disponibilidade de água é uma das questões mais preocupantes do presente século. O crescimento populacional e a expansão das atividades industriais contribuem de forma negativa com grandes volumes de efluente de natureza diversa. O setor têxtil é um dos mais emblemáticos da história da industrial da maioria dos países, inclusive do Brasil, sendo responsável pela geração de muitos empregos diretos e indiretos. Os efluentes líquidos, que constituem o problema principal, são provenientes basicamente das etapas de limpeza, tingimento e acabamento (LEÃO, 2002). A descoloração de efluentes por tratamentos biológicos tem motivado pesquisadores devido ao grande número de compostos capazes de serem degradados a baixo custo operacional (FRANCISCON, 2005). Este trabalho teve como objetivo enriquecer, isolar e identificar bactérias em um reator UASB tratando corante azo Drimarem azul HF-RL. Utilizou-se como meio de enriquecimento uma mistura de macro e micronutrientes. O isolamento foi realizado com inóculos obtidos do enriquecimento e foram caracterizados morfolologicamente e por biologia molecular. Os resultados mostram que o consórcio foi capaz de se desenvolver em tubos anaeróbios decolorando o corante azo. As colônias isoladas mostraram-se similares morfolologicamente e com alta similaridade com DNAr 16S de membros do grupo composto por *Azospira oryzae* e *Dechlorosoma* sp. Estes resultados demonstram que o consórcio é adequado para estudos futuros de tratamento alternativo ao efluente têxtil.

Palavra chave: Bactéria, Corante têxtil, Tratamento biológico

Área temática: Águas residuárias

1-Introdução

As atividades humanas têm causado danos ao meio ambiente e vêm sendo realizadas numa escala de tempo muito curta, tornando, muitas vezes, impossível a autorrecuperação dos ambientes afetados. O processo de industrialização, em espacial, tem levado à intensa utilização dos recursos naturais, inclusive a água (DEZOTTI, 2008).

Com todo o desenvolvimento dos setores da indústria, os níveis de elementos xenobióticos vêm se acentuando nos ecossistemas aquáticos. Neste sentido, a indústria têxtil merece grande atenção. Afinal, desde o descobrimento do Brasil que sua história tem estado diretamente relacionada à produção de corantes, a começar pelo nome do próprio país, originário da madeira “Pau-Brasil”, fonte natural de corante avermelhado (GUARATINI e ZANONI, 1991).

A área têxtil aparece em 5º lugar – como atividade poluidora – entre as indústrias mineiras. Seus efluentes líquidos, que constituem o problema principal, são provenientes basicamente de etapas de limpeza, tingimento e acabamento (LEÃO, 2002). Mais de 3 mil tipos de corantes específicos de tingimento são comercializados, sendo que, hoje, mais de 80% recorrem a corantes com cadeias moleculares do tipo AZO.

Corantes azo são caracterizados pela presença de um ou mais grupos azo ($-N=N-$) (STOLZ, 2001). A unidade que contém a ligação $-N=N-$ é chamada de grupo azo.



Os sistemas aeróbios de tratamento de efluentes são os mais utilizados na indústria têxtil, em especial sistemas de lodos ativados, enquanto que a aplicação de sistemas anaeróbios ainda estão sendo investigados.

2 – Revisão de literatura

2.1 Métodos físicos e químicos de remoção de corantes

- Processos Oxidativos - Este é o método mais comumente utilizado de descoloração por meio químico. Isso se deve a simplicidade de aplicação. O principal meio oxidante é o peróxido de hidrogênio (ROBINSON, 2001) assim como o cloro, hipocloritos, cloroaminas, dióxidos de cloro, permanganato de potássio e ozônio (POLEZI, 2003).
- UV/ peróxido - Esse método degrada moléculas de corante em CO_2 e H_2O pelo tratamento com UV na presença H_2O_2 . A degradação é causada pela produção de altas concentrações de radicais hidroxila. Radiação ultravioleta pode ser utilizada para ativar os reagentes químicos, tais como o H_2O_2 , e a taxa de remoção é influenciada pela intensidade de radiação, pelo pH, pela estrutura do corante e pela composição da tintura (ROBINSON, 2001).
- Destruição Eletroquímica - Técnica relativamente nova, desenvolvida nos anos 90. Tem algumas vantagens como método de remoção de corantes. Há pequeno ou nenhum consumo de produtos químicos e nenhuma produção de lodo. Os metabólitos gerados normalmente não são perigosos e o efluente tratado pode ser lançado ao ambiente (ROBINSON, 2001).
- Hipoclorito de sódio - Neste método o cloro ataca os grupos amina da molécula de corante. Isto inicia e acelera a quebra de ligações azo. O uso de cloro para a remoção de cor está se tornando menos frequente devido aos efeitos negativos aos corpos receptores e a formação de aminas aromáticas, que são cancerígenas (ROBINSON, 2001).
- Adsorção - As técnicas de adsorção tornaram-se mais populares recentemente devido a sua eficiência na remoção de poluentes muito estáveis para remoção por métodos convencionais. A adsorção produz um produto de alta qualidade, e é um processo economicamente viável (ROBINSON, 2001).
- Carvão ativado - É o método mais comum de remoção de cor por adsorção e é muito efetivo na remoção de corantes catiônicos mordentes e ácidos e em menor extensão de corantes dispersos, diretos e reativos. A eficiência de remoção depende do tipo de carvão utilizado e das características da água residuária (ROBINSON, 2001).



- Membrana filtrante - Este método clarifica, concentra e separa continuamente o corante do efluente. Tem características que o tornam especialmente interessante: resistência à temperatura e condições químicas e biológicas adversas. O resíduo concentrado pode apresentar problemas de disposição (ROBINSON, 2001).
- Troca iônica - A troca iônica não tem sido amplamente utilizada para o tratamento de efluentes contendo corantes, principalmente devido à impossibilidade dos trocadores de remover uma grande variedade de corantes (ROBINSON, 2001).

2.2 Métodos biológicos de remoção de corantes

Os tratamentos biológicos apresentam grande interesse por representarem uma solução de custo mais acessível. Visto que os processos biológicos tradicionais não alcançam eficiência na remoção de cor, outros organismos vêm sendo estudados, como os descritos a seguir (ROBINSON, 2001).

- Descoloração por bactérias - Culturas bacterianas mistas de uma grande variedade de habitats também podem descorar o cromóforo diazo das moléculas de corantes em 15 dias. Estes microrganismos têm a limitação de requererem um processo de fermentação, e, portanto são incapazes de tratar volumes maiores de efluentes têxteis. A habilidade de bactérias de metabolizar corantes azo tem sido investigada por um grande número de grupos de estudo (ROBINSON, 2001).
- Adsorção por biomassa microbiana ativa e inativa - A acumulação de substâncias químicas por biomassa microbiana é chamada de bioacumulação. Bactérias mortas e fungos foram usados com o propósito de remover cor de efluentes contaminados com corantes. Corantes têxteis variam grandemente em suas composições e, portanto suas interações com os microrganismos dependem da composição de um corante em particular e da composição específica de certa biomassa. Pode-se dizer que certos corantes têm especial afinidade por certas espécies de microrganismos (ROBINSON 2001).

Segundo Kunz e outros (2002), as técnicas de tratamento fundamentadas em processos de coagulação e flotação, apresentam elevada eficiência quanto à remoção de material particulado e sendo deficiente a remoção de cor e compostos orgânicos dissolvidos. Devido aos aspectos negativos, como a geração de fases sólidas e a não remoção de cor do efluente, existe uma predileção por processos que possam degradar as espécies de interesse. Neste contexto, os processos biológicos aparecem em destaque, em função da facilidade na implementação de sistemas que operam em grande escala. Os processos mais utilizados são os de lodos ativados. A remoção de cor de corantes azo por bactérias aeróbias, a citar nos sistemas de lodo ativados, é normalmente baixa. Isso se dá em decorrência da preferência do aceptor final de elétrons, oxigênio, comparada aos corantes azo. Sob condições anaeróbias,



tais corantes são usualmente os únicos aceptores finais de elétrons, fazendo com que melhores eficiências de remoção sejam alcançadas (SANTOS, 2005).

2.4 Métodos utilizados na identificação de microrganismos

A taxonomia bacteriana corresponde a uma das principais áreas dentro da microbiologia. A classificação permite observar as relações entre os microrganismos e estabelecer o arcabouço necessário ao desenvolvimento de uma taxonomia natural (evolutiva) desses organismos. É importante diferenciar também dois termos bastantes empregados nos meios acadêmicos, que são a taxonomia bacteriana e filogenia bacteriana. A taxonomia utiliza das análises fenotípicas como base para a classificação. A filogenia de procariotos apenas emergiu após análises genotípicas (MADIGAN, 2004). Os principais procedimentos dentre os métodos quimiotaxonômicos correspondem à hibridização DNA: DNA, à ribotipagem, às análises lipídicas e sequenciamento do gene DNA 16S.

- Hibridização DNA: DNA - A hibridização genômica avalia o grau de similaridade entre sequências, sendo útil na diferenciação de organismos estreitamente relacionados. Não há uma convenção definindo qual a taxa de hibridização, entre dois DNAs, necessária para posicionar dois organismos na mesma classe taxonômica. Recomenda-se um valor de hibridização de 70% ou superior para que dois isolados sejam considerados de uma mesma espécie e um valor de no mínimo de 20-30% para posicionar dois organismos no mesmo gênero. É um método sensível que revela diferenças sutis na composição genética de dois organismos; portanto é uma técnica útil na diferenciação de organismos estreitamente relacionados (MADIGAN, 2004).
- Ribotipagem - A ribotipagem consiste na extração e purificação do DNA total da bactéria, digestão deste material com uma enzima de restrição, corrida eletroforética, transferência de fragmentos desnaturados para um filtro, hibridação com a sonda marcada e revelação do padrão de bandas (DARINI *et al*, 1998).
- Análise de ácidos graxos: MEAG - Consiste na caracterização dos tipos e proporções de ácidos graxos, presentes nos lipídios de membrana externa. Essa técnica, denominada MEAG (de metil éster de ácido graxo), foi amplamente utilizada em laboratórios clínicos, de saúde pública e de análise de alimentos e água, onde a identificação de patógenos ou de outros riscos associados a bactérias deve ser realizada rotineiramente (MADIGAN, 2004).
- Sequenciamento do gene RNA 16S - Uma forma bastante utilizada hoje são as técnicas de sequenciamento do gene RNAr 16S. Os RNAs ribossomais são funcionalmente constantes, distribuídos de maneira universal e de sequência moderadamente conservada ao longo de grandes distâncias filogenéticas. Pelo fato de exibirem um grande número de possíveis sequências distintas, a ocorrência de similaridade em duas sequências sempre indica alguma relação filogenética. No entanto, é o grau de similaridade entre as sequências de RNA ribossomal de dois organismos que indica sua relação evolutiva relativa (MADIGAN *et al*, 2004).



3 - Metodologia

- Amostragem – Foram coletadas aproximadamente 10 ml de lodo do leito de um reator UASB em escala de bancada localizado no Laboratório de Tratamento de Efluentes da UFOP- Departamento de Química.
- Enriquecimento e isolamento dos microrganismos – A amostra de lodo proveniente do reator UASB aplicado ao tratamento de corante azo foi diluída 10x com adição de água destilada estéril e submetida às técnicas de microbiologia com o objetivo de enriquecer um consórcio de microrganismos envolvidos na degradação do corante azo Drimaren Azul HF-RL. Como meio de enriquecimento foi utilizada uma solução basal e de micronutrientes, conforme descrito em Santos *et al.* (2007). O meio foi preparado com água destilada previamente fervida, assim como as soluções estoque de extrato de levedura (10g/L) e o corante Drimaren Azul HF-RL (20g/L). O meio de cultura foi preparado adicionando-se 100 mL da solução de micronutrientes em 1L de meio basal. O meio foi distribuído em frasco de vidro (volume de 30 ml) na quantidade de 9 ml de meio. Os frascos foram lacrados, autoclavados e acondicionados em geladeira. Após a adição das soluções estoque, o inóculo foi adicionado na concentração de 1%. Os frascos foram incubados a temperatura de 37°C na ausência de luz, até que apresentasse descoloração do meio. Após o período de incubação, o enriquecimento que apresentou descoloração do meio foi utilizado como inóculo para a etapa de isolamento. Alíquotas de 0,1 ml foram retiradas dos tubos e esgotadas na superfície do meio de cultura descrito acima, mas com adição de 2% de ágar bacteriológico. As placas foram colocadas em um dessecador e incubado à temperatura de 37°C até o desenvolvimento de colônias. As colônias obtidas foram utilizadas em novos repiques, utilizando semeadura por esgotamento e também a confecção de lâminas para análise em microscopia óptica. Para fins de manutenção e preservação as culturas isoladas foram cultivadas em caldo nutriente sob condições anaeróbias.

3.1 Caracterização morfológica dos isolados

A caracterização morfológica foi feita utilizando-se a técnica de coloração diferencial de Gram. Amostras das culturas puras obtidas foram coletadas e ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%). Os isolados foram identificados de acordo com suas características morfológicas e resposta após a coloração de Gram. As visualizações microscópicas foram realizadas em microscópio modelo LEICA DM 5000B.

3.2 Extração de DNA, amplificação do gene RNAr 16S e sequenciamento.

As colônias isoladas foram utilizadas para extração de DNA através do método de lise térmica descrita em Moore *et al.* (2004). Quatro colônias foram transferidas para microtubos de 2mL contendo 100µL de água ultra pura. Essa suspensão foi mantida à temperatura de ebulição, em torno de 97°C, por dez minutos e, em seguida, centrifugada por 10 minutos, a 15.000g. O sobrenadante com DNA genômico foi transferido para um novo microtubo e utilizado na amplificação do gene DNAr 16S pela técnica da PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

As reações de amplificação por PCR ocorreram na presença dos primers 1 e 2 respectivamente EpsilonF (5'-GAGASTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1541R (5'-AGGAGGTGATCAGCC-3') (EMBLEY, 1991), específicos para a amplificação do gene DNAr 16S de microrganismos do domínio *Bacteria*. As condições de amplificação por reação foram: Tampão de reação (1X), MgCl₂ (2,0mM), dNTP (0,8mM), primer 1 (500nM), primer 2 (500nM), BSA (0,2mg/L), Taq polimerase (0,02 unid./µL). As reações foram incubadas em um termociclador *Biocycler* e o programa de amplificação consistiu das seguintes etapas: 3



minutos a 94°C (desnaturação inicial); 30 ciclos de 60 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 55°C (anelamento dos primers) e 1 minuto a 72°C (extensão); 7 minutos a 72°C (extensão final). O resultado das amplificações foram analisadas em gel de agarose 1% em TAE 1X corados com *SybrSafe DNA gel stain* (Invitrogen) e visualizados em um transiluminador de luz UV. Várias reações de amplificação foram feitas até que uma única banda de aproximadamente 1.500 pb era visualizada.

O produto da PCR foi encaminhado ao centro de sequenciamento da Genomic Engenharia Molecular (São Paulo). Das sequências obtidas, foram confeccionadas árvores filogenéticas, utilizando o software Mega 4.1 (TAMURA *et al*, 2007)

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram a participação de microrganismos na remoção de cor em cultivos com extrato de levedura. Visualizações microscópicas da cultura enriquecida indicaram a presença de bacilos retos e curvos, aglomerados com pequenos cocos e poucos filamentos (figura 1a).

Acredita-se que o extrato de levedura atue como fonte de mediadores redox, uma vez que apresenta em sua composição riboflavina e niacina nas concentrações 50µg/g e 300µg/g respectivamente (CORREA, 2009). Estes compostos são constituintes das moléculas carreadoras de elétrons FAD e NAD, envolvidas em reações de oxi-redução.

A técnica de isolamento foi eficiente para obtenção de colônias isoladas após 20 dias de cultivo em placas incubadas em dessecador adaptado. As colônias isoladas mostraram-se similares segundo seus aspectos, tamanhos e colorações. Não foram observados alôis de clareamento adjacentes à colônia, o que indicaria a degradação do corante.

No total, oito colônias foram removidas das placas e transferidas para uma solução de salina 0,8% e em seguida adicionadas nos frascos de cultivo contendo meio, corante e extrato de levedura, mantendo as mesmas condições descritas acima. Mesmo depois de um longo tempo de incubação não houve clareamento do meio.

A visualização microscópica dos isolados após coloração diferencial de Gram mostrou que as colônias isoladas eram constituídas de bacilos levemente curvos e Gram negativos.

Apesar da análise morfológica sugerir que trata-se de isolados muito semelhantes, foram realizadas extrações de DNA de todas as colônias a fim de se obter o sequenciamento do gene DNAr 16S visando sua identificação. A amplificação do gene foi realizada com sucesso.

A análise comparativa das sequências mostrou alta similaridade entre as colônias isoladas (100%) indicando que trata-se de bactérias pertencentes a uma mesma espécie, o que pode ser comprovada após análise filogenética. Desta forma um isolado foi escolhido e seu gene RNAr 16S foi totalmente sequenciado a fim de aumentar a resolução da análise filogenética. A Figura 1b apresenta o dendograma de similaridade entre a cultura isolada e espécies correlacionadas.

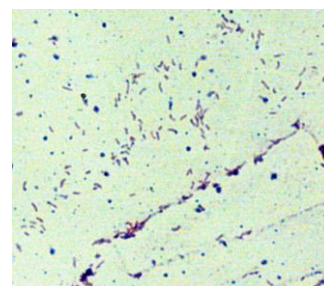
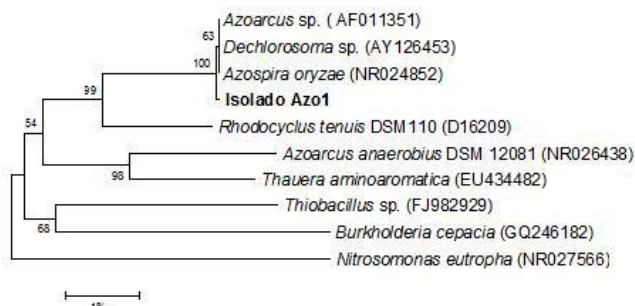


Figura 1a : - Árvore filogenética contendo sequências do gene RNA 16S (1.376 pb) construída pelo método *Neighbor-Joining* e modelo *Maximum Composite Likelihood* no programa Mega 4.1. Análise de *Bootstrap* com 1.000 réplicas. Figura 1b: bacilos retos e curvos, aglomerados com pequenos cocos e poucos filamentos



O resultado indica alta similaridade (maior que 99%) do isolado com membros de um grupo composto por *Azospira oryzae*, *Dechlorosoma sp.* e *Azoarcus sp.* e com várias bactérias não cultivadas pertencentes ao gênero *Azospira*.

Recentemente foi proposta a reclassificação de *Azoarcus* como *Azospira*, devido sua alta proximidade filogenética e fisiológica, principalmente pela capacidade de realizar fixação de nitrogênio em associação com plantas (REINHOLD-HUREK, HUREK, 2000). *Azospira oryzae* ocorre frequentemente em associações com raízes de arroz. Segundo Coates e outros (2004) o gene RNAr 16S de *Dechlorosoma sp* e *Azospira oryzae* se assemelham em 99,9%, o que indicaria que estes organismos pertenceriam a um mesmo gênero. Outras técnicas tais como hibridação DNA-DNA, SDS-PAGE das proteínas celulares também mostram alta similaridade entre os gêneros. Fenotipicamente são também muito parecidos, exceto pela incapacidade de usar o perclorato como aceptor final de elétrons pela *A. oryzae*, característico de *Dechlorosoma* (COATES, 2004).

Os gêneros *Dechlorosoma* e *Azospira* são amplamente distribuídos em diversos ambientes incluindo ambientes naturais como solos e lagos, porém uma característica importante de *Dechlorosoma* é de dominar ambientes contaminados com percloratos onde realizam o processo metabólico de redução de perclorato (COATES, 2004).

5 - Conclusões

Pode concluir-se pelo presente trabalho, que a metodologia utilizada na obtenção de um consórcio com capacidade de reduzir corante azo foi eficaz. As condições de cultivo e isolamento da cultura anaeróbia também foi eficiente, no entanto a cultura isoladamente não demonstrou capacidade de remoção de cor. A cultura anaeróbia isolada foi caracterizada como bacilos levemente curvos Gram negativos e filogeneticamente semelhante as espécies *Dechlorosoma sp* e *Azospira oryzae*.

6 - Referências bibliográficas

COATES, J. D.; ACHENBACH, L. A. Microbial perchlorate reduction: rocket fuelled metabolism. **Nature Review: Microbiology**, v.2, p. 569-580, 2004.

CORREA, C.A.R. **Efeito da adição do extrato de levedura na degradação de corante azo em reator UASB**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, 2009.

DARINI ALC; MAGALHÃES VD & CROTT LSP. Aplicações da ribotipagem na epidemiologia molecular

DEZOTTI, Márcia (Org.). **Processos e Técnicas para o Controle ambiental de Efluentes Líquidos**. Rio de Janeiro: E-papers, 2008. (Escola Piloto em Engenharia Química COPE/UFRJ).

EMBLEY, T.M. The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes *Letters in Applied Microbiology*, v 13, n. 3, p. 171-174, 1991

FRANCISCON, Elisangela. **Biodegradação de azocorantes por bactérias isoladas de efluentes industriais**. 2005. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.



GUARATINI, Cláudia C. I.; ZANONI, Maria Valnice B.. Corantes têxteis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, Feb. 1999 .

KUNZ, Airton; PERALTA-ZAMORA, Patricio; MORAES, Sandra Gomes de; DURAN, Nelson. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v.25, n.1, pp. 78-82, 2002.

LEÃO, Mônica Maria Diniz et al. **Minas Ambiente: Controle Ambiental na Indústria Têxtil: Acabamento de Malhas**. Belo Horizonte: Segrac Editora e Gráfica Limitada, 2002.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; PARKER, Jack. 2004. **Microbiologia de Brock**, 10a edição, Prentice Hall

MOORE, E.; ARNSCHEIDT, A.; KRUGER, A.; STROMPL, C.; MAU, M. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. **Molecular Microbial Ecology Manual**, 2nd. Ed. v1, p.3-18, 2004.

POLEZI, Maurício. **Aplicação de processo oxidativo avançado (H₂O₂/UV) no efluente de uma ETE para fins de reuso**. 2003. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Civil da Unoversidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T. **Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. Nov.** Int J Syst Evol Microbiol, v. 50, p. 649 – 659, Mar. 2000.

ROBINSON, Tim et al. (Org.). Remediation of dyes in textile: a critical review on current treatment technologies witha proposed alternative. **Bioresource Technology**, Uk, p. 247-255. 29 maio 2000.

FILHO, H. A. S. et al . Ensaio de toxicidade e remoção de corantes têxteis por processoa biológicos. In: II CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, João Pessoa, 2007.

SANTOS, A. B. dos. Fundamentos da biotecnologia aplicada à remoção de cor de esgotos têxteis. **Revista Tecnologia (UNIFOR)**, v. 26, n. 1, p. 80-90, 2005.

SANTOS, André Bezerra dos. Aplicação conjunta de tratamento anaeróbio termofílico por lodo granular e de mediadores redox na remoção de cor de águas residuárias têxteis. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, Set. 2005.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.69-80. 2001

TAMURA K.; DUDLEY J, Nei M.; KUMAR S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p.1596-1599, 2007.