

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Faculdade de Engenharia Química – FEQ
Área de Concentração de Sistemas de Processos Químicos e
Informática

Levantamento de linhagens do acervo de Culturas Tropicais para
tratamento biológico de efluentes de indústria têxtil

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Química, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, pela Universidade Estadual de Campinas.

Autora: Aline Maria Furquim Casellato
Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C267L Casellato , Aline Maria Furquim
Levantamento de linhagens do acervo de culturas tropicais para tratamento biológico de efluentes de industria textil / Aline Maria Furquim Casellato. -- Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi, Rodrigo de Oliveira Moraes.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Meio ambiente. 2. Industria textil. 3. Águas residuais - Purificação - Tratamento biologico. I. Tambourgi, Elias Basile. II. Moraes, Rodrigo de Oliveira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Determination of strains from the collection of tropical culture collection for biological treatment of effluents from textile industry

Palavras-chave em Inglês: Environment, Textile industry, Sewage - Purification - Biological treatment

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Iracema de Oliveira Moraes, Juliana Moura de Luna

Data da defesa: 06-05-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Aline Maria Furquim Caselatto ,em 06 de junho de 2012 , e aprovada pela banca examinadora composta pelos doutores:



Elias Basile Tambourgi



Iracema de Oliveira Moraes

Juliana Moura de Luna
Juliana Moura de Luna

Esta versão corresponde à final , defendida por Aline Maria Furquim Caselatto , em
06 de junho de 2012



Prof Dr Elias Basile Tambourgi – orientador

À minha mãe, Vanda, que sempre me incentivou e me apoiou nos estudos e em outras partes da minha vida.

Com carinho, dedico.

Agradecimentos

Meus agradecimentos são à minha família e familiares, em especial, ao meu filho Gabriel, pequenino gigante!

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi pelo aceite da orientação e pela sua paciência durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo de Oliveira Moraes pelo aceite da co-orientação e apoio técnico nas análises e na correção gramatical da dissertação.

À Prof^a. Dra. Iracema de Oliveira Moraes, por me apresentar ao Prof. Elias e pela autorização para realizar a minha tese na Fundação “André Tosello” (FAT).

À ajuda e apoio da equipe da FAT: Maria Josiane Conti, Cristiane Marião, Vilma Barbosa, André Teles e aos diretores.

À ajuda e apoio dos meninos do Departamento de Processos Químicos e Informática (DESQ/FEQ): Edgar Silveira, Petrus Marques e Diego Coelho.

Às minhas amigas que me apoiaram, incentivaram e ajudaram nessa etapa da minha vida: Milene Silvestrini, Lívia Cordi, Raquel Lorenzetti e Patrícia Lopes.

E a todos os amigos companheiros que sempre perguntavam sobre o andamento do meu mestrado!

Se algum dia lhe disseram “não, você não tem como mudar o mundo”, esqueça, não é verdade. Cada um pode usar o que tem e o que sabe para transformar o planeta num mundo melhor.

Amyra El Khalili

Resumo

O corante azo é o mais utilizado nas indústrias têxteis. Esse tipo de corante é considerado recalcitrante devido à presença de anéis aromáticos em sua molécula. Quando inserido no meio ambiente, causam danos ambientais, como a interferência na absorção e na reflexão da luz no meio aquático, e pode ser carcinogênico e mutagênico, tanto com a molécula na íntegra como após a descoloração. Trabalhos com a degradação do corante com microrganismos, especialmente bactérias, têm resultado em excelente redução do composto, e o benefício ambiental se sobrepõe aos tratamentos físico e/ou químico. Neste estudo, uma bactéria anaeróbia facultativa foi utilizada para descolorir nove corantes do tipo azo. A bactéria do acervo da Coleção de Culturas Tropical foi autenticada como *Shewanella putrefaciens* e sua referência é CCT 1967. Foi realizado um planejamento fatorial fracionário para se observar os efeitos das variáveis (temperatura, pH, microrganismos, meio de cultura, utilização de agitação) para a descoloração dos corantes. A melhor condição encontrada para a análise foi temperatura a 25 °C e pH 8,5. O resultado, nestas condições, foi à descoloração de sete corantes, sendo que em um corante houve precipitação do composto, depois de centrifugado e, em outro, não houve descoloração. A análise em condições aeróbias também foi realizada, e o resultado não foi satisfatório para nenhum dos corantes em análise.

Palavra-chave: Corante azo, descoloração, tratamento biológico, *Shewanella putrefaciens*

Abstract

The azo dye is the most widely used in the textile industries. This type of dye is considered recalcitrant due the presence of aromatic ring in the molecule. When it inserted in the environment, cause environmental damage, like the interference in the absorption and reflection of light in the aquatic environment, and can to be carcinogenic and mutagenic, molecule with both the full and after decolorization. Research with the degradation of dye used microorganisms, especially bacteria, it have result in excellent reduction of compound, and the environmental benefit overlaps the treatment and / or physical chemical. In this study, a facultative anaerobic bacterium was used to decolorize nine dyes of azo type. The bacteria in the Tropical Culture Collection was certified how *Shewanella putrefaciens* and reference it is CCT 1967. This was a fractional factorial planning in order to observe the effects of variables (temperature, pH, microorganisms, culture medium, the use of agitation) for the decolorization of dyes. The better condition analysis was determined for temperature 25 °C and pH 8,5. The result, under these condition, was the decoloration of seven dyes, and in a dye was the precipitation of compound and, in other, not decolorized. The analysis in condition aerobic was also performed, and the result was not satisfactory for any of the dyes in question.

Key words: Azo dye, decolourization, biologic treatment, *Shewanella putrefaciens*

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 - Introdução	1
1.2 - Objetivos	2
1.3 – Objetivos específicos	
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	3
2.1 - O Corante Têxtil e seus efeitos	3
2.2 - O Corante tipo azo	5
2.3 - Tratamento de Efluentes	6
2.4 - Tratamento físico, químico e físico-químico	7
2.5 - Tratamento Biológico	8
2.6 - Bactérias	12
2.6.1 - <i>Shewanella</i>	12
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	16
3.1 - Materiais	16
3.1.1 - Reagentes	16
3.1.2 - Equipamentos	17
3.2 - Métodos	17
3.2.1 - Preparação dos reagentes	17
3.2.2 - Seleção do Microrganismo	19
3.2.3 - Determinação da curva padrão dos corantes	21
3.2.4 - Planejamento Fatorial Fracionário para melhoria do processo de descoloração	21
3.2.5 - Influência da degradação do meio de cultura na análise espectrofotométrica	23
3.2.6 - Condições para a descoloração do corante	23
Capítulo 4 – Resultados e Discussões	25
4.1 - Linhagens com potencial de degradação	25
4.2 - Construção das curvas padrão para cada corante	26

4.3 - Planejamento Fatorial Fracionário	31
4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 1	31
4.2.2 Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 2	34
4.2.3 Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 3	37
4.4 - Influência da degradação do meio de cultura na análise espectrofotométrica	43
4.5- Bidescoloração dos corantes azo	43
Capítulo 5 – Conclusões e Sugestões	50
5.1 - Conclusões finais	50
5.2 - Sugestões para trabalhos futuros	50
Capítulo 6–Referências Bibliográficas	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Descarte de efluente têxtil sem tratamento no corpo d'água	4
Figura 2.2. Exemplo de uma estrutura química de molécula de corante azo	5
Figura 4.1. Gráfico da curva padrão do corante B31	27
Figura 4.2. Gráfico da curva padrão do corante B36	27
Figura 4.3. Gráfico da curva padrão do corante B86	28
Figura 4.4. Gráfico da curva padrão do corante MO	28
Figura 4.5. Gráfico da curva padrão do corante R34	29
Figura 4.6. Gráfico da curva padrão do corante R91	29
Figura 4.7. Gráfico da curva padrão do corante Y15	30
Figura 4.8. Gráfico da curva padrão do corante Y79	30
Figura 4.9. Gráfico da curva padrão do corante Y87	30
Figura 4.10. Representação gráfica do efeito do meio de cultura no experimento 3	41
Figura 4.11. Representação gráfica do efeito da temperatura no experimento 3	41
Figura 4.12. Representação gráfica do efeito do pH no experimento 3	42
Figura 4.13. Gráfico de Pareto representando os efeitos do experimento 3	42
Figura 4.14. Descoloração dos corantes Y87, B36, R91 e R34 nos tempos 0, 24 e 48 horas	44
Figura 4.15. Descoloração dos corantes MO, Y15, Y79 e B31 nos tempos 0, 24 e 48 horas	45
Figura 4.17. Precipitação do corante B86 pós centrifugação	45
Figura 4.18. Corante B31 no tempo 0 h	46
Figura 4.19. Corante B31 no tempo 48 h (1) sem agitação e (2) com agitação	46

Figura 4.20. Corante R34 no tempo 0 h	46
Figura 4.16. Corante R34 no tempo 48 h (1) sem agitação e (2) com agitação	46
Figura 4.17. Comparação da descoloração dos corantes B31 e R34 em diferentes condições	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Seleção de microrganismo para degradação de corante	20
Tabela 4.1. Bactérias com as referências	25
Tabela 4.2. Resultado da seleção de microrganismo para degradação dos corantes azo	26
Tabela 4.3. Níveis dos fatores estudados para o Experimento 1	31
Tabela 4.4. Planejamento Fatorial codificado e com valores reais para o Experimento 1	32
Tabela 4.5. Resultados do Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 1	32
Tabela 4.6. Níveis dos fatores estudados para o Experimento 2	34
Tabela 4.7. Planejamento Fatorial codificado e com valores reais para o Experimento 2	35
Tabela 4.8. Resultados do Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 2	35
Tabela 4.9. Níveis dos fatores estudados para o Experimento 3	37
Tabela 4.10. Planejamento Fatorial codificado e com valores reais para o Experimento 3	37
Tabela 4.11. Resultados do Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 3	38
Tabela 4.12. Valores da medida do meio de cultura caldo nutriente em diferentes comprimentos de onda	43

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

A água que o ser humano consome está cada vez mais escassa, pelo fato de haver a contaminação nos corpos d'água (OLIVEIRA et al., 2007).

No Brasil a captação da água para tratamento vem, em grande parte, de rios poluídos com o esgoto, a água chega ao consumidor limpa, porém com micropoluentes que o sistema de tratamento não limpa (BRAGA, 2012).

A indústria têxtil utiliza muitos litros de água no processo de coloração, tornando-se responsável pela grande quantidade de descarte de efluente contaminado com corante (KUNZ et al., 2002).

Há entrada do corante no ambiente natural durante a síntese, o processamento ou na aplicação dos corantes. Quinze por cento do corante produzido mundialmente é introduzido no ambiente aquático sem tratamento (GUARATINI; ZANONI, 2000). O efeito negativo que o corante traz ao meio ambiente é a interferência da absorção de luz no corpo d'água e a bioacumulação do composto nos organismos que nele habita.

Existem vários tipos de corantes para ser utilizado na indústria têxtil, e um dos mais utilizados, é o corante tipo azo. Esse corante são xenobiótico e recalcitrante. Sua molécula é estruturada com anéis aromáticos e com uma ou mais dupla ligação entre nitrogênios.

Podem-se aplicar vários tipos de tratamento no efluente com o corante azo para sua descoloração. No tratamento físico-químico há uma falta de implementação na indústria devido ao alto custo, à baixa eficiência e à inaplicabilidade para vários tipos de corante (BANAT, et al., 1996).

Muitos estudos reportam a eficiência da biocatálise dos microrganismos para a remoção da cor contida no efluente industrial (BRIGÉ et al., 2008). O tratamento biológico, utilizando o microrganismos, é o mais promissor pelo fato de ser ecológico, requerer menos água no tratamento, produzir menos lodo e resultar em produtos

finais não tóxicos. Os microrganismos mais estudados para essa finalidade são espécies específicas de bactérias e fungos filamentosos, esses microrganismos específicos contêm enzimas que clivam a dupla ligação entre os nitrogênios e os anéis aromáticos.

A bactéria *Shewanella* sp é bem aplicada nas pesquisas de descoloração e degradação do corante em sistemas de tratamento de efluente têxtil e também já é aplicada em estações de tratamento.

O objetivo do trabalho é selecionar um microrganismo da Coleção de Culturas Tropical – “Fundação André Tosello” para degradar nove tipos de corante azo para aplicação no tratamento biológico de efluentes de indústria têxtil.

1.2 Objetivos

Fazer a seleção de linhagens ambientais do acervo da Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello, que tenham potencial de degradação de corantes azo.

1.2.1 Objetivos específicos

- Selecionar o melhor microrganismo que degrada o corante;
- Determinar a curva padrão dos corantes;
- Determinar as melhores condições de descoloração;
- Utilizar o planejamento fracionário para selecionar a melhor condição de descoloração.
- Determinar a influência da degradação do meio de cultura na análise específica;
- Fazer teste de descoloração com e sem agitação.

Capítulo 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Corante Têxtil e seus efeitos

O primeiro corante foi descoberto no ano de 1856, na Inglaterra. Hoje, já existem no mercado em torno de 2.000 tipos de corantes sintéticos diferentes produzidos e distribuídos pelos Estados Unidos (GUARATINI; ZANONI, 2000). A produção de corantes no Brasil é de 26.500 toneladas (ULSON de SOUZA et al., 2007). As indústrias brasileiras produtoras de corante se localizam, em sua maior parte, no eixo Rio-São Paulo (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os corantes são produzidos a partir de um ou mais compostos obtidos da destilação do alcatrão de carvão. No composto final da destilação, o átomo de hidrogênio é substituído por outro composto, chamado de intermediário. O intermediário é um hidrocarboneto no qual um ou mais átomos de hidrogênio são substituídos por grupos como nitro (NO_2), amino (NH_2), hidroxil (OH), ácido sulfônico (OSO_3H) e outros (RAI et al., 2005).

Para o composto agir como corante deve haver dois grupos: o dos cromóforos, que é a parte responsável por produzir a cor; e a dos auxocromos, que é a parte que forma pontes químicas estáveis (RAI et al., 2005).

Sendo o corante uma substância solúvel no meio onde é aplicado (RAI et al., 2005), ele entra no ambiente natural carregado pela água que é usada nos processos de coloração e de lavagem. Essa água com o corante torna-se o efluente no final do processo e são gerados em média 100.000 a 150.000 litros por tonelada de tecido tratado (BEZERRA dos SANTOS, 2005; LI; GUTHRIE, 2010).

Com uma concentração de 1 mg.L^{-1} de corante já se pode detectar sua presença nos cursos d'água (GUARATINI; ZANONI, 2000).

O efluente contaminado com o corante é originado tanto nas indústrias de fabricação como nas indústrias que utilizam o corante. Alguns processos de tingimento das fibras têxteis são ineficientes, em algumas indústrias, e o corante não utilizado é descartado no efluente, produzindo assim resíduos com coloração. Mas o

principal fator de perda de corante para o efluente é a incompleta ligação entre a fibra e o corante (PEARCE et al., 2003). É estimado que 5 a 10% do corante é perdido no efluente no processo de tingimento (RAI et al., 2005).

Estima-se também que 280.000 toneladas de corantes têxteis sejam descartados em efluentes no mundo (JIN et al., 2007) e a concentração de corantes nos efluentes das indústrias têxteis é entre 10 e 200 mg.L⁻¹ (PANDEY et al., 2007). A Figura 1 mostra um efluente de indústria têxtil sendo lançado, sem tratamento, em um curso d'água.



Figura 2.1: Descarte de efluente têxtil sem tratamento no corpo d'água (Fonte: Ozonizando).

A presença de corante no ambiente aquático interfere na absorção de luz, pela vida vegetal e animal no ambiente aquático, no potencial de acumulação e também no transporte do contaminante nos mananciais e nas águas distribuídas à população (GUARATINI; ZANONI, 2000). Afeta o meio aquático causando problemas estéticos na água e dificultando a transferência do oxigênio para o corpo d'água (PANDEY et al., 2007). Há o problema ainda do potencial de bioacumulação do corante na cadeia alimentar (RAI et al., 2005).

Quanto às plantas, as taxas de germinação e seu crescimento são atingidos de modo negativo pelo efeito da toxicidade dos corantes têxteis (WANG, 1991).

Outra questão importante é a toxicidade, mutagenicidade e a carcinogenicidade que podem acontecer com corantes integrais, precursores, ou mesmo com a biotransformação de corantes, que tem como um dos diversos subprodutos, aminas aromáticas (RAI et al., 2005).

2.2 O Corante tipo azo

A classe de corante sintético comercial mais aplicado é o azo, com um ou mais grupamentos -N=N- (PANDEY et al., 2007). Os compostos com estrutura azo são xenobióticos na natureza e são amplamente usados nas indústrias, têxtil, alimentícia, de cosméticos e gráficas (PANDEY et al., 2007).

O corante azo é extensivamente estudado pelo fato da sua produção ser a maior dentre os tipos de corantes e também por conter o cromóforo (ponte de nitrogênio) que mais reage como corante têxtil (RAI et al., 2005). Exemplo de uma molécula com grupamento azo (diazó) é mostrado na Figura 2.

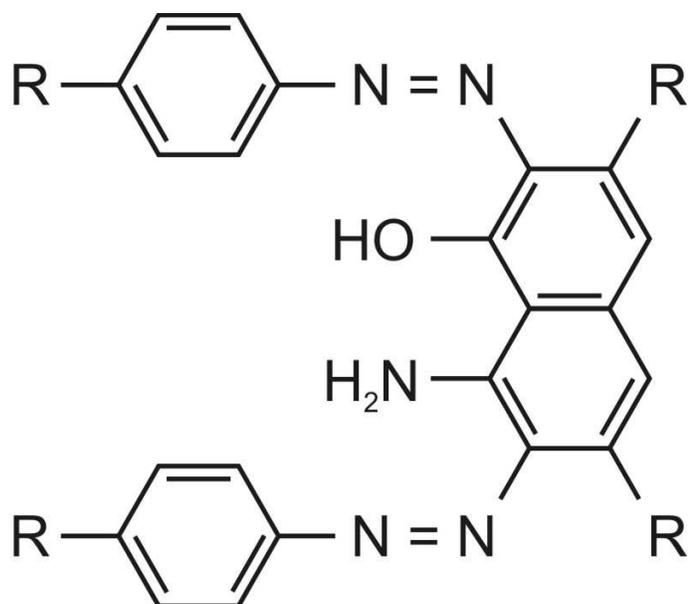


Figura 2.2: Exemplo de uma estrutura química de molécula de corante azo.

O corante azo é um composto solúvel em água. Por isso, para o processo de tingimento, é necessário o acréscimo de agentes de acoplamento e sal diazônico, para tornar-se insolúvel (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Segundo Pearce et al. (2003), os corantes azo podem ser utilizados com vários métodos diferentes de aplicação. O tingimento em tecidos é rápido e promove uma tonalidade brilhante.

Os corantes de grupamento azo podem causar efeitos perigosos em diferentes organismos, incluindo o ser humano (OLIVEIRA et al., 2007).

Os corantes com função azo-aromáticos são grupos de corantes orgânicos produzidos mundialmente. Sua biotransformação resulta em subprodutos como aminas, benzidinas e outros intermediários com potencial carcinogênico (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Estudos relatam que os corantes do grupo azo contribuem com as atividades mutagênicas quando lançados em corpos d'água, sendo também carcinogênicos (PANDEY et al., 2007). Na pesquisa de Sanchez et al. (1988), foram retiradas amostras coletadas próximo às indústrias têxteis do ABC, estado de São Paulo, que continham contaminação a nível mutagênico.

Os estudos de Umbuzeiro et al. (2005) obtiveram resultados de atividade mutagênica nas amostras coletadas, que podem ser devido à presença de corantes azo e/ou subprodutos do corante azo, no rio Cristais, próximo a uma indústria têxtil, no estado de São Paulo.

2.3 Tratamento de Efluentes

A remoção de corantes no tratamento de efluente é um dos principais problemas enfrentados nos últimos anos (VAN der ZEE et al., 2001).

O aumento de legislações ambientais para indústria têxtil na Inglaterra e em outros países promoveu a busca por tratamentos efetivos para a remediação do composto (BANAT et al., 1996).

Há maneiras de se detectar o grau de contaminação em um curso d'água, como por exemplo a comparação espectrofotométrica de uma amostra padrão de corante com o efluente coletado (COOPER, 1993; GUARATINI; ZANONI, 2000).

Os descartes de efluentes da indústria têxtil são em sua grande parte líquidos com temperatura por volta de 40 °C (LI; GUTHRIE, 2010). Quanto ao pH, normalmente o efluente é fortemente alcalino (LI; GUTHRIE, 2010).

Muitos processos são estudados para o tratamento do efluente de indústria têxtil, sendo eles: físico, químico, físico-químico e biológico (LI et al., 2010). As principais técnicas aplicadas para o tratamento do efluente de indústria têxtil são o processo de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fitoquímica, e a biodegradação (COOPER, 1993; GUARATINI; ZANONI, 2000).

2.4 Tratamento físico, químico e físico-químico

O tratamento físico e químico do efluente normalmente tem um alto custo e resulta em formação de lodo secundário (CHANG; LIN, 2000; PEARCE et al., 2008).

Segundo Rai et al. (2005) o tratamento biológico não é suficiente e necessita de outros processos, sendo eles os tratamentos físico, químico e/ou físico-químico. A operação física normalmente é o tratamento primário do efluente, compreendendo filtração e separação, diluição e irradiação gamma.

O tratamento de efluente com corante utiliza os seguintes processos físico-químico: adsorção, floculação, extração de par de íon, osmose reversa, troca de íon, coagulação e clarificação. Já o tratamento químico engloba oxidação, redução e cloração (RAI et al., 2005).

Os principais tratamentos físicos e/ou químicos citados por Pearce et al. (2003) têm suas vantagens e desvantagens:

- A coagulação e a floculação são economicamente viáveis, porém a descoloração é baixa e no final do tratamento produz grande quantidade de lodo, o qual requer uma disposição final em lugar apropriado;

- Na técnica de adsorção é preciso, no final do processo, realizar mais um tratamento do resíduo secundário. Essa técnica é considerada eficiente, pois remove um amplo grupo de corantes;

- A oxidação é um processo rápido, mas gasta grande energia e há formação de subprodutos. Os métodos de oxidação mais utilizados são de ozônio, peróxido de hidrogênio e permanganato;

- A reação de Fenton tem baixo custo e boa eficiência de descoloração, mas há uma grande geração de lodo (SARATALE et al., 2011).;

- Membranas removem todos os tipos de corantes e causa produção de lodo concentrado. Tem também um alto investimento.

Um método que não resulta em resíduos sólidos e é considerado eficiente é o processo de oxidação avançada (AOP – em inglês), ele consiste no uso de reagentes oxidantes ou fotocatalíticos heterogêneos. Com esses agentes há a formação do radical hidroxila (OH), que elimina o poluente com grande eficiência, porém este tipo de tratamento tem custo alto e grande consumo de energia (PANDEY et al., 2007).

Para não utilizar o carvão ativado, considerado de alto custo, alguns pesquisadores utilizam materiais mais baratos como turfa, argila, cinzas, resinas poliméricas (SARATALE et al., 2011).

2.5 Tratamento Biológico

Apesar de haver uma grande variedade de tratamentos químicos e físicos, a biorremediação de efluentes de indústria têxtil tem sido uma solução atraente (BANAT et al., 1996).

O tratamento biológico oferece vantagens sobre o tratamento físico, químico e físico-químico no efluente contaminado com corante, possibilitando a mineralização e a formação de compostos finais inofensivos na degradação do corante, além de apresentar menor quantidade de lodo (RAI et al., 2005). O método da biodegradação é considerado ambientalmente favorável, sendo que em grande parte da degradação

há a mineralização completa do poluente orgânico a baixo custo (PANDEY et al., 2007).

O tratamento biológico para descoloração e degradação é considerado econômico por ser um método eficiente (BANAT et al., 1996).

Pode-se utilizar no método biológico as células ou mesmo as enzimas, entretanto o processo de biodegradação de efluentes pode ser um tratamento brusco (com mudanças de pH, temperatura, etc), e a enzima não tem a proteção que uma célula íntegra oferece (PEARCE et al., 2008).

A utilização de uma mistura de diferentes bactérias para a degradação do corante mostra-se ser mais eficiente do que utilizando apenas uma linhagem. Contudo, o tratamento com um tipo de célula tem a vantagem de se conhecer o desempenho da linhagem e o caminho das reações, conduzindo a um resultado de produtos finais não tóxicos (ERKURT, 2010).

Mesmo os microrganismos sendo versáteis, há o desenvolvido na célula de sistemas enzimáticos para descoloração e mineralização dos corantes azo sob certas condições ambientais (PANDEY et al., 2007).

Os corantes azo são considerados recalcitrantes à biodegradação. Em tratamento de efluentes convencional, não é eficiente a sua degradação, porém há muitos estudos nessa área que utilizam fungos, bactérias e algas isolados que apresentam resultados satisfatórios (STOLZ, 2001). A redução do corante azo por culturas puras ou mesmo em um conjunto de bactérias tem sido eficiente (LI e GUTHRIE, 2010).

Na revisão de Pearce et al. (2003), é descrita a biodegradação em condições anaeróbias como eficiente na primeira parte do tratamento para a quebra da ponte azo eletrofílica, resultando em aminas aromáticas, sendo estas, um subproduto, que é considerado bom substrato para ser utilizado na biodegradação aeróbia.

Pandey et al. (2007) relatam que a biodescoloração do corante azo em condições anaeróbias é um processo casual, onde o corante pode agir como um aceptor de elétrons, sendo que a proporção de descoloração é dependente da adição de fonte de carbono e da estrutura do corante.

As primeiras bactérias anaeróbias que apresentaram a enzima azoredutase nos estudos de descoloração de corantes azo sulfonados foram, em sua maioria, do gênero *Clostridium* e *Eubacterium* (PANDEY *et al.*, 2007).

A ação inicial na biodegradação em uma reação catalisada pela enzima azoredutase vai reduzir o corante em aminas (SARAYU; SANDHYA, 2009).

Rai *et al.* (2005) relatam que é recomendado o tratamento aeróbio após o anaeróbio, pois há subprodutos neste último que são melhor degradados com microrganismos aeróbios. Este processo pode ser realizado com uma separação espacial de um efluente utilizando um sistema de reator sequencial anaeróbio - aeróbio, ou mesmo utilizando um reator anaeróbio-aeróbio integrado.

Estudos com fungos para a degradação de corante apresentaram resultados satisfatórios. Os fungos mais estudados para descoloração de corantes sintéticos são os chamados fungos da podridão branca (*white-rot*) (BANAT *et al.*, 1996).

O fungo *Phanerochaete chrysosporium*, é capaz de descolorir os corantes utilizando a enzima lignina peroxidase, mas para isso ocorrer é necessário que haja níveis específicos de carbono e nitrogênio exigidos pelo fungo no efluente (RAI *et al.*, 2005). Com o fungo *Trametes versicolor*, a enzima utilizada é a lacase (oxidativa), e este fungo também necessita de carbono e nitrogênio para a produção da enzima (Wong; Yu, 1999).

Alguns microrganismos eucariotos foram usados em pesquisas de degradação de corante azo. Jadhav *et al.* (2007), utilizando uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463) encontraram resultado de biodegradação de corante azo (vermelho de metila) no tempo de 16 minutos. A degradação seguiu condições anóxicas. O resultado desse trabalho foi a completa degradação do corante.

Devido à molécula do corante azo ser apolar e/ou grande, não é possível que tenha uma degradação intracelular, e existe a hipótese de que a degradação comece fora da célula (ERKURT, 2010). Pesquisa de Brigé *et al.* (2008) demonstra que a descoloração é um processo de redução extracelular, requerendo um caminho de transferência de elétron com muitos componentes, sendo eles a membrana citoplasmática, periplasmática e outros elementos da membrana.

A redução do corante ainda não é bem conhecida, o termo “redução de corantes azo” pode envolver diferentes mecanismos enzimáticos ou não ou locações, intracelular ou extracelular (RAI et al., 2005).

Os fatores que devem ser considerados no processo de biodegradação, para apresentar uma boa eficiência no tratamento, são nível de aeração, temperatura, pH, e potencial redox do sistema. Essas condições podem ser otimizadas para obter um resultado de máxima taxa de redução (PEARCE et al., 2003).

Pode-se balancear a concentração do doador de elétrons e do mediador redox com a quantidade de biomassa e de corante existente no tanque de tratamento (PEARCE et al., 2003).

Em condições anóxicas, a cultura de microrganismo, independentemente de ser mista ou pura, necessita de nutrientes orgânicos para a realização da descoloração de corantes azo (CHEN et al., 2003).

Sob condições aeróbias, existem poucas bactérias que são capazes de utilizar o corante como única fonte de carbono (PANDEY, et al., 2007).

Nas três condições, anaeróbia, anóxica e aeróbia, há sempre uma necessidade de complementar o processo de degradação do efluente com fontes orgânicas de nutrientes para haver um melhor metabolismo celular. Nas três condições, acontece no início da degradação a redução da ponte do $-N=N-$, isso pode ser através de enzimas, mediadores redox com baixo peso molecular, redução química, ou uma combinação desses sistemas (PANDEY et al., 2007).

Alguns microrganismos contêm um sistema enzimático que quebra a estrutura benzênica sobre condições aeróbias e anaeróbias (PANDEY et al., 2007).

Devido a diferentes estruturas da molécula de corantes do grupo azo a biodegradação do composto nunca é na mesma intensidade (Pearce et al., 2008).

Levantamentos de pesquisas de Rai et al. (2005) descrevem que, ao longo do processo biológico há melhores resultados quando aplicado um pré-tratamento ou pós-tratamento, como por exemplo, a utilização de um processo de oxidação avançada no pré-tratamento do efluente.

Em resumo, o método biológico tem cinco principais vantagens: respeita o meio ambiente; tem custo baixo; pouca produção de lodo; produtos finais não tóxicos ou mesmo sua completa mineralização; e, requer menos água no tratamento comparando-se com os processos físico-químicos (SARATALE et al., 2011).

Implantando-se um método de tratamento na própria indústria, a qualidade do efluente seria muito melhor para a redução da contaminação no ambiente aquático natural (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Existem órgãos que promovem melhoras para o problema da contaminação de corantes em corpos d'água como a *Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers* (ETAD) que é uma organização internacional que procura minimizar os efeitos negativos dos corantes na saúde e no ambiente. Isso é feito com o cumprimento das regras do código de ética da ETAD. Há ainda poucos membros nesse órgão, sendo que não há empresa brasileira nele associada (ETAD).

No Brasil, particularmente no estado de São Paulo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o órgão que atua na fiscalização de fontes poluidoras.

2.6 Bactérias

2.6.1 *Shewanella* sp

A linhagem de *Shewanella* é caracterizada como pleomórfica, apresentando bastonetes retos ou levemente curvados, contém flagelos polares, tem células são Gram negativas e a colônia tem a coloração frequentemente rosa para o laranja devido à acumulação de proteína citocromo na célula. São bactérias anaeróbias facultativas. Quando a respiração é aeróbia utilizam o oxigênio como aceptor de elétrons, e quando em condições anóxica ou anaeróbia utilizam vários aceptores de elétrons inorgânicos e orgânicos, sendo os principais nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-),

ferro (Fe^{3+}), manganês (Mn^{4+}) e vários compostos sulfurados (BRENNER *et al.*, 2005).

A bactéria é mesófila, sendo sua temperatura ótima de 35 °C (LI; GUTHRIE, 2010).

A linhagem, quando isolada pela primeira vez, foi classificada como sendo de um gênero *Achromobacter*, pelos autores Derby e Hammer, em 1931. Porém, no ano de 1941 os autores Long e Hammer consideraram a linhagem como um gênero *Pseudomonas*, pelo fato da sua morfologia ser um bastonete Gram negativo, com flagelos (móvel) e com metabolismo não fermentativo. Já no ano de 1981, Lee reclassificou a cepa como *Shewanella putrefaciens* baseado na sequência genética rRNA 5S (BRENNER *et al.*, 2005). De acordo com o catálogo on-line da Coleção de Culturas da Alemanha, os sinônimos da linhagem *S. putrefaciens* são *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas rubescens* e *Alteromonas putrefaciens*.

Shewanella é um grupo ubíquo. Particularmente, *S. putrefaciens* é encontrada em alimentos refrigerados estragados, e é frequentemente isolada de laticínios, aves domésticas, carnes e alimentos marinhos. Lugares ambientais onde a linhagem é isolada são óleos lubrificantes e de escavação, óleos na água do mar, sedimentos, solos, lagoas, rios, efluentes e águas subterrâneas (BRENNER *et al.*, 2005).

Pesquisas relatam que a espécie *Shewanella putrefaciens* é capaz de reduzir e mobilizar poluentes tóxicos e metálicos radioativos, incluindo o cobalto, cromo, selênio, telúrio e urânio. Há também pesquisas que mostram redução de dehalogenados e a transformação de poluentes orgânicos (BRENNER *et al.*, 2005).

Alguns fatores influenciam na degradação do corante pelo microrganismo, sendo eles: a concentração de oxigênio, a temperatura, o pH, a concentração do corante, a forma estrutural e a hidrólise do corante, as funções de doador e transporte de elétrons da célula bacteriana e a presença de aceptores alternativos de elétrons (LI; GUTHRIE, 2010).

A degradação do corante pela bactéria é explicada pelo mecanismo extracelular ao transporte de elétrons que é um mecanismo análogo ao de redução de metais pela *Shewanella* (DiCHRISTINA *et al.*, 2005).

O aumento da concentração do corante pode afetar as células com a toxicidade causada pelo próprio corante (LI; GUTHRIE, 2010). Estudos de Chen et al (2010) apresentaram resultados de degradação de corantes de trifenilmetano em uma taxa de 24,4 a 1345 mg.L⁻¹ usando a bactéria *Shewanella decolorationis* NTOU1.

Estudos de Li e Guthrie (2010) observaram que o gênero de bactéria *Shewanella* degrada o corante em uma ampla faixa de temperatura, sendo encontradas duas temperaturas ótimas para o corante estudado, 40 °C e 50 °C. Entretanto foi utilizada, em seus estudos, a temperatura de 30 °C para minimizar o risco de desnaturação de proteína. Quanto ao pH a faixa ótima de pH é entre 8 a 9. No pH 4,4 não há relatos de resultados satisfatórios, sendo que os resultados começaram a ser significativos a partir do pH 5,2. As condições de temperatura de 30 a 40 °C e pH de 8 a 9 foram satisfatórias no trabalho de Chen et al. (2008).

O estudo de Pearce et al. (2008) relata o uso do corante como um acceptor de elétrons em condições anaeróbias pelo microrganismo *Shewanella* sp. A degradação aconteceu por meios da redução da ligação azo/quetohidrazona do corante estudado.

Resultados de Pearce et al. (2008) demonstram que a *Shewanella* sp utilizada na pesquisa pode reduzir a coloração de moléculas de pigmentos com pontes de nitrogênio-nitrogênio (encontradas em Quetohidrazona), assim podendo reduzir moléculas com pontes azo.

A espécie de *Shewanella decolorations* NTOU1 degradou o corante cristal violeta (trifenilmetano) em 100%, sob condição de anaerobiose. Foi observado também que o cristal violeta foi convertido para CO₂ e NH₃ (CHEN et al., 2008).

Em uma comparação do tratamento químico com o biológico em uma pesquisa laboratorial, os resultados biológicos, utilizando a bactéria *Shewanella* foram mais eficientes do que os químicos (tratamento com ditionito de sódio) (PEARCE et al., 2008).

Na Inglaterra há padrões de lançamento de corantes, e a monitorização é realizada através de leituras de comprimento de onda das águas do rio. Um

programa governamental naquele país, chamado BIO-WISE, tem como propósito promover a aplicação comercial biotecnológica. A empresa tem um processo chamado BIOCOL (realizado na Irlanda do Norte), que utiliza a bactéria *Shewanella putrefaciens* no tratamento de efluente de indústria têxtil. O processo se baseia na imobilização da bactéria em um material suporte de carbono ativado, onde o corante é adsorvido pelo carbono e reduzido pelo microrganismo (PEARCE et al., 2003).

Capítulo 3 – MATERIAIS e MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

- Meios de Cultura

a) Meio Mínimo Mineral: cloreto de sódio (NaCl) $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$; cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$; e sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Silveira *et al.*, 2009).

b) Caldo nutriente (Difco): a concentração dos componentes do meio formulado é extrato de carne $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ e peptona $2,5 \text{ g.L}^{-1}$. O extrato de carne proporciona ao microrganismo peptídios, aminoácidos, frações nucleotídicas, ácidos orgânicos, minerais e algumas vitaminas, enquanto que peptona é fonte de nitrogênio orgânico. As concentrações utilizadas de Caldo nutriente foram $8,0 \text{ g.L}^{-1}$ (CN) e $4,0 \text{ g.L}^{-1}$ (1/2 CN). Todos esses componentes no caldo nutriente são em mínimas quantidades, suficientes para o crescimento bacteriano.

c) Meio de Cultura Peptona: $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ com Cloreto de sódio (NaCl) $5,0 \text{ g.L}^{-1}$. O meio de cultura peptona é fonte de nitrogênio orgânico.

- Corantes

Os corantes utilizados foram obtidos junto à empresa Clariant do Brasil (São Paulo, Brasil). Os corantes foram identificados da seguinte forma: B31 (C.I. 20460); B36 (C.I. 11825); B86 (C.I. 26400); Methyl orange (C.I. 13025); R34 (C.I. 14714); R91 (C.I. 18800); Y15 (C.I. 13950); Y79 (C.I. 13065) e Y87 (C.I. 22910).

- Soluções

a) Hidróxido de sódio (NaOH) concentração 0,1 N

3.1.2 Equipamentos

- Agitador, 4430, Innova
- Balança analítica, Sauter
- Balança semi-analítica, voyager, Ohaus
- Câmara de Fluxo Laminar, VLFS 12, Veco
- Centrífuga, 206 R, Fanem
- Espectrofotômetro, UV mini 1240, Shimadzu
- Estufa BOD, Nova técnica
- Micropipetas automáticas, Gilson.
- pHmetro, delta 320, Mettler

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação dos reagentes

Meio Mínimo Mineral:

Dissolveram-se os reagentes cloreto de sódio (NaCl) 7,0 mg; cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4,0; e sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 2,0 mg em 1000 mL de água destilada. O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 min em um erlenmeyer de 250 mL com o volume do meio de 50 mL em cada erlenmeyer.

Meio de Cultura Caldo nutriente (Difco):

Dissolveram-se 8,0 g do meio de cultura caldo nutriente em 1000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min em um erlenmeyer de 250 mL com o volume do meio de 50 mL em cada erlenmeyer.

Dissolveram-se 4,0 g do meio de cultura caldo nutriente em 1000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min em um erlenmeyer de 250 mL com o volume do meio de 50 mL em cada erlenmeyer.

Meio de Cultura Peptona:

Dissolveram-se 5,0 g do meio de cultura peptona e 5,0 g do cloreto de sódio em 1000 mL de água destilada. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 min em um erlenmeyer de 250 mL com o volume do meio de 50 mL em cada erlenmeyer.

Corante

Dissolveram-se 100 mg do corante em 1000 mL de água destilada. A solução foi filtrada com sistema de filtração a vácuo estéril utilizando uma membrana filtrante de 0,22 µm, sendo armazenada em frasco tipo Schott estéril. A concentração final da solução estoque 100 mg.L⁻¹.

Solução de hidróxido de sódio

Dissolveram-se 0,4 g de Hidróxido de sódio em 1000 mL de água destilada. A concentração final da solução é de 0,1 N.

3.2.2 Seleção do Microrganismo

Foi realizada uma seleção de microrganismos do acervo da Coleção de Culturas Tropical – Fundação “André Tosello”.

A seleção foi conduzida da seguinte forma: foram repicadas 17 linhagens com o gênero *Pseudomonas* do acervo da Coleção de Culturas Tropical em meio de cultura agar nutriente para a obtenção da biomassa.

Para a preparação da amostra usaram-se tubos de rosca com 5 mL do meio de cultura caldo nutriente, concentração 8 g.L⁻¹, estéril, e neste meio foi acrescentado, com o auxílio de uma pipeta estéril, 1 mL da suspensão da bactéria. Com uma pipeta estéril adicionaram-se 5 mL da solução do corante estoque. A concentração final do corante para análise foi de 50 mg.L⁻¹.

Os microrganismos selecionados do gênero *Pseudomonas* da Coleção de Culturas Tropical estão apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Seleção de microrganismo para degradação de corante.

Espécie	Referência	Isolamento
<i>P. diminuta</i>	CCT 0594 / ATCC 11568	Água fresca
<i>P. fluorescens</i>	CCT 0595 / ATCC 13525	Tanque pre-filtro
<i>P. mendocina</i>	CCT 0597 / ATCC 25411	Solo com etanol
<i>Pseudomonas sp</i>	CCT 1899 / ATCC 31461	Lago
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 1915 / ATCC 13388	Não informado
* <i>P. rubescens</i>	CCT 1967 / IMI 12202 (CABI)	Não informado
<i>P. oleovorans</i>	CCT1969 / IMI 6576 (CABI)	Não informado
<i>P. putida</i>	CCT 2357 / ATCC 12633	Não informado
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 2738 / ATCC 15442	Bebedouro de animal
<i>P. mendocina</i>	CCT 2956 / ATCC 25411	Solo com etanol
<i>P. fluorescens</i>	CCT 3178 / ATCC 13525	Tanque pre filtro
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 4392 / ATCC 15442	Bebedouro de animal
<i>P. fluorescens</i>	CCT 4973 / Isolado CCT	Tratamento efluente
<i>P. acidovorans</i>	CCT 4976 / Isolado CCT	Tratamento efluente
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 5448 / ATCC 15442	Bebedouro de animal
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 5587 / ATCC 15442	Bebedouro de animal
<i>P. stutzeri</i>	CCT 7544 / ATCC 31258	Solo

**Shewanella putrefaciens*

Os microrganismos estão preservados no acervo da Coleção de Culturas Tropical nas seguintes formas: suspensão com 10% de glicerol (v/v) em freezer - 80°C e liofilizado em ampola com *skim milk*.

De acordo com o banco de culturas alemão *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ), as linhagens com as referências CCT 1967 e CCT 2956 tiveram seus nomes reclassificados, sendo chamadas de *Shewanella putrefacies* e *Comamonas acidovorans*, respectivamente.

A linhagem está depositada na Coleção de Culturas Tropical com o nome de *Pseudomonas rubescens*, porém de acordo com o banco de culturas alemão,

Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) houve uma reclassificação na nomenclatura da linhagem, passando a se chamar *Shewanella putrefaciens*.

3.2.3 Determinação da curva padrão dos corantes

Para cada corante foi feita a curva padrão, por espectrofotometria óptica.

Diluiu-se o corante a partir da solução de 100 mg.L⁻¹ em água destilada, com o auxílio de uma pipeta automática nas seguintes concentrações: 0,75; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50 mg.L⁻¹.

3.2.4 Planejamento Fatorial Fracionário para melhoria do processo de descoloração

O planejamento fatorial fracionário consiste em quantificar os efeitos dos fatores, em geral, as variáveis, em uma determinada resposta.

Para a realização do planejamento é necessário identificar os fatores e as respostas e definir os objetivos para escolher o planejamento mais apropriado (Neto, *et al.*, 2007). Para a análise seleciona-se um número fixo de níveis (valores) para cada uma das variáveis, realizando assim o experimento com todas as combinações possíveis.

As condições controladas pelo experimentador são as variáveis, podendo ser qualitativos (como um catalisador) ou quantitativos (como a temperatura) (Neto, *et al.*, 2007).

O número de ensaios utilizando o planejamento fatorial fracionário é mínimo e para não excluir fatores importantes, é necessário estudar o maior número de variáveis (Neto, *et al.*, 2007).

O cálculo dos efeitos de cada variável é feito da seguinte forma: subtraindo-se a média das respostas no maior nível pela média das respostas no menor nível, conforme a equação 3.1. Se a resposta é positiva, os resultados melhoram quando

se passa do menor para o maior nível. Se for negativa, as respostas pioram quando se passa do menor para o maior nível. Se a resposta tem magnitude pequena, comparada com outras respostas, ela pode ser considerada não significativa.

$$Efeito = \bar{y}^+ - \bar{y}^- \quad (\text{Equação 3.1})$$

Com o ensaio realizado com ponto central, utilizamos, para obtermos a estimativa do erro padrão, as equações 3.2, 3.3 e 3.4.

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{Equação 3.2})$$

$$s = \sqrt{s^2} \quad (\text{Equação 3.3})$$

onde s^2 é a variância e s é o erro padrão de uma resposta, que neste caso é igual ao erro padrão de um efeito.

O valor limite para significância do valor absoluto de um efeito será, com 95% de nível de confiança:

$$t_{2,0,025} \times s_{efeito} = 4,303 \times 0,2839 \text{mg.L}^{-1} = 1,2216 \text{mg.L}^{-1} \quad (\text{Equação 3.4})$$

Foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário para se observar o efeito de variáveis no processo de descoloração do corante. As variáveis utilizadas foram as seguintes:

- pH;
- Temperatura;
- Meio de Cultura;
- Agitação ou estático;
- *Pool* de microrganismo e cultura pura.

Foram utilizados no planejamento fatorial fracionário os seguintes parâmetros: 2^{3-1} e 2^{3-1} com ponto um central.

A determinação da descoloração dos corantes foi realizada através de espectrometria.

3.2.5 Influência da degradação do meio de cultura na análise espectrofotométrica

Foi estudada a influência do meio de cultura caldo nutriente utilizado na análise do corante, na leitura espectrofotométrica.

As condições que a análise foi submetida foram:

- meio de cultura caldo nutriente (concentração 8 g.L⁻¹),
- temperatura a 25 °C,
- pH 8,5,
- tempo de 24 e 48 horas.

3.2.6 Condições para a descoloração do corante

Após o resultado do planejamento fatorial fracionário foram analisados, com a melhor condição de descoloração, os nove corantes.

Para preparação da amostra para a análise de biodegradação, usou-se o erlenmeyer com o meio de cultura estéril (50 mL), e neste meio foram acrescentados, com o auxílio de uma pipeta estéril, 200 µL de solução de NaOH e 1 mL da suspensão da bactéria *Shewanella putrefaciens* (células novas, com 24 horas de incubação). Com o auxílio de uma proveta estéril colocaram-se 50 mL da solução do corante estoque. A concentração final do corante para análise foi de 50 mg.L⁻¹.

As condições estabelecidas para o processo de biodegradação foram:

- meio de cultura caldo nutriente (concentração 8 g.L⁻¹),
- temperatura a 25 °C,
- pH 8,5, e
- tempo de 24 e 48 horas.

Foi analisada também a descoloração de dois corantes na presença de oxigênio na solução. Os corantes analisados foram o B31 e o R34. A análise iniciou-se com concentração dos corantes a 50 mg.L⁻¹ e suspensão de células novas (com

24 horas de incubação) da bactéria *Shewanella putrefaciens* e as condições estabelecidas foram:

- condições aeróbias (agitação com 150 rpm),
- meio de cultura caldo nutriente (concentração 8 g.L⁻¹),
- temperatura a 25 °C,
- pH 8,5,
- tempo de 24 e 48 horas.

Capítulo 4 – RESULTADOS e DISCUSSÕES

4.1 Linhagens com potencial de degradação

Na seleção do microrganismo, um dentre dezessete testados, obteve resultado satisfatório. Os microrganismos foram escolhidos por dois motivos: por serem do gênero *Pseudomonas* e pelo fato de terem sido isolados de ambientes naturais ou de estações de tratamento em geral.

A linhagem que apresentou melhor resultado na seleção dos microrganismos foi a *Shewanella putrefaciens* (CCT 1967), conforme observação visual (tabela 4.1 e tabela 4.2).

Tabela 4.1: Bactérias com as referências

Espécie	Referência
<i>P. diminuta</i>	CCT 0594 / ATCC 11568
<i>P. fluorescens</i>	CCT 0595 / ATCC 13525
<i>P. mendocina</i>	CCT 0597 / ATCC 25411
<i>Pseudomonas sp</i>	CCT 1899 / ATCC 31461
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 1915 / ATCC 13388
<i>P. rubescens (Shewanella putrefaciens)</i>	CCT 1967 / IMI 12202 (CABI)
<i>P. oleovorans</i>	CCT1969 / IMI 6576 (CABI)
<i>P. putida</i>	CCT 2357 / ATCC 12633
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 2738 / ATCC 15442
<i>P. mendocina</i>	CCT 2956 / ATCC 25411
<i>P. fluorescens</i>	CCT 3178 / ATCC 13525
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 4392 / ATCC 15442
<i>P. fluorescens</i>	CCT 4973 / Isolado CCT
<i>P. acidovorans (Comamonas acidovorans)</i>	CCT 4976 / Isolado CCT
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 5448 / ATCC 15442
<i>P. aeruginosa</i>	CCT 5587 / ATCC 15442
<i>P. stutzeri</i>	CCT 7544 / ATCC 31258

Tabela 4.2: Resultado da seleção de microrganismo para descoloração dos corantes azo.

CCT	B31	B36	B86	MO	R34	R91	Y15	Y87	Y79
0594	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0595	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0597	+	+	-	-	-	-	-	-	-
1899	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1915	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1967	+	+	-	+	+	+	+	+	-
1969	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2357	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2738	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2956	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3178	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4392	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4973	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4976	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5448	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5587	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7544	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) degradado, (-) não degradado.

4.2 Construção das curvas padrão para cada corante

Cada corante foi conduzido à leitura em espectrofotômetro para a construção de suas respectivas curvas padrão. Foram utilizadas as seguintes concentrações para a construção da reta: 0,75; 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50 mg.L⁻¹.

Para cada reta há a equação para a determinação quantitativa da descoloração de cada corante (figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.9).

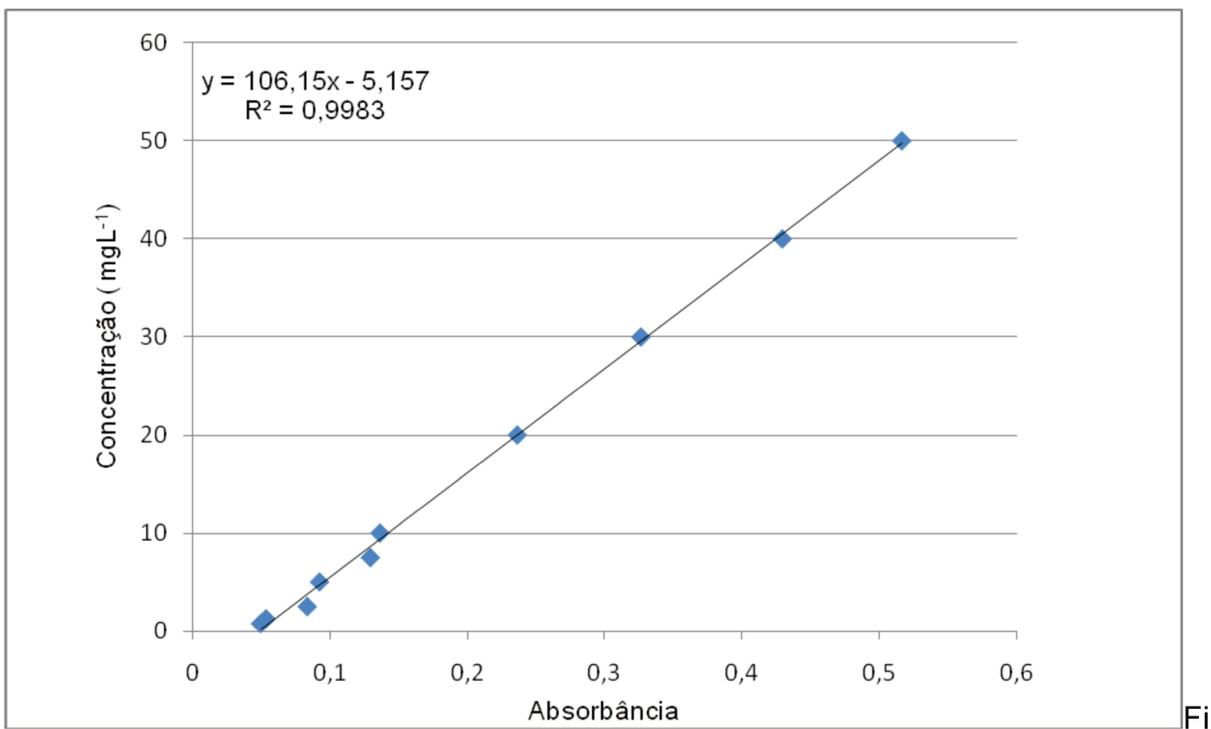


Figura 4.1: Gráfico da curva padrão do corante B31

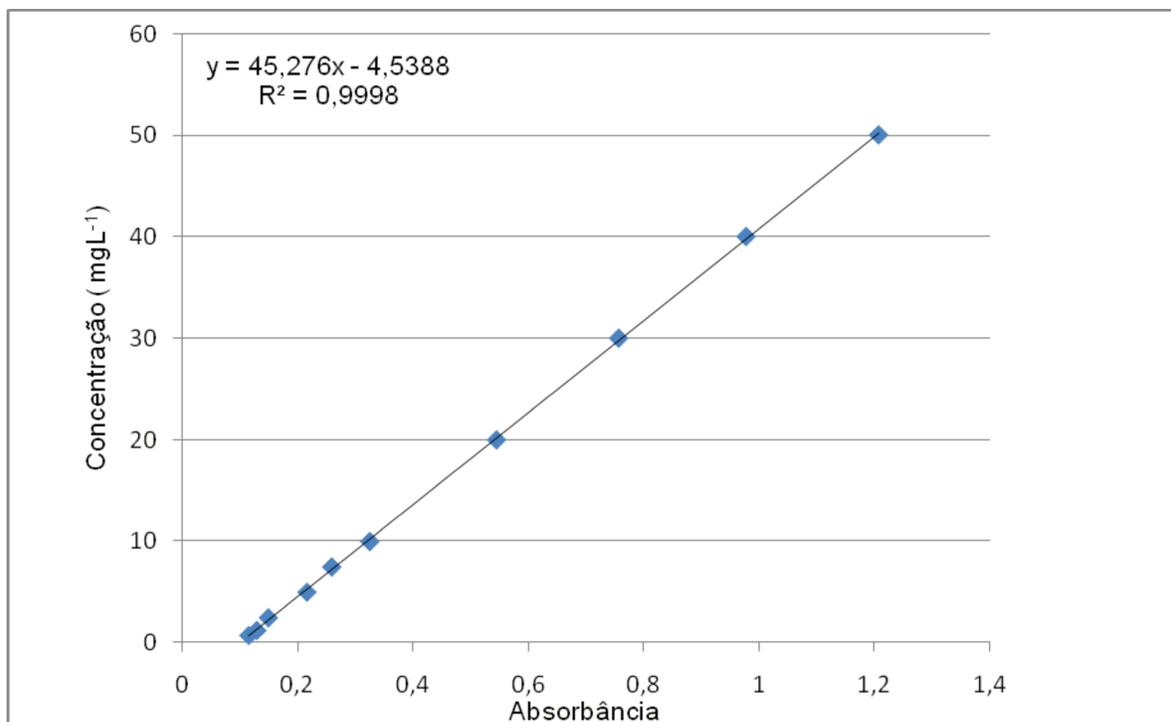


Figura 4.2: Gráfico da curva padrão do corante B36

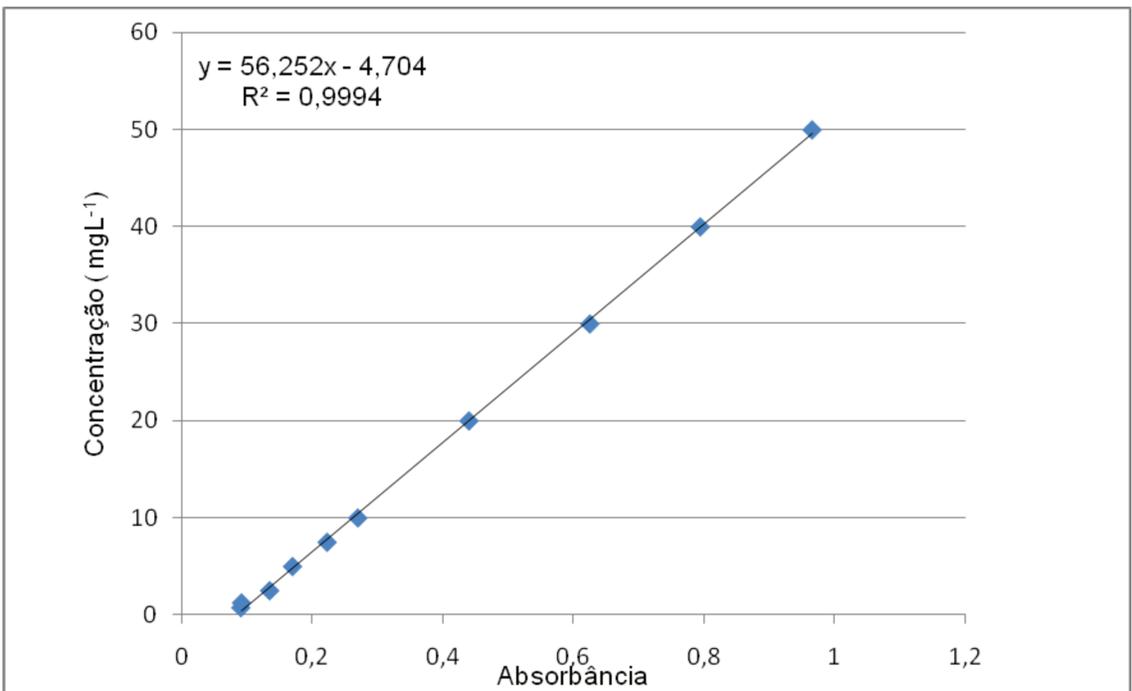


Figura 4.3: Gráfico da curva padrão do corante B86

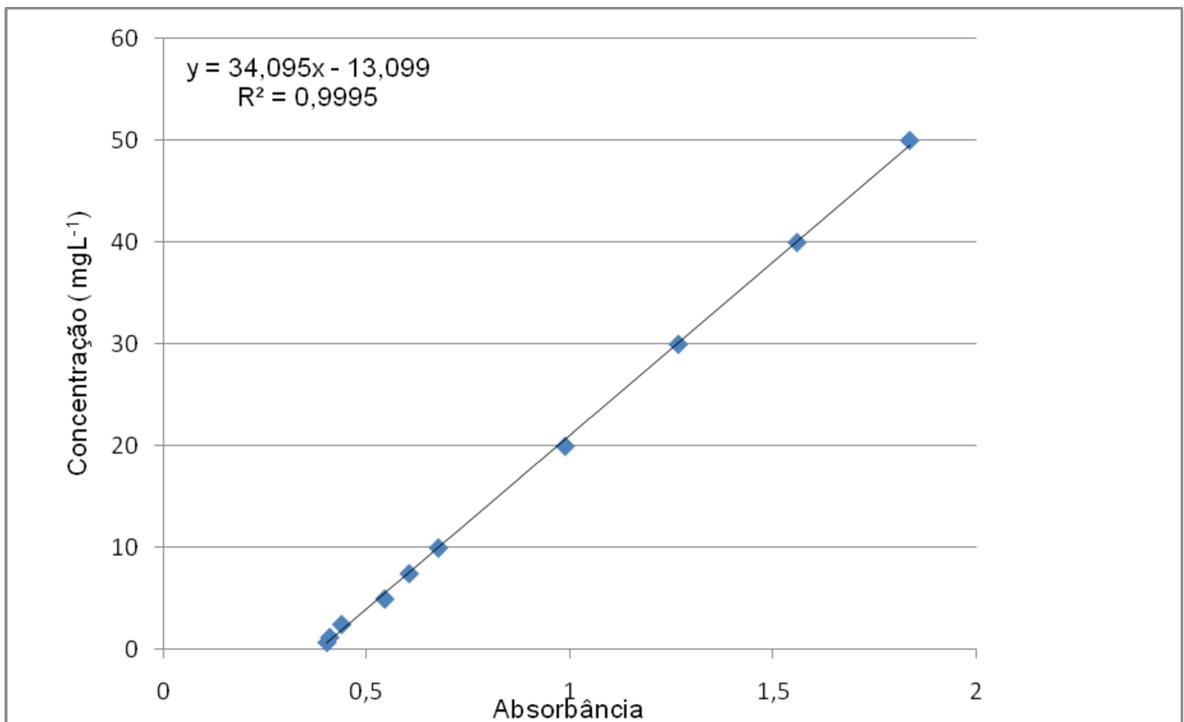


Figura 4.4: Gráfico da curva padrão do corante MO

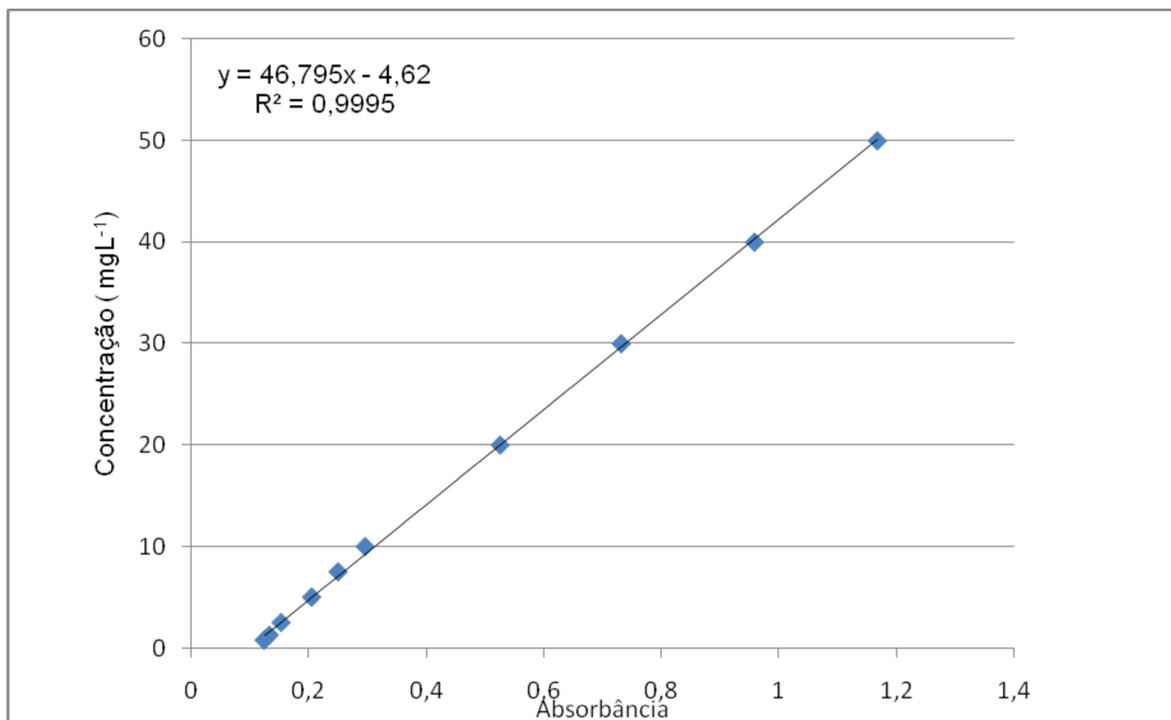


Figura 4.5: Gráfico da curva padrão do corante R34

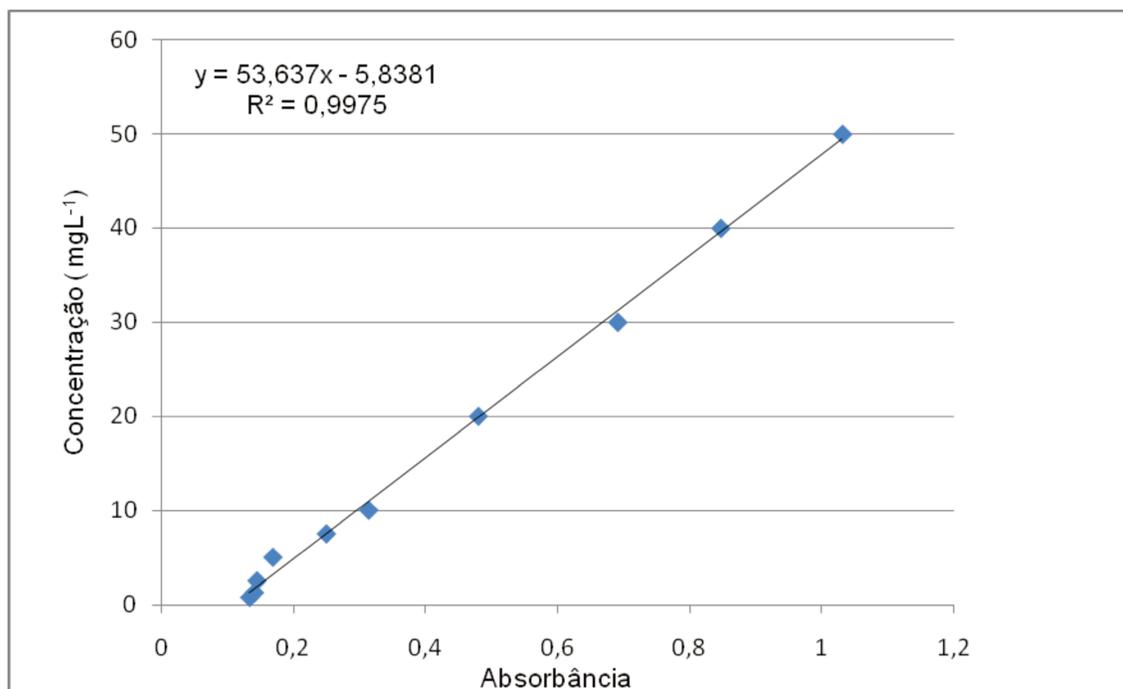


Figura 4.6: Gráfico da curva padrão do corante R91

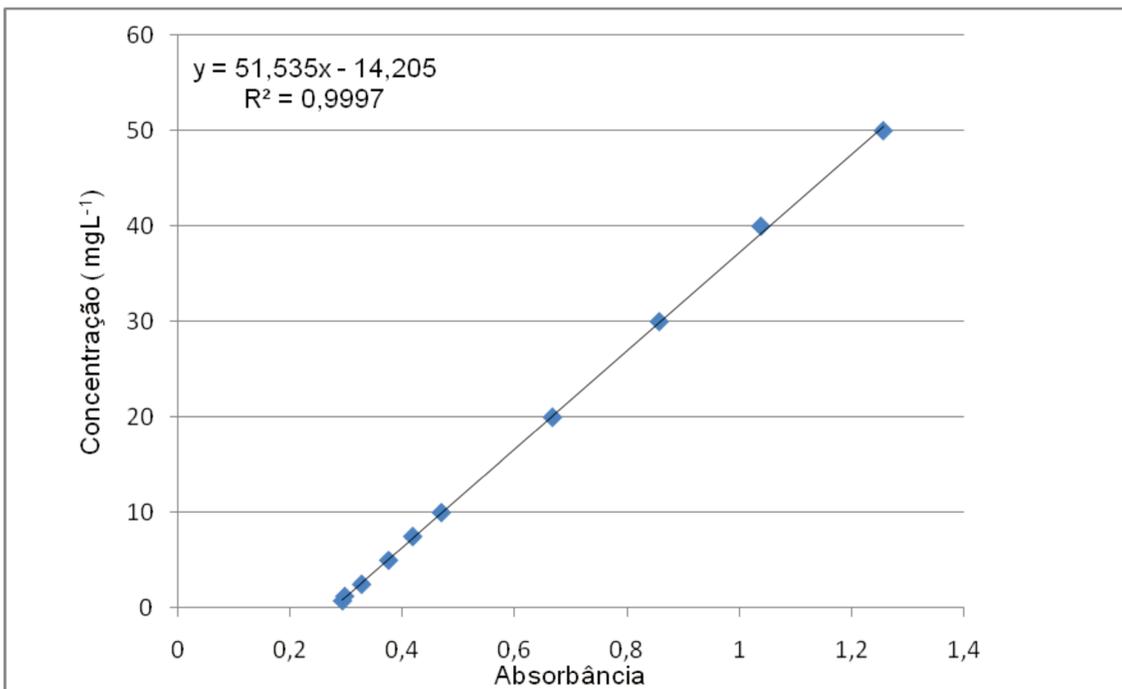


Figura 4.7: Gráfico da curva padrão do corante Y15

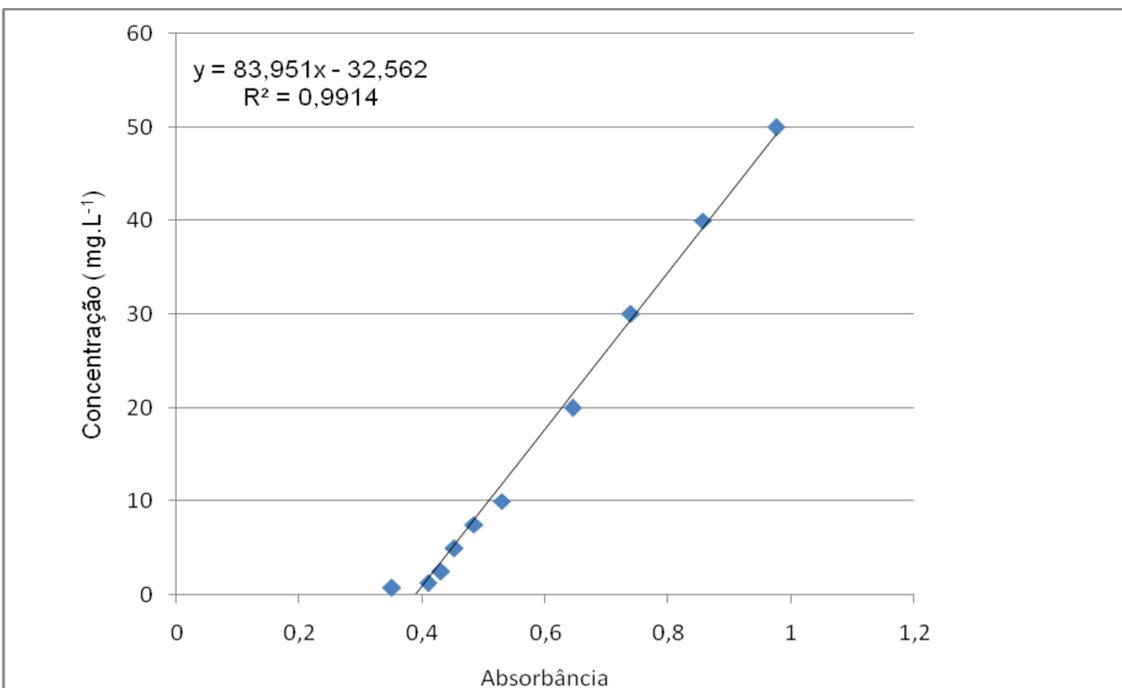


Figura 4.8: Gráfico da curva padrão do corante Y79

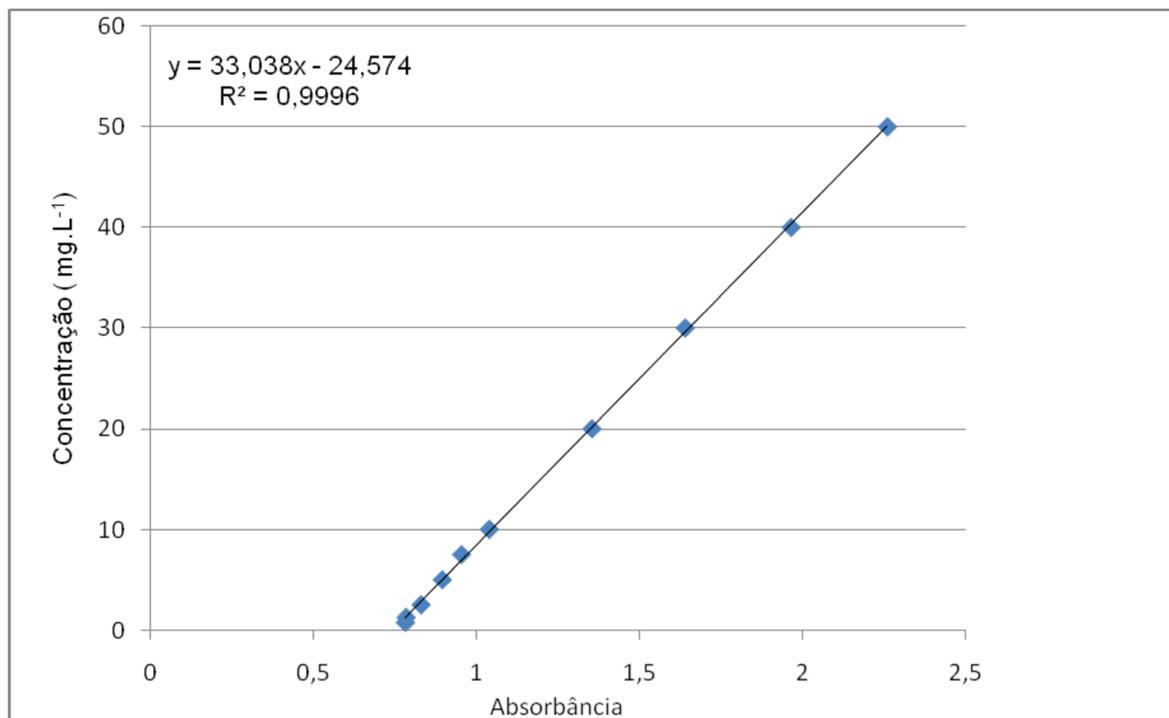


Figura 4.9: Gráfico da curva padrão do corante Y87

4.3 Planejamento Fatorial Fracionário

4.3.1 Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 1

As condições para a análise no experimento 1, tabela 4.3, foram a utilização do corante MO com concentração inicial de 50 mg.L⁻¹; os meios de cultura caldo nutriente e meio mínimo mineral; valores de pH 7,0 e 8,5; cepas utilizadas *S. putrefaciens* CCT 0571 e *S. putrefaciens* CCT 1967.

Tabela 4.3: Níveis das variáveis estudados para o Experimento 1.

Variáveis	Código	Níveis	
		-	+
Meio de Cultura	1	Meio Mínimo	Caldo Nutriente
pH	2	7,0	8,5
Microrganismo	3	<i>S. putrefaciens</i> CCT 1967	<i>S. putrefaciens</i> CCT 0571

A tabela 4.4 apresenta os valores codificados e os reais para a realização dos ensaios.

Tabela 4.4: Planejamento Fatorial codificado e com valores reais para o Experimento 1.

Ensaio	Valores codificados			Valores reais		
	1	2	3	Meio de Cultura	pH	Microrganismo
1	-	-	+	Meio Mínimo	7,0	<i>S putrefaciens</i> CCT 0571
2	+	-	-	Caldo Nutriente	7,0	<i>S putrefaciens</i> CCT 1967
3	-	+	-	Meio Mínimo	8,5	<i>S putrefaciens</i> CCT 1967
4	+	+	+	Caldo Nutriente	8,5	<i>S putrefaciens</i> CCT 0571

As leituras dos ensaios foram realizadas em até 48 horas, em espectrofotômetro. Os valores de absorvância foram transformados em concentração através das equações das curvas padrão.

Na tabela 4.5 têm-se os resultados de cada ensaio, apresentando a concentração final na amostra e a concentração que o microrganismo descoloriu.

Tabela 4.5: Resultados do Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 1.

Ensaio	Meio de Cultura	pH	Microrganismo	Resultados	
				Concentração do corante (mg.L ⁻¹)	Corante Degradado (mg/L)
1	Meio Mínimo	7,0	<i>S putrefaciens</i> CCT 0571	49,78	0,22
2	Caldo Nutriente	7,0	<i>S putrefaciens</i> CCT 1967	19,41	30,59
3	Meio Mínimo	8,5	<i>S putrefaciens</i> CCT 1967	49,96	0,04
4	Caldo Nutriente	8,5	<i>S putrefaciens</i> CCT 0571	18,14	31,86

Com os resultados da tabela 4.5 foram realizados os cálculos para encontrar os valores de cada efeito (Meio de cultura, pH e microrganismo).

Cálculo do Efeito 1 (Meio de cultura):

$$\text{Efeito 1} = (30,59 + 31,86) / 2 - (0,22 + 0,04) / 2$$

$$\text{Efeito 1} = 31,225 - 0,13$$

$$\text{Efeito 1} = 31,095 \text{ mg.L}^{-1}$$

O cálculo do Efeito 1 diz que as respostas melhoram em média $31,095 \text{ mg.L}^{-1}$ quando se passa do menor para o maior nível. Em outras palavras, quando se usa caldo nutriente, tem-se uma degradação de corante em média de $31,095 \text{ mg.L}^{-1}$ a mais do que quando se usa Meio Mínimo.

Cálculo do Efeito 2 (pH):

$$\text{Efeito 2} = (0,04 + 31,86) / 2 - (0,22 + 30,59) / 2$$

$$\text{Efeito 2} = 15,95 - 15,405$$

$$\text{Efeito 2} = 0,545 \text{ mg.L}^{-1}$$

O cálculo do Efeito 2 mostra que as respostas melhoram em média $0,545 \text{ mg.L}^{-1}$ quando se passa do menor para o maior nível. Pode-se dizer que, quando se usa o pH 8,5, tem-se uma degradação de corante em média de $0,545 \text{ mg.L}^{-1}$ a mais do que quando se usa pH 7,0. Percebe-se que este valor é muito pequeno, comparado com a magnitude do valor de Efeito 1. Por isso, considera-se que ele não é estatisticamente significativo. Portanto, pode-se dizer que não há diferença significativa quando se muda o pH dos meios de 7,0 para 8,5.

Cálculo do Efeito 3 (microrganismo):

$$\text{Efeito 3} = (0,22 + 31,86) / 2 - (30,59 + 0,04) / 2$$

$$\text{Efeito 3} = 16,04 - 15,315$$

$$\text{Efeito 3} = 0,725 \text{ mg.L}^{-1}$$

O cálculo do Efeito 3 diz que as respostas melhoram em média 0,725 mg.L⁻¹ quando se passa do menor para o maior nível. Isso significa que, quando se usa *S. putrefaciens* CCT 0571, tem-se uma degradação de corante em média 0,725 mg.L⁻¹ a mais do que quando se usa *S. putrefaciens* CCT 1967. Novamente, este valor é muito pequeno comparado com o Efeito 1. Por isso, pode-se dizer que não existe diferença significativa quando se usa *S. putrefaciens* CCT 1967 ou *S. putrefaciens* CCT 0571.

O primeiro Planejamento de Experimentos mostrou que a degradação de corante usando caldo nutriente é muito mais eficiente do que usando meio mínimo; o pH não influencia o processo dentro do campo estudado (pH 7,0 e 8,5); não há diferença significativa entre a degradação causada por *S. putrefaciens* CCT 1967 ou *S. putrefaciens* CCT 0571; e, não houve degradação quando foi usado o meio mínimo mineral.

4.2.2 Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 2

As condições para a análise no experimento 2, tabela 4.6, foram a utilização do corante Y15 com concentração inicial de 50 mg.L⁻¹; valores de pH 8,5 e 9,0; as linhagens foram utilizadas em conjunto *Pool 1* (*Shewanella putrefaciens* CCT 0571, *Comamonas acidovorans* CCT 4976, *Pseudomonas mendocina* CCT 2956) e *Pool 2* (*Shewanella putrefaciens* CCT 1967, *Comamonas acidovorans* CCT 4976, *Pseudomonas mendocina* CCT 2956); e as temperaturas 20 °C e 30 °C.

Tabela 4.6: Níveis das variáveis estudados para o Experimento 2.

Variáveis	Código	Níveis	
		-	+
pH	1	8,5	9,0
Temperatura	2	20 °C	30 °C
Microrganismo	3	<i>Pool 2</i>	<i>Pool 1</i>

A tabela 4.7 apresenta os valores codificados e os reais para a realização dos ensaios.

Tabela 4.7: Planejamento Fatorial codificado e com valores reais para o Experimento 2.

Ensaio	valores codificados			valores reais		
	1	2	3	pH	Temperatura	Microrganismo
1	-	-	+	8,5	20 °C	Pool 1
2	+	-	-	9,0	20 °C	Pool 2
3	-	+	-	8,5	30 °C	Pool 2
4	+	+	+	9,0	30 °C	Pool 1

As leituras dos ensaios foram realizadas em até 48 horas, em espectrofotômetro. Os valores de absorvância foram transformados em concentração através das equações das curvas padrão.

Na tabela 4.8 têm-se os resultados de cada ensaio, apresentando a concentração final na amostra e a concentração que o microrganismo descoloriu.

Tabela 4.8: Resultados do Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 2.

Ensaio	pH	Temperatura	Microrganismo	Resultados	
				Concentração do corante (mg.L ⁻¹)	Corante Degradado (mg.L ⁻¹)
1	8,5	20 °C	Pool 1	13,69	36,30
2	9,0	20 °C	Pool 2	14,62	35,38
3	8,5	30 °C	Pool 2	13,90	36,1
4	9,0	30 °C	Pool 1	10,40	39,60

Com os resultados da tabela 4.8 foram realizados os cálculos para encontrar cada efeito (meio de cultura, pH e microrganismo).

Cálculo do Efeito 1 (pH)

$$\text{Efeito 1} = [(35,38+39,6)/2] - [(36,30+36,1)/2]$$

$$\text{Efeito 1} = 1,29 \text{ mg.L}^{-1}$$

O cálculo do Efeito 1 diz que as resposta melhoram em média 1,29 mg.L⁻¹ quando se passa do menor nível para o maior nível. Em outras palavras, quando se usa o pH 9,0, tem-se uma degradação de corante em média de 1,29 mg.L⁻¹ a mais do que quando se usa o pH 8,5. Percebe-se que este valor é pequeno.

Cálculo do Efeito 2 (Temperatura)

$$\text{Efeito 2} = [(36,1+39,6)/2] - [(35,38+36,30)/2]$$

$$\text{Efeito 2} = 1,99 \text{ mg.L}^{-1}$$

O cálculo do Efeito 2 mostra que as resposta melhoram em média 1,99 mg.L⁻¹ quando se passa do menor para o maior nível. Pode-se dizer que, quando se usa a temperatura 30 °C, tem-se uma degradação de corante em média de 1,99 mg.L⁻¹ a mais do que quando se usa a temperatura de 20 °C.

Cálculo do Efeito 3 (Pool)

$$\text{Efeito 3} = [(36,3+39,6)/2] - [(35,38+36,1)/2]$$

$$\text{Efeito 3} = 2,21 \text{ mg.L}^{-1}$$

O cálculo do Efeito 3 mostra que as resposta melhoram em média 2,21 mg.L⁻¹ quando se passa do menor para o maior nível. Pode-se dizer que, quando se usa o *Pool 1*, tem-se uma degradação de corante em média de 2,21 mg.L⁻¹ a mais do que quando se usa o *Pool 2*.

O planejamento do experimento 2, apesar de apresentar respostas satisfatórias, mostrou que todos os valores dos efeitos calculados foram de pouco significativos, podendo-se dizer que não há diferença significativa nos resultados, dentro do campo estudado.

4.2.3 Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 3

As condições para a análise no experimento 3, tabela 4.9, foram a utilização do corante B36 com concentração inicial de 50 mg.L⁻¹; valores de pH 8,0; 8,5 e 9,0; as temperaturas 20 °C, 25 °C e 30 °C; e os meios de cultura caldo nutriente 4 g.L⁻¹ (½ CN), peptona com cloreto de sódio (Pept NaCl) e caldo nutriente 8 g.L⁻¹ (CN). O microrganismo utilizado nessa análise foi a *S. putrefaciens* CCT1967.

Tabela 4.9: Níveis das variáveis estudados para o Experimento 3.

Variáveis	Código	Níveis		
		-	0	+
Meio de Cultura	1	½ CN	CN	Pept NaCl
Temperatura	2	20 °C	25 °C	30 °C
pH	3	9,0	8,0	8,5

A tabela 4.10 apresenta os valores codificados e os reais para a realização dos ensaios.

Tabela 4.10: Planejamento Fatorial codificado e com valores reais para o Experimento 3.

Ensaio	valores codificados			Valores reais		
	1	2	3	Meio de Cultura	Temperatura	pH
1	-	-	+	½ CN	20 °C	8,0
2	+	-	-	Pept NaCl	20 °C	9,0
3	-	+	-	½ CN	30 °C	9,0
4	-	+	-	Pept NaCl	30 °C	8,0
5	0	0	0	CN	25 °C	8,5
6	0	0	0	CN	25 °C	8,5
7	0	0	0	CN	25 °C	8,5

As leituras dos ensaios foram realizadas em até 48 horas, em espectrofotômetro. Os valores de absorbância foram transformados em concentração através das equações das curvas padrão.

Na tabela 4.11 têm-se os resultados de cada ensaio, apresentando a concentração final na amostra e a concentração que o microrganismo descoloriu.

Tabela 4.11: Resultados do Planejamento Fatorial Fracionário do Experimento 3.

Ensaio	Meio de Cultura	Temperatura	pH	Resultados	
				Concentração do corante (mg.L ⁻¹)	Corante Degradado (mg.L ⁻¹)
1	½ CN	20 °C	8,0	21,142	28,858
2	Pept NaCl	20 °C	9,0	37,075	12,925
3	½ CN	30 °C	9,0	32,353	17,647
4	Pept NaCl	30 °C	8,0	22,983	27,017
5	CN	25 °C	8,5	11,331	38,669
6	CN	25 °C	8,5	11,880	38,120
7	CN	25 °C	8,5	11,731	38,269

Com os resultados da tabela 4.11 foram realizados os cálculos para encontrar cada efeito (meio de cultura, temperatura e pH).

Cálculo do Efeito 1 (Meio de Cultura)

$$\text{Efeito 1} = \frac{12,925 + 27,017}{2} - \frac{28,858 + 17,647}{2}$$

$$\text{Efeito 1} = -3,2815 \text{mg.L}^{-1}$$

Cálculo do Efeito 2 (Temperatura)

$$\text{Efeito 2} = \frac{17,647 + 27,017}{2} - \frac{28,858 + 12,925}{2}$$

$$\text{Efeito 2} = 1,4405 \text{mg.L}^{-1}$$

Cálculo do Efeito 3 (pH)

$$\text{Efeito 3} = \frac{12,925 + 17,647}{2} - \frac{28,858 + 27,017}{2}$$

$$\text{Efeito 3} = -12,6515 \text{mg.L}^{-1}$$

O valor limite para significância do valor absoluto de um efeito será, com 95% de nível de confiança:

$$t_{2,0,025} \times s_{\text{efeito}} = 4,303 \times 0,2839 \text{mg.L}^{-1} = 1,2216 \text{mg.L}^{-1}$$

Como todos os valores dos efeitos são maiores que 1,2216 mg.L⁻¹, podemos dizer que todos são significativos dentro do limite de confiança de 95%.

O efeito mais importante é o pH (efeito 3), sendo que as respostas melhoram em média 12,6515 mg.L⁻¹ quando se passa do pH 9,0 para o pH 8,0.

O segundo efeito mais importante é o meio de cultura (efeito 1), e as respostas melhoram em média 3,2815 mg.L⁻¹ quando se usa o meio caldo nutriente, concentração 4 g.L⁻¹

O efeito menos importante é a temperatura (efeito 2), já que as respostas melhoram em média apenas 1,4405 mg.L⁻¹ quando se passa de 20 °C para 30 °C.

O modelo que se obtém a partir do planejamento proposto (fatorial fracionário) é um modelo linear. Entretanto, os resultados do ponto central, efetuado com a finalidade de se estimar o erro, apresentaram-se aparentemente melhores do que os resultados dos níveis inferiores e superiores do planejamento.

Se a superfície de resposta gerada puder ser representada por um plano (modelo linear), o valor médio das respostas no ponto central deve coincidir com o valor médio das respostas nos vértices do planejamento (limites inferiores e superiores). Já se a superfície for quadrática (modelo quadrático, ou de segundo grau), a diferença entre essas duas respostas médias é uma medida da curvatura global.

Nas figuras observamos a superfície de resposta no planejamento fatorial experimental do experimento 3.

Ponto central:

$$\bar{y}_c = \frac{38,669 + 38,120 + 38,269}{3} = 38,353 \text{mg.L}^{-1}$$

Vértices:

$$\bar{y}_v = \frac{28,858 + 12,925 + 17,647 + 27,017}{4} = 21,612 \text{mg.L}^{-1}$$

Diferença:

$$\Delta = \bar{y}_c - \bar{y}_v = 38,535 - 21,612 = 16,741 \text{mg.L}^{-1}$$

Variância conjunta:

$$s^2(\bar{y}_c - \bar{y}_v) = s^2(\bar{y}_c) + s^2(\bar{y}_v) = \frac{s^2}{4} + \frac{s^2}{3} = \frac{7s^2}{12} = \frac{7 \times 0,0806}{12} = 0,047 \text{mg.L}^{-2}$$

Desvio padrão combinado:

$$s = \sqrt{s^2} = 0,217 \text{mg.L}^{-1}$$

Valor limite para a diferença, no nível de 95% de confiança:

$$t_{2;0,025} \times s_{\text{combinado}} = 4,303 \times 0,217 \text{mg.L}^{-1} = 0,9338 \text{mg.L}^{-1}$$

Como o valor da diferença é muito maior que o valor limite, no nível de 95% de confiança, tem evidência de uma forte curvatura na superfície de resposta, provando que as respostas no ponto central são significativamente melhores do que as dos vértices (limites inferior e superior), conforme mostram as figuras 4.10, 4.11 e 4.12. Logo, as melhores condições de processo são caldo nutriente com concentração de 8 mg.L^{-1} , pH 8,5 e temperatura $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (as mesmas do ponto central).

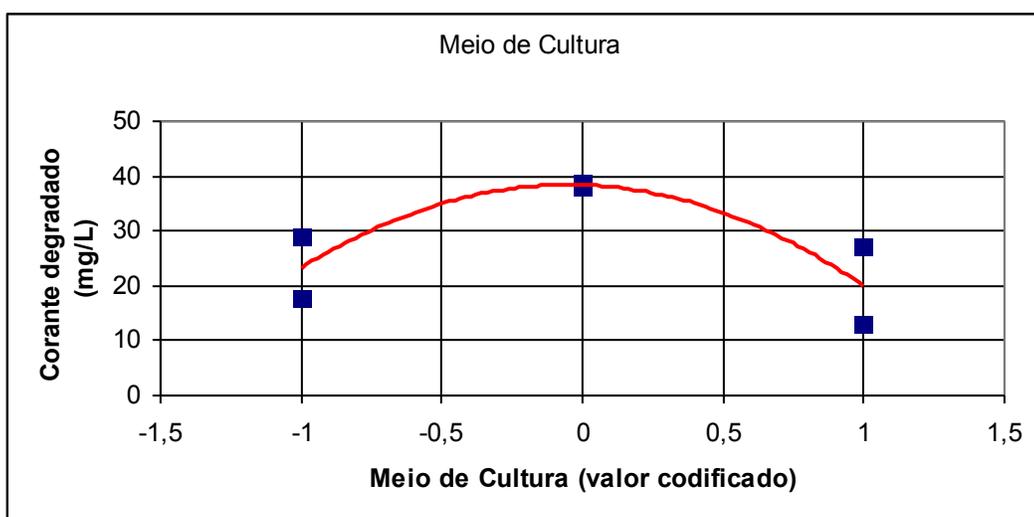


Figura 4.10: Representação gráfica do efeito do meio de cultura no experimento 3

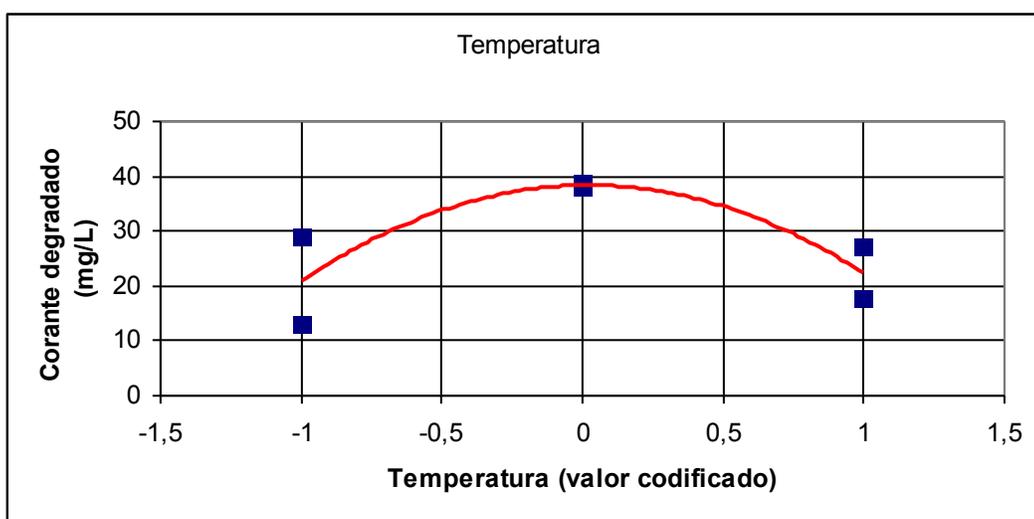


Figura 4.11: Representação gráfica do efeito da temperatura no experimento 3

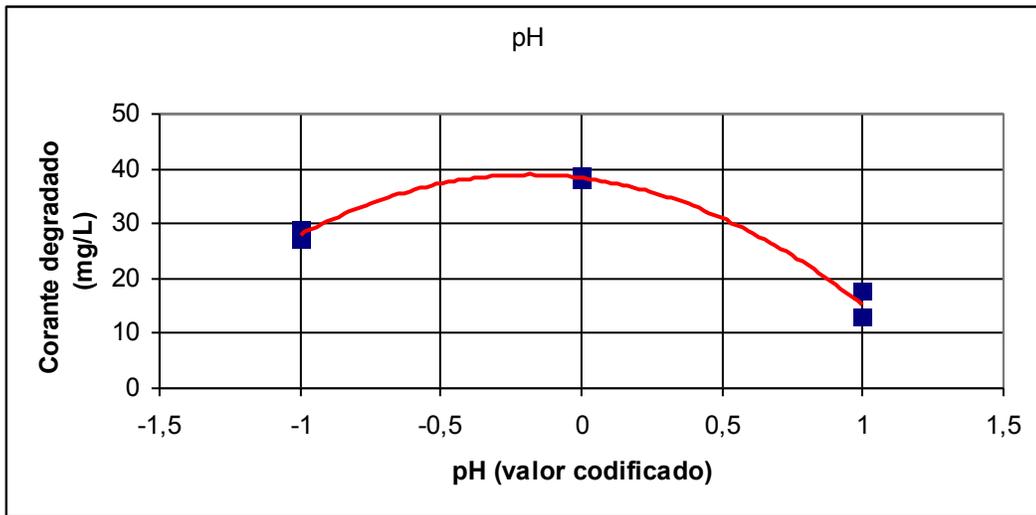


Figura 4.12 Representação gráfica do efeito do pH no experimento 3

No gráfico de Pareto (Figura 4.13) é observado que todos os efeitos são significativos dentro do nível de confiança de 95%.

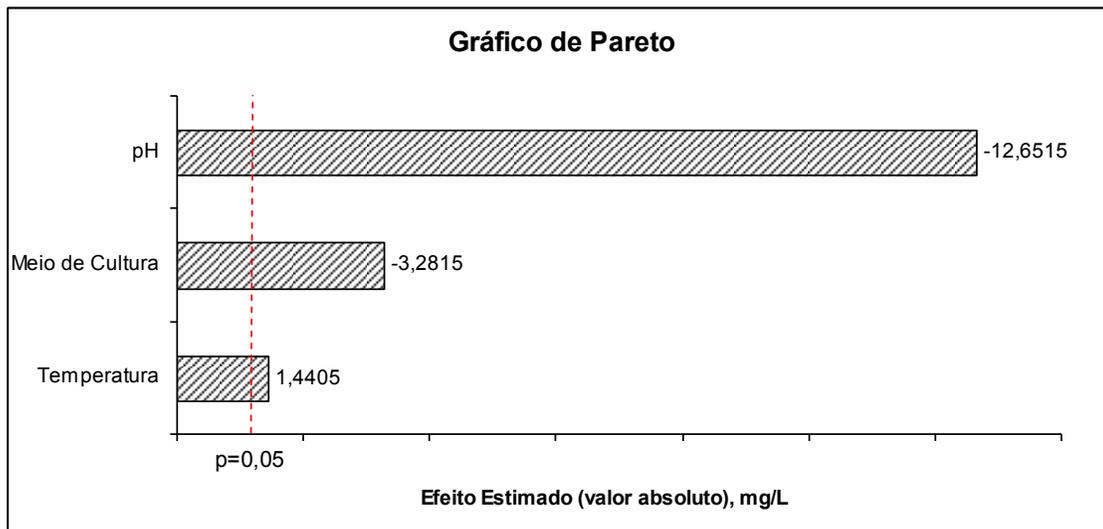


Figura 4.13: Gráfico de Pareto representando os efeitos do experimento 3

4.4 Influência da descoloração do meio de cultura na análise espectrofotométrica

O meio de cultura caldo nutriente não apresentou interferência nos resultados de leitura da degradação do corante no espectrofotômetro. A tabela 4.12 apresenta os resultados de medidas de valores de densidade ópticas diferentes, de acordo com cada corante, para verificar a interferência. O resultado foi de mínima diferença nos valores com o meio de cultura, sem o corante, não degradado, degradado em 24 e 48 horas pela bactéria.

Tabela 4.12: Valores da medida do meio de cultura caldo nutriente em diferentes comprimentos de onda

λ	CN 0 hora	CN 24 horas	CN 48 horas
385	0,332	0,344	0,371
390	0,311	0,323	0,349
410	0,260	0,275	0,347
436	0,158	0,161	0,182
500	0,083	0,089	0,130
530	0,044	0,044	0,054
600	0,018	0,018	0,027
610	0,016	0,016	0,024

4.5 Biodescoloração dos corantes azo

Foi realizado um estudo de descoloração dos nove corantes azo utilizando a bactéria *S. putrefaciens* CCT 1967. Os resultados foram os seguintes: os corantes Y87, B36, R91, R34, Y15 e B31 foram descoloridos em média até uma concentração final de 3 mg.L^{-1} no período de até 48 horas. Já o corante Y79 não teve descoloração satisfatória. A representação gráfica das descolorações em função do tempo é apresentada nas figuras 4.14 e 4.15.

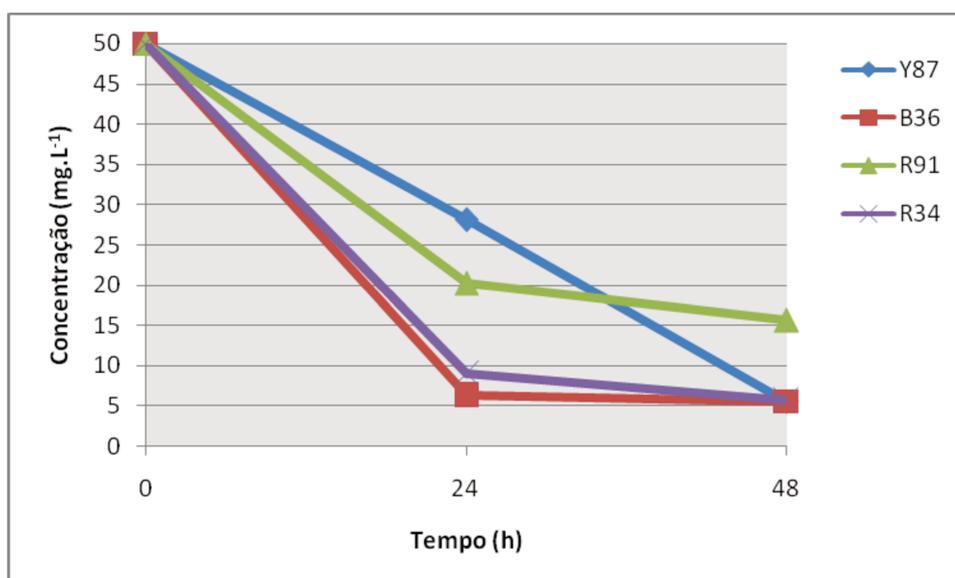


Figura 4.14: Descoloração dos corantes Y87, B36, R91 e R34 nos tempos 0, 24 e 48 horas

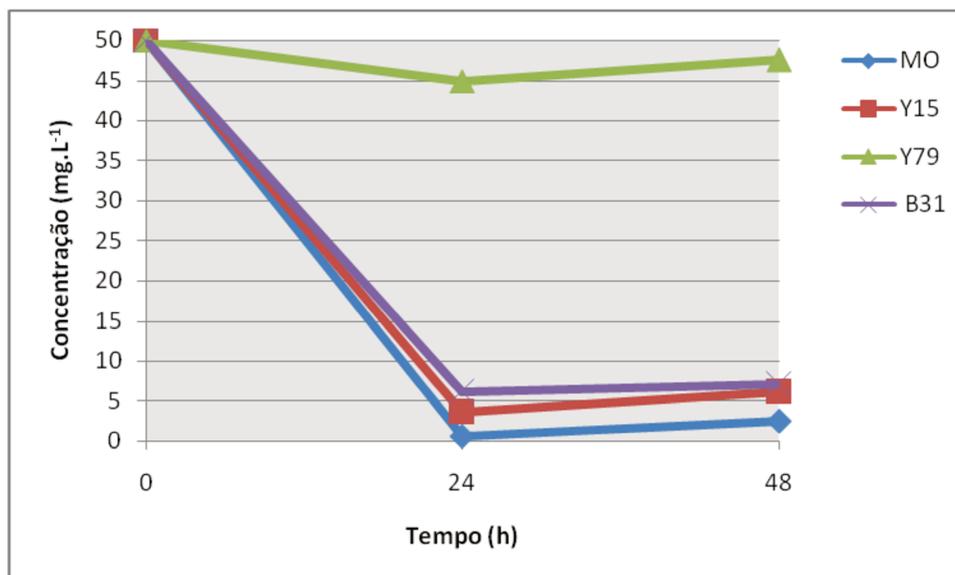


Figura 4.15: Descoloração dos corantes MO, Y15, Y79 e B31 nos tempos 0, 24 e 48 horas

A amostra B86 apresentou como resultado apenas a precipitação do corante, não havendo descoloração, como observada na figura 4.16.

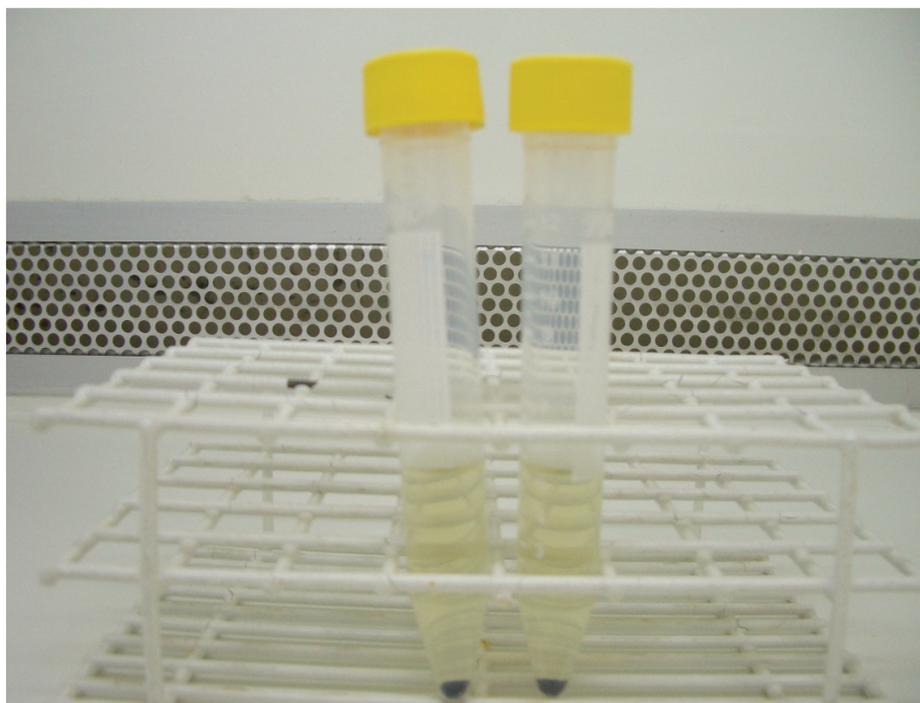


Figura 4.16: Precipitação do corante B86 pós centrifugação.

O resultado da análise realizada com a descoloração em condições aeróbias foi negativo. As figuras 4.17, 4.18, 4.19 e 4.20 apresentam uma comparação visual da diferença de descoloração em diferentes condições estabelecidas.



Figura 4.17: Corante B31 no tempo 0 h

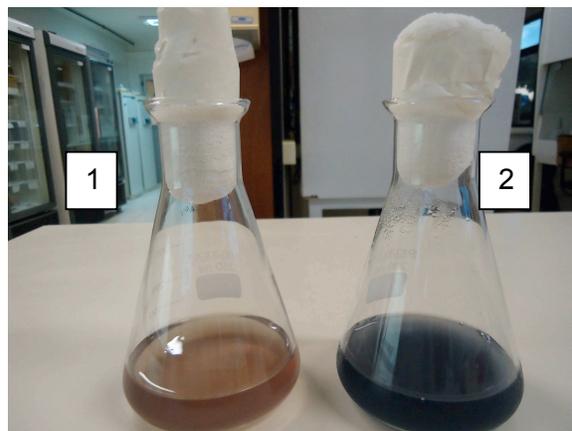


Figura 4.18: Corante B31 no tempo 48 h
(1) sem agitação e (2) com agitação



Figura 4.19: Corante R34 no tempo 0 h

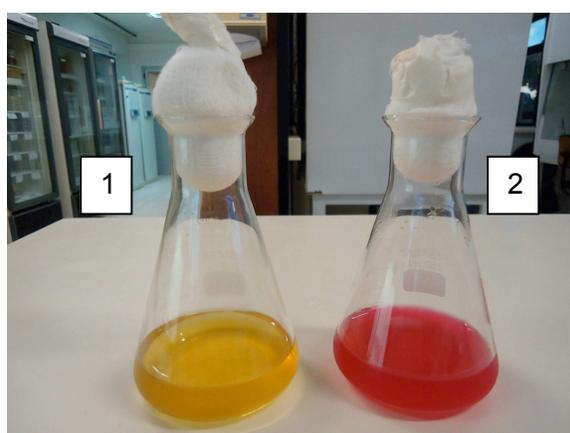


Figura 4.20: Corante R34 no tempo 48 h
(1) sem agitação e (2) com agitação

Na figura 4.21, observa-se a representação gráfica das descolorações em função do tempo.

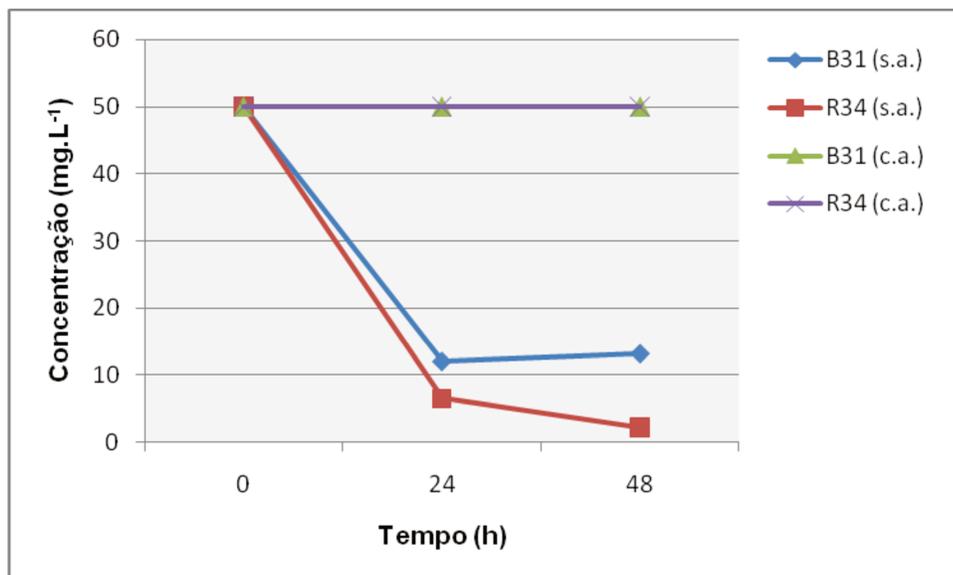


Figura 4.21: Comparação da descoloração dos corantes B31 e R34 em diferentes condições (s.a.: sem agitação e c.a.: com agitação).

Em condições aeróbias (com agitação) a descoloração dos corantes não ocorreu, enquanto que a descoloração sem agitação atingiu concentração final do corante de 13,2 e 2,2 mg.L⁻¹, com os corantes B31 e R34, respectivamente.

Com os resultados das análises acima se pode entender o efeito de cada fator:

Oxigênio

O processo de biodegradação sem agitação foi essencial para a degradação dos corantes estudados. Em condições aeróbias os corantes B31 e R34 não apresentaram descoloração, apenas grande quantidade de biomassa. Pearce et al (2008) relatam que em condições aeróbias o corante azo não é facilmente metabolizado. Isso acontece pelo fato de haver inibição na atividade de redução do corante, pois o oxigênio domina a utilização do NADH, impedindo assim a transferência do NADH para as pontes do corante azo (CHANG e LIN, 2001; BRATT et al., 2005). Pearce et al (2003) relatam também que, com a presença de grande

quantidade de oxigênio (degradação com agitação), os elétrons liberados da oxidação do doador de elétrons das células são mais coligativos do que às moléculas de corantes azo .

No trabalho de Kalyani et al (2009), a utilização de agitação para a degradação do corante utilizando a *Pseudomonas* sp. SUK1, não apresentou descoloração, enquanto que em condições anóxicas o resultado foi de 96%. No trabalho de Kalme *et al* (2007) , a descoloração obteve uma porcentagem maior quando feitas em condições anóxicas. O corante azo Direct Blue-6 apresentou 92% de degradação em condições anóxicas, e apenas 16% em aerobiose.

Temperatura

A temperatura utilizada, 25 °C, foi a melhor encontrada no estudo de melhoria das condições de descoloração. Essa temperatura pode ser adequada em um tratamento por ser uma temperatura que dificilmente vai desnaturar as enzimas celulares.

pH

Normalmente, os efluentes de indústria que utilizam o corante têxtil são alcalinos. Com base nesse conhecimento foram testados pH neutro e alcalino na análise. O pH 8,5 foi o que apresentou melhor degradação do corante.

Pearce et al (2003) relatam que, na redução biológica do corante azo são formadas, como metabólitos, aminas aromáticas e então há um aumento de pH.

Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho obteve bons resultados de descoloração. Uma pesquisa similar de Silveira et al. (2009), utilizaram

Pseudomonas para a biodegradação dos corantes Methyl Orange, R91, B36 e B31, o resultado apresentado foi a descoloração dos corantes acima de 60%.

A *Shewanella putrefaciens* sendo uma bactéria anaeróbia facultativa apresentou descoloração dos corantes sem agitação, podendo ter utilizado, componentes da molécula do corante como aceptor de elétron.

Capítulo 5 – CONCLUSÕES e SUGESTÕES

5.1 Conclusões finais

Conclui-se que a *Shewanella putrefaciens* obteve grande eficiência na descoloração dos corantes, com exceção do corante Y79 e o corante B86 o houve a precipitação do mesmo.

De acordo com o planejamento fatorial fracionário as condições utilizadas, pH 8,5 e temperatura 25 °C, foram mais eficientes dentro do campo estudado.

Para a descoloração, o meio de cultura necessitou ter um mínimo de carbono e nitrogênio para o trabalho metabólico da bactéria. O meio de cultura utilizado foi de custo baixo e sua coloração não interferiu na leitura óptica, sendo então de boa aplicação.

Utilizando a agitação na análise provou-se que a presença do oxigênio interfere na descoloração.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Sugestões para trabalhos futuros com descoloração / biodegradação de corantes são:

- Pesquisar outras condições de biodegradação para os corantes Y79 e B86.
- Verificar após a descoloração os subprodutos formados.
- Realizar o estudo da ação do corante nas células da bactéria, ou seja, como é metabolizado.
- Realizar estudo com a célula imobilizada.

Capítulo 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANAT, M.I.; NIGHAM, P.; SINGH, D; MARCHANT, R. Microbial decolorization of textile dyes containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, v. 58, n. 3, p. 217-227, 1996.

BEZERRA dos SANTOS, A. Reductive decolourisation of dyes by thermophilic anaerobic granular sludge. PhD thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2005.

BHATT, N.; PATEL, K.C., KEHARIA, H., MADAMWAR, D. Decolorization of diazo-dye Reactive Blue 172 by *Pseudomonas aeruginosa* NBAR12. *J. Basic Microbiology*, v. 45, n. 6, p. 407-418, 2005.

BRAGA, A. Haverá racionamento de água em São Paulo daqui a dez anos. *Revista IstoÉ*, 14 mar 2012. Entrevista, ano 36, p. 10.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2: The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria. Springer, 2005.

BRIGÉ, A.; MOTTE B.; BORLOO, J.; BUYSSCHAERT, G.; DEVREESE, B.; JOZEF, J.; BEEUMEN, V. Bacterial decolorization of textile dyes is an extracellular process requiring a multicomponent electron transfer pathway. *Microbial Biotechnology*, v. 1, n. 1, p.40–52, 2008.

CHANG, J.S. e LIN, Y.C. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnology Progress*, v.16, n.6, p. 79-85, 2000.

CHANG, J.S. e LIN, Y.C. Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorization determination from *Rhodococcus* sp. *Biotechnology. Letters.*, v. 23, p. 631-636, 2001.

CHEN, C.H.; CHANG, C.F.; LIU, S.M. Partial degradation mechanisms of malachite Green and methyl Violet B by *Shewanella decolorationis* NTOU1 under anaerobic conditions. *Journal of Hazardous Materials*, v.177, n. 1-3, p.281-289, 2010.

CHEN, C.H.; CHANG, C.F.; HO, C.H.; TSAI, T.L.; LIU, S.M. Biodegradation of crystal violet by *Shewanella* sp. NTOU1. *Chemosphere*, v. 72, n. 11, p.1712-1720, 2008.

CHEN, K.C.; WU, J.Y.; LIOU, D.J.; HWANG, S.J. Decolorization of textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v. 101, n.1, p. 57-68, 2003.

COOPER, P. Removing colour from dye house wastewaters-a critical review of technology available. *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, v. 109, p.97-100, 1993.

DiCHRISTINA, T.J.; FREDRICKSON, J.K.; ZACHARA, J.M. Enzymology of electron transport: energy generation with geochemical consequences. *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, v. 59, p. 27-52, 2005.

Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media. BD. 2003

DSMZ – Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. Disponível em: <<http://www.dsmz.de>>. Acesso em: 30 mai. 2011.

ETAD – Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufacturers. Disponível em <<http://www.etad.com>> Acesso em: 16 fev 2012.

ERKURT, H.A. Biodegradation of azo dyes. The Handbook of Environmental Chemistry, *Springer*, v. 9, 2010.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes Têxteis. *Química Nova*, v.23, n.1, p.71-78, 2000.

ISIK, M.; SPONZA, D.T. Substrate removal kinetics in an upflow anaerobic sludge blanket reactor decolorizing simulated textile wastewater. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3, p. 1189-1193, 2005.

JADHAV, J.P.; PARSHETTI, S.D.; KALME, S.D.; GOVINDWAR, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere*, v. 68, n. 2, p. 394-400, 2007.

JIN, X.; LIU, G.; XU, Z.; YAO, W. Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 74, n.1, p. 239-243, 2007.

KALME, S.D.; PARSHETTI, G.K.; JADHAV, S.U.; GOVINDWAR, S.P. Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 7, p. 1405-1410, 2007.

KALYANI, D.C.; TELKE, A.A.; DHANVE, R.S.; JADHAV, J.P. Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *Journal of Hazardous Materials*, v. 163, n. 2-3, p. 753-742, 2009.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURAN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. *Química Nova*, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.

LI, T.; GUTHRIE J.T. Colour removal from aqueous solutions of metal-complex azo dyes using bacterial cells of *Shewanella* strain J18 143. *Bioresource Technology*, v.101, n. 12, p.4291-4295, 2010.

OLIVEIRA, D.P.; CARNEIRO, P.A.; SAKAGAMI, M.K.; ZANONI, M.V.B.; UMBUZEIRO, G.A. Chemical characterization of a dye processing plant effluent – Identification of the mutagenic components. *Mutation Research*, v. 626, p. 135-142, 2007.

Ozonizando. Ozônio, soluções ecológicas para indústrias e processos. Disponível em <<http://www.ozonizando.com.br/>>. Acesso EM: 15 fev. 2012.

NETO, B.B.; SCARMINO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2007.

PANDEY, A., SINGH, P., IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.96, n. 2, p.73-84, 2007.

PEARCE, C.I., GUTHRIE, J.T., LLOYD, J.R. Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143. *Dyes and Pigments*, v.76, n. 3, p.696-705, 2008.

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, n. 3, p. 179-196, 2003.

RAI, H.; BHATTACHARYYA, J.; SINGH, T.K.; BANSAL, T.K.; VATS, P.; BANERJEE, U.C. Removal of Dyes from the Effluent of Textile and Dyestuff Manufacturing Industry: A Review of Emerging Techniques with Reference to Biological Treatment. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol*, v. 35, n. 3, p. 219, 2005.

SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; PASCHOAL, C.M.R.B.; ALVES, M.N.; FURLAN, E.V.; MARTINS, M.T. Toxicity assessment of industrial effluents from São Paulo State, Brazil, using short-term microbial assays. *Toxicity. Assessment*, v. 3, n.1, p. 55-80, 1988.

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, n. 1, p. 138-157, 2011.

SARAYU, K.; SANDHYA, S. Aerobic biodegradation pathway for remazol orange by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 160, n. 4, p. 1241-1253, 2009.

Silveira, E. Seleção e avaliação de *Pseudomonas* para descoloração de corantes têxteis por cultivo submerso. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SILVEIRA, E.; MARQUES, P.P.; SILVA, S.S.; LIMA-FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F.; TAMBOURGI, E.B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolorization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, n.2, p. 230-235, 2009.

STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 56, n.1, p. 69-80, 2001.

ULSON de SOUZA, S.M.A.G.; FORGIARINI, E.; ULSON de SOUZA, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Harzardous Materials*, v. 147, n.3, p. 1073-1078, 2007.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v. 60, n. 1, p. 55-64, 2005.

VAN der ZEE, F.P.; LETTINGA, G.; FIELD, J.A. Azo dy decolorization by anaerobic granular sludge. *Chemosphere*, v. 44, n. 5, p. 1169-1176, 2001.

WANG, W. Toxicity assessment of pretreated industrial effluent using higher plant. *Res. J. Water Pollut. Control Fed.*, v. 62, n. 7, p. 853-860, 1991.

WONG, Y.; YU, J. Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, v.33, n. 16, p. 3512-3520, 1999.