

USO DE EFLUENTE INDUSTRIAL NO CULTIVO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*: UMA ALTERNATIVA AO MEIO SINTÉTICO E APLICAÇÃO BIORREMEDIADORA

VITÓRIA H. GLENZEL¹; GUSTAVO WALTZER FEHRENBACH²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

¹Universidade Federal de Pelotas – vitoria.glenzel@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – gustavofehrenbach@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram positiva em forma de bastonete, pertencente à família Bacillaceae e formadora de esporos. Possui faixa de temperatura de crescimento entre 10 a 45 °C e comportamento anaeróbio não estrito (Glare; O'Callaghan, 2000).

A principal característica que distingue o *B. thuringiensis* das outras espécies do mesmo gênero é a presença intracelular de cristais proteicos, cuja ação anti inseticida tem sido amplamente utilizada (Salehi Jouzani *et al.*, 2008), sendo considerado o bioinseticida mais bem sucedido do mercado de bioinseticidas, representando 98% do mesmo (Jouzani *et al.*, 2017). Esta bactéria também apresenta uma ampla gama de enzimas que permite sua aplicação em diversos substratos (Glare; O'Callaghan, 2000). Ambos aspectos confirmam o interesse econômico que circunda este microrganismo, motivos pelos quais utilizou-se o *B. thuringiensis* para execução deste trabalho.

Atualmente é evidente os riscos ambientais associados aos resíduos gerados em diferentes setores industriais e a preocupação com a saúde humana e animal (Chen *et al.*, 2015). Os efluentes são resíduos industriais líquidos, gerados de processos de lavagem, descarte de drenos e resíduos. As formas técnicas usuais empregam tratamento químico ou biológico, acarretando em gastos econômicos para a indústria e sociedade, além de não garantir a total remoção dos contaminantes pode acarretar na liberação de materiais tóxicos como subprodutos (Singh *et al.*, 2017). Visto isso, é pertinente a busca por novas formas de tratamento. O uso de microrganismos é uma alternativa de baixo custo e eficaz, realizada na etapa terciária do tratamento, onde se utilizam microrganismos na forma imobilizada e em suspensão para redução de nutrientes em excesso. Diversos estudos demonstraram que cepas de *B. thuringiensis* degradam de forma eficiente poluentes tóxicos, como: metais pesados, efluentes contendo pesticidas e herbicidas, óleos petroquímicos, resíduos orgânicos e químicos (Jouzani *et al.*, 2017). O efluente utilizado neste trabalho apresenta altas concentrações de matéria orgânica, fósforo e nitrogênio (Gil de los Santos, D; Turnes, C.G; Conceição, F.R; 2012), o que impossibilita o simples descarte pós geração.

Com base nisto, este trabalho teve como objetivo explorar o potencial de um efluente agrícola no uso como meio de cultivo para *B. thuringiensis* e tolerância desta bactéria aos elevados níveis de fósforo, reduzindo assim o custo no processo de tratamento, obtenção de biomassa e aplicação biorremediadora.

2. METODOLOGIA

2.1 Coleta de efluente

O efluente utilizado nos cultivos foi coletado da indústria arrozeira no município de Pelotas – RS e armazenado em galão plástico de 20 L, pH 4 a 4°C.

2.2 Meios de cultivo

Bacillus thuringiensis foi cultivado em meio Brain Heart Infusion (BHI) (infusão de sólidos, hidrolisado péptico, hidrolizado pancreático, NaCl, glucose, Na₂HPO₄ e ágar), NYSM (caldo nutriente, extrato de levedura, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂) e efluente. Os meios BHI e NYSM foram preparados em água destilada. Após preparo os meios foram esterilizados em autoclave à 121 °C e pressão de 1 atm por 15 min. A composição do cultivo um (1) foi de 12,5 mL de NYSM / 37,5 mL de efluente, cultivo dois (2) 25 mL NYSM / 25 mL de efluente, cultivo três (3) 50 mL de efluente, cultivo quatro (4) 50 mL de meio NYSM, cultivo cinco (5) 50 mL de Nysm e fortificação de 1% de KH₂PO₄, cultivo seis (6) 50 mL de NYSM e fortificação de 2% de KH₂PO₄, cultivo sete (7) 50 mL de NYSM e fortificação de 5% de KH₂PO₄ e do cultivo oito (8) 50 mL de NYSM fortificado com 10% de KH₂PO₄. Os cultivos 5, 6, 7 e 8 foram fortificados com fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄), da marca Synth. O tempo de incubação foi de 48 h a 28°C e 180 rpm.

2.3 Preparo dos inóculos

A cepa mãe de *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* foi obtida do banco de cepas do Laboratório de Microbiologia – CDTec – UFPEL, mantida a 4°C em meio BHI sólido. Em fluxo laminar previamente sanitizado com álcool 70° e 15 min sob luz ultravioleta, colônias de *B. thuringiensis* foram transferidas com o auxílio de alça de Drigalski para três Erlenmeyer contendo 100 mL de BHI líquido. Os cultivos foram incubados em shaker SI 222 Solab a 28°C e 180 rpm por 24 h. O método de coloração de Gram foi realizado ao início e fim de cada cultivo, a fim de analisar a presença de contaminantes.

2.4 Concentração celular

A concentração celular foi determinada pelo crescimento em placas contendo meio BHI. Para isso, foram retirados 1 mL de amostra dos cultivos no tempo 24 e 48 h. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 5 s e 100 µL foram transferidos para Eppendorf estéril contendo tampão fosfato-salino. Para contagem de colônias, transferiu-se 30 µL das diluições de 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ para as placas de BHI. As placas foram então incubadas a 37°C por 24 h para posterior contagem.

2.5 Análises estatísticas

As contagens em placa foram realizadas em duplicata técnica (n=2), avaliando o desvio padrão e significância através do t test (p < 0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura NYSM é utilizado como padrão para o crescimento de diversas bactérias do gênero *Bacillus*, tal como o *B. thuringiensis*, pois possibilita o crescimento e multiplicação dos mesmos (Poopathi *et al.*, 2013), e devido a isso foi utilizado como controle neste trabalho. As estações de tratamento, através de sucessivas passagens por reações químicas e tratamentos biológicos, reduzem NTK, Fósforo, DBO e DQO (em função da vazão de efluente) aos limites

estabelecidos pela resolução CONSEMA nº129/06, em eficiência de remoção (75%) e concentração. No entanto, a concentração de fósforo no efluente lançado nos corpos hídricos é superior ao equivalente em vazão, pois os tratamentos empregados são ineficazes frente ao nível regulamentado. Dessa forma, o meio de cultivo NYSM foi fortificado com fosfato de sódio anidro, a fim de simular a influência do fósforo no crescimento do *B. thuringiensis* e analisar o uso deste como meio de cultivo ou suplemento. O cultivo de *Bacillus thuringiensis* em efluente apresenta-se como uma alternativa para redução dos custos de produção na matriz arrozeira, não apenas destinando o efluente para um novo processo produtivo, mas reduzindo o custo com compostos químicos e eletricidade na estação de tratamento de efluentes da indústria.

A Figura 1 apresenta o crescimento celular dos cultivos de *B. Thuringiensis* nos tempos de 24 e 48 h.

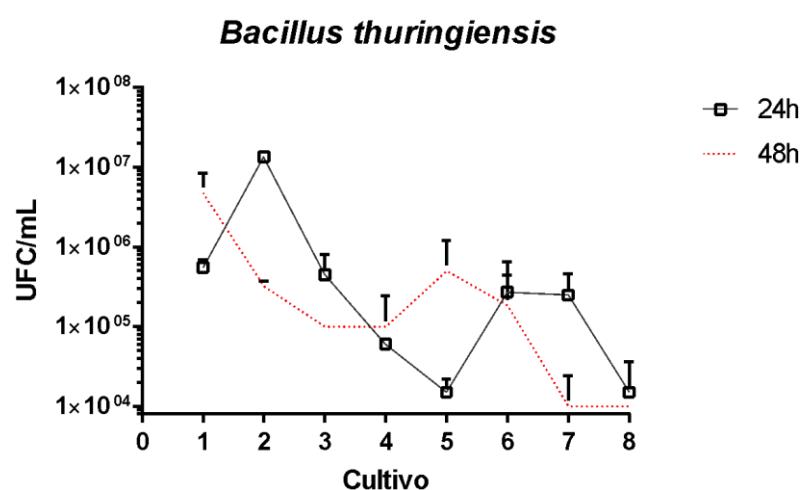


Figura 1

Todos cultivos apresentaram crescimento em 24 e 48 h, exceto o cultivo 6 (50 mL NYSM / 2% KH_2PO_4) que apresentou uma redução de $6,23 \times 10^5$ UFC/mL após 48 h, o que pode ter sido ocasionado por déficit de nutrientes no meio, inibição por metabólitos, erros no procedimento de amostragem e diluição ou viabilidade do inóculo bacteriano. Os resultados apresentados neste trabalho são referentes ao crescimento de *B. thuringiensis* em 24 e 48 h, não apresentando a concentração celular inicial (0 h), visto que os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro a 1,0 ABS e 600 nm, apresentando assim concentrações bacterianas semelhantes. Além disso, o presente trabalho visou verificar o desenvolvimento bacteriano em concentração celular final, ou seja, UFC/mL, pois o efluente utilizado apresenta concentrações médias de fósforo solúvel de 66 mg/L e uma complexa matriz, impondo condições adversas ao crescimento bacteriano. Este fato foi comprovado por Martin (1977), que descreveu em seu trabalho a forma com que as concentrações de fosfato podem ser controladas a fim de alterar a síntese de antibióticos e crescimento celular. Este fato pode ser observado na Figura 1 onde nos cultivos 5, 6, 7, e 8 em concordância com o aumento da concentração de KH_2PO_4 nos meios, houve diminuição na taxa de crescimento dos cultivos após 24 h. Entretanto, o cultivo 1, em meio 12,5 mL NYSM / 37,5 mL efluente, apresentou ótima taxa de crescimento após 24 h, como pode-se observar na Figura 1, em comparação com o cultivo controle 4 (em meio NYSM). Isto demonstra que é possível se obter uma taxa de crescimento celular

em efluente contendo fósforo quando neste estão presentes outros substratos em conjunto com os nutrientes do meio NYSM. Sendo assim, novos estudos serão realizados para analisar a composição adequada e modificações necessárias no meio efluente a fim de obter taxas elevadas de multiplicação celular.o.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir com o presente estudo que o *B. thuringiensis* possui capacidade não só de sobreviver, mas como de se multiplicar em meios de cultivo inicialmente considerados adversos, como efluentes industriais. Demonstrando-se assim a possibilidade de utilização do efluente como meio de cultivo para este microrganismo, com o fim de utilizá-lo como agente remediador em etapa terciária de tratamento de efluentes industriais e obtenção de biomassa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, Z.; CHEN, H.; PAN, X.; LIN, Z.; GUAN, X. Investigation of Methylene Blue Biosorption and Biodegradation by *Bacillus thuringiensis* 016. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 5, 2015.
- GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety*. Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 350.
- JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 101, n. 7, p. 2691-2711, Apr, 2017.
- LOS SANTOS, DIEGO GIL; TURNES, CARLOS GIL; CONCEIÇÃO, FABRICIO ROCEDO, "Bioremediation of Parboiled Rice Effluent Supplemented with Biodiesel-Driven Glycerol Using *Pichia pastoris* x-33", *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 492925, 5 pages, 2012. doi: 10.1100/2012/492925.
- MARTIN J.F., Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv Biochem Eng* 6:105, 1997.
- POOPATHI, S.; MANI, C.; RAJESWAR, G. Potential of sugarcane bagasse (agroindustrial waste) for the production of *Bacillus thuringiensis* israelensis. *Tropical biomedicine*, v. 30, n. 3, p. 504-15, Sep, 2013.
- SALEHI JOUZANI, G.; SEIFINEJAD, A.; SAEEDIZADEH, A.; NAZARIAN, A.; YOUSEFLOO, M.; SOHEILIVAND, S.; MOUSIVAND, M.; JAHANGIRI, R.; YAZDANI, M.; AMIRI, R. M.; AKBARI, S. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. *Can J Microbiol*, v. 54, n. 10, p. 812-22, Oct, 2008.
- SINGH, U.; ARORA, N. K.; SACHAN, P. Simultaneous biodegradation of phenol and cyanide present in coke-oven effluent using immobilized *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas stutzeri*. *Braz J Microbiol*, Sep 04, 2017.