



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA**

**BACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA DESCOLORAÇÃO
DE CORANTES TÊXTEIS**

FÁBIO ROGER VASCONCELOS

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
MAIO / 2010**

BACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

FÁBIO ROGER VASCONCELOS

Dissertação de Mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Pesca da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de Concentração: Recursos Pesqueiros
e Engenharia de Pesca

Orientador: Dra. Regine Helena Silva dos
Fernandes Vieira

**FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
MAIO / 2010**

V45b Vasconcelos, Fábio Roger
Bactérias com potencial biotecnológico na descoloração de corantes têxteis / Fábio Roger Vasconcelos. 2010.

96 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Prof. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.

1. *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophila*. 2. Bidescoloração. 3. Biotecnologia de bactérias. 4. Corante Azo e Antraquinona. 5. Toxicidade de corantes I. Vieira, Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira. II. Universidade Federal do Ceará – Curso de Mestrado em Engenharia de Pesca III. Título.

CDD 660.62

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Fábio Roger Vasconcelos

Dissertação aprovada em 03 de maio de 2010.

Professora Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (UFC)
Orientadora da Dissertação
Presidente

Professora Dra. Norma Suely Evangelista Barreto (UFRB)
Conselheira

Professor Dr. Marcos Carlos de Mattos (UFC)
Conselheiro

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE QUADROS	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. O setor têxtil	4
2.2. O uso da água na indústria têxtil	6
2.3. Processo têxtil	7
2.4. Corantes têxteis	9
2.4.1. Corantes reativos	12
2.4.2. Corante à cuba ou à tina	14
2.4.3. Corantes ao enxofre	15
2.4.4. Corantes dispersos	17
2.4.5. Corantes naturais	17
2.4.6. Corantes ácidos	17
2.4.7. Corantes básicos.....	18
2.4.8. Corantes diretos	18
2.4.9. Corantes mordentes	19
2.5. Toxicologia dos corantes.....	19
2.6. Tratamento de efluentes têxteis	23
2.6.1. Processos físicos	24
2.6.2. Processos químicos	25
2.6.3. Processos biológicos.....	26
2.7. Descoloração de corantes usando bactérias.....	27
2.8. Gênero <i>Aeromonas</i>	29
2.9. Gênero <i>Escherichia</i>	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Local.....	32
3.2. Materiais.....	32
3.2.1. Isolamento dos microrganismos	32
✓ <i>Escherichia coli</i>	32
✓ <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
3.2.2. Corantes.....	34
3.2.3. Meios de cultivo.....	34

3.3.	Métodos.....	35
3.3.1.	Ensaio biológico.....	35
3.3.2.	Ensaio de descoloração	36
3.4.	Testes analíticos	37
3.4.1.	Potencial hidrogeniônico (pH)	37
3.4.2.	Demanda química de oxigênio (DQO)	37
3.4.3.	Análise da biomassa	38
3.4.4.	Determinação de proteínas totais.....	38
3.4.5.	Efeito da toxicidade dos metabólitos formados	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1.	Análise da eficiência de descoloração	41
4.2.	Análise do pH, biomassa, DQO e produção de proteínas totais	53
4.3.	Toxicidade dos metabólitos formados no processo de descoloração	58
5.	CONCLUSÕES	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

%DES	Eficiência de Descoloração
°C	Graus Celsius
ABIQUIM	Associação Brasileira da Indústria Química
ABIT	Associação Brasileira da Indústria Têxtil
ABS	Absorbância
AhEP	<i>Aeromonas hydrophila</i> isolada do Efluente Petroquímico
AM	Ambiente Marinho
BOD	Biological Oxygen Demand
C.I.	Color Index
CH ₄	Gás Metano
CL ₅₀	Concentração Letal para 50% da população
CO ₂	Dióxido de Carbono
COT	Carbono orgânico total
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EcAM	<i>Escherichia coli</i> isolada do Ambiente Marinho
EcET	<i>Escherichia coli</i> isolada do Efluente Têxtil
EMB	Eosin Methylene Blue Agar
EP	Efluente Petroquímico
ET	Efluente Têxtil

ETAD	Ecological and Toxicological Association of the Dyestuff Manufacturing
ETE	Estação de Tratamento de Efluentes
FDA	Food and Drug Administration
g L ⁻¹	Gramas por litro
g/dL	Gramas por decilitro
H ₂ S	Gás Sulfídrico
HPR	Enzima peroxidase
IARC	International Agency for Research on Cancer
L Kg ⁻¹	Litros por Kilograma
LB	Luria Bertani
m ³ ton ⁻¹	Metros cúbicos por ano
mg g ⁻¹	Micrograma por grama
mg L ⁻¹	Micrograma por Litro
mgO ₂ L ⁻¹	Micrograma de Oxigênio por Litro
mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
NR	Não Realizado
O/F	Oxidação/Fermentação
OG	Orange G
-OH	Radical hidroxila
OII	Orange II
PCA	Agar Padrão para Contagem
pH	Potencial hidrogeniônico

PIB	Produto Interno Bruto
POA	Processos Oxidativos Avançados
PPM	Partes por milhão
PVC	Policloreto de Vinila
RBBR	Remazol Brilliant Blue R
rev L ⁻¹	Revertentes por Litro
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Society of Dyes and Colourist
SEBRAE	Agência de Apoio ao Empreendedor e Pequeno Empresário
ST	Sólidos Totais
ton./ano	Toneladas por ano
TSA	Trypticase Soy Agar
ug L ⁻¹	Microgramas por Litro
UV/VIS	Ultravioleta visível
v v ⁻¹	Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exportações e importações dos produtos têxteis comercializados no período de 2000 a 2008 (ABIT, 2008).....	5
Figura 2. Fluxograma das etapas de uma indústria têxtil para a produção de tecido (modificado) (BRAILE; CAVALCANTE, 1993).....	8
Figura 3. Estruturas moleculares identificadas da Mauveína. (OLIVEIRA; SZCZERBOWSKI, 2009).....	10
Figura 4. Exemplo do processo de tintura de algodão com um corante reativo. (FRANCISCON, 2005).....	13
Figura 5. Representação das unidades que compõem as estruturas dos corantes reativos. (A) grupo reativo Triazina, (B) grupo reativo vinilsulfona e (C) Preto Reativo 5. (GRINEVICIUS, 2006).....	14
Figura 6. Processo de redução do corante à cuba com ditionito de sódio (GUARANTINI; ZANONI, 2000).....	15
Figura 7. Exemplo da reação de corantes contendo grupo tiosulfato com íon sulfeto e subsequente formação dos corantes com pontes dissulfeto (GUARANTINI; ZANONI, 2000).....	16
Figura 8. Exemplo da redução de um azo corante banido (ácido preto 077) que após redução forma uma amina carcinogênica (benzidina) (modificado de AHLSTROM; ESKILSSON; BJORKLUND, 2005).....	22
Figura 9. (A) Corante Orange G (C. I. 16230); (B) Corante Orange II (C. I. 15510); (C) Corante Remazol Brilliant Blue R (C. I. 61200).....	35
Figura 10. Esquema geral do procedimento experimental efetuado com as bactérias <i>Escherichia coli</i> e <i>Aeromonas hydrophila</i> frente aos corantes Remazol Brilliant Blue R, Orange G e Orange II.....	40
Figura 11. Biomassa colorida das cepas de <i>Escherichia coli</i> AM e <i>Escherichia coli</i> ET. Controle sem corante (A), Ensaio com RBBR (B), Orange G (C) e Orange II (D).....	45
Figura 12. Percentual da CL ₅₀ usando <i>Artemia salina</i> após o processo de descoloração dos corantes RBBR, Orange G e Orange II utilizando <i>Escherichia coli</i> (AM e ET), <i>Aeromonas hydrophila</i> (EP) e o consórcio das bactérias.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual de descoloração da bactéria <i>Escherichia coli</i> AM frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II, usando diferentes concentrações do corante.....	43
Tabela 2 - Percentual de descoloração da bactéria <i>Escherichia coli</i> ET frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II, usando diferentes concentrações do corante.....	44
Tabela 3 - Percentual de descoloração da bactéria <i>Aeromonas hydrophila</i> EP frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II, usando diferentes concentrações.....	49
Tabela 4 - Percentual de descoloração do consórcio frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II, usando diferentes concentrações.....	52
Tabela 5 - Resultados do pH, DQO e biomassa no processo de descoloração com as bactérias <i>Escherichia coli</i> (AM e ET), <i>Aeromonas hydrophila</i> (EP) e o consórcio frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II.....	55
Tabela 6 – Percentual de proteína total no líquido metabólico após o processo de descoloração usando os microrganismos <i>Escherichia coli</i> (AM e ET) e <i>Aeromonas hydrophila</i> (EP) e do consórcio frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classes de corantes com os respectivos grupos de aplicação.....	12
Quadro 2. Parâmetros físico-químicos de alguns efluentes líquidos têxteis.....	23

RESUMO

A descarga de efluentes das indústrias têxteis para corpos aquosos é, correntemente, uma das maiores preocupações dos ambientalistas em função dos corantes sintéticos usados para colorir os tecidos poluindo assim o ambiente. A aplicação de tratamentos biológicos, sobretudo com a utilização de bactérias, apresenta-se como um dos mais viáveis economicamente, sendo um dos sistemas mais utilizados para descolorir efluentes coloridos. Neste sentido, estudos foram realizados testes para a remoção de cor dos corantes Remazol Brilliant Blue R, Orange G e Orange II utilizando cepas de *Escherichia coli* e de *Aeromonas hydrophila*, isoladas e em cultura mista. Primeiramente foi feito o isolamento das cepas bacterianas de três ambientes diferentes. Em seguida, foram feitos testes para verificar qual concentração do corante seria limite para o crescimento de cada microrganismo. Além dos testes de descoloração também foram monitorados outros parâmetros como o pH, biomassa, remoção de DQO, proteínas totais e toxicidade dos metabólitos formados. A cepa *Escherichia coli*, isolada do ambiente marinho, foi capaz de descolorir concentrações de 2, 5 e 2 mg L⁻¹, respectivamente, para os corante RBBR, Orange G e Orange II, enquanto que a cepa *E. coli*, isolada do efluente têxtil, descoloriu nas concentrações de 5, 0,5 e 5 mg L⁻¹, respectivamente. A bactéria *Aeromonas hydrophila* descoloriu respectivamente nas concentrações de 10, 5 e 5 mg L⁻¹, enquanto que o consórcio das três bactérias descoloriu na concentração de 5 mg L⁻¹ para os três corantes testados individualmente. Nessas condições de cultivo a diminuição na taxa de DQO variou entre 45 e 69%, com a menor taxa observada no ensaio contendo *A. hydrophila* e o corante Orange II (45%) e a maior taxa de remoção no ensaio contendo o consórcio e o corante RBBR (69%). Bioensaios utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* mostraram que durante o processo de descoloração foram produzidos metabólitos com características recalcitrantes. Os resultados demonstram que as bactérias *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophila* apresentam potencial biotecnológico na descoloração de corantes têxteis, desde que sejam utilizadas baixas concentrações dos corantes.

Palavras-chave: *Escherichia coli* e *Aeromonas hydrophila*; Biodescoloração; Biotecnologia de bactérias; Corante Azo e Antraquinona; Toxicidade de corantes

ABSTRACT

The discharge of effluents from textile industries for water bodies is currently a major concern for environmentalists as a function of synthetic dyes used to color fabrics thus polluting the environment. Biological treatments, especially with the use of bacteria, present themselves as the most economically viable and widely used to decolorize colored effluents. Thus, studies were conducted to test the color removal of dyes Remazol Brilliant Blue R, Orange G and Orange II using isolated and in mixed culture strains of *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila*. Firstly, the isolation of bacterial strains from three different environments was made. Then, tests were performed to verify that the dye concentration would limit the growth of each microorganism. In addition to tests of decolorization, other parameters such as pH, biomass, COD removal, total protein and toxicity of metabolites were also monitored. The *Escherichia coli* strain isolated from the marine environment was able to decolorize concentrations of 2, 5 and 2 mg L⁻¹, respectively, for the RBBR dye, Orange G and Orange II dyes, while the strain *E. coli* isolated from textile effluent, decolorized in concentrations of 5, 0.5 and 5 mg L⁻¹, respectively. The bacteria *Aeromonas hydrophila* decolorized, respectively, at 10, 5 and 5 mg L⁻¹, while the consortium of three bacteria decolorized at concentration of 5 mg L⁻¹ for the three dyes tested individually. In these culture conditions the decrease in the rate of COD ranged from 45% to 69% with the lowest rate observed in the assay containing *A. hydrophila* and dye Orange II (45%) and the highest removal rate in the test containing the dye RBBR and the consortium (69%). Bioassays using *Artemia salina* showed that during the process of decolorization metabolites were produced with recalcitrant characteristics. The results show that the bacteria *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila* have biotechnological potential in textile dyes, provided that they use low dye concentrations decolorizing.

Key words: *Escherichia coli* and *Aeromonas hydrophila*; Biodecolorization; Biotechnology bacteria; Azo dyes and Antraquinone; Toxicity of dyes

BACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA DESCOLORAÇÃO DE CORANTES TÊXTEIS

Fábio Roger Vasconcelos

1. INTRODUÇÃO

O ser humano tem como característica principal fazer uso das forças da natureza, como a energia solar, forças dos ventos, e os materiais providos do meio ambiente, em benefício próprio. Devido o rápido crescimento da população em todo o mundo, houve a necessidade de aumentar essa produção (FRANCISCON, 2005).

Com essa demanda foi inevitável o crescimento industrial para suprir as necessidades do ser humano. O crescimento industrial embora tenha contribuído para o desenvolvimento econômico e social, também foi responsável pelo aumento dos problemas ambientais, tornando-os cada vez mais críticos e freqüentes, principalmente porque as indústrias foram surgindo de forma desordenada, comprometendo a qualidade do solo, ar e água (COTTA; REZENDE; PIOVANI, 2006). A forma de eliminar as substâncias tóxicas é um dos assuntos mais trabalhados atualmente, o que tem levado os pesquisadores a buscarem novas técnicas e ferramentas mais poderosas que possa diminuir e/ou eliminar a toxicidade dos efluentes líquidos e gasosos formados em seus distintos processos, deixando-os dentro das regulamentações e legislações voltadas à proteção ambiental (FORGIARINI, 2006).

Dentre as diversas indústrias existentes, o setor têxtil tem gerado bastante preocupação, com relação ao lançamento de seus efluentes nos corpos d'água, devido à utilização de corantes sintéticos para tingir seus tecidos. O setor têxtil é atualmente responsável por grande parte da economia

dos países desenvolvidos e uma das principais atividades econômicas de alguns países emergentes. A indústria têxtil consome, atualmente, 15% de toda a água destinada à indústria brasileira, sendo que as etapas de lavagem e tingimento são as que mais consomem água no processamento têxtil. Os efluentes líquidos gerados no processamento das indústrias têxteis constituem uma vasta variedade de componentes, como corantes, aditivos, elevada carga orgânica e forte coloração, que podem causar danos ao meio ambiente se não forem adequadamente tratados (VIEIRA, 2008).

Em geral, nas indústrias têxteis, os processos de tratamento de seus efluentes estão baseados nas operações de sistemas físico-químicos de precipitação-coagulação, seguidos por tratamentos biológicos com sistema de lodos ativados. O sistema apresenta uma eficiência de tratamento relativamente alta, variando entre 85 e 95%, permitindo uma boa remoção da carga de corantes (VON SPERLING, 1997). Entretanto, o problema relacionado com o acúmulo de lodo torna-se crítico, uma vez que o teor de corantes adsorvido é bastante elevado, impedindo qualquer possibilidade de reaproveitamento (FRANCISCON, 2005). Por todos estes motivos, são estudadas novas alternativas utilizando microrganismos capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional para o adequado tratamento de efluentes têxteis. Na prática, sabe-se que esse tratamento é muito difícil principalmente em função da diversidade, concentração e composição de substâncias químicas presentes em cada efluente (KUNZ *et al.*, 2002).

A utilização de microrganismos é largamente conhecida no processo de tratamento de efluentes. Este processo apresenta-se como um dos mais viáveis economicamente, e por isso, é um dos mais utilizados, tornando o estudo bastante interessante principalmente pela facilidade de trabalho (VIEIRA, 2008).

Baseado nas informações sobre o potencial biotecnológico das bactérias em descolorir alguns corantes, este trabalho teve os seguintes objetivos:

- Avaliar a capacidade de descoloração de duas estirpes de *Escherichia coli* e uma de *Aeromonas hydrophila*, isoladamente e em consórcio, frente ao corante antraquinono Remazol Brilliant Blue R e os azo corantes Orange II e Orange G.

- Usar diferentes concentrações dos corantes para testar a concentração máxima tolerada de cada microrganismo e seu consórcio.
- Avaliar o potencial tóxico dos metabólitos formados durante o processo de descoloração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O SETOR TÊXTIL

O setor têxtil na área industrial é um dos setores mais antigos do mundo, sendo um dos precursores ao período da Revolução Industrial no final do século XVIII. Com o desenvolvimento da indústria química várias mudanças significativas ocorreram tanto no âmbito produtivo quanto comercial. Isso ocorreu principalmente devido à incorporação de novos métodos de produção de compostos sintéticos e novas tecnologias no processo produtivo (COSTA, 2008).

O Brasil iniciou o processo de industrialização têxtil no final do século XIX. Esse ramo teve um importante papel no desenvolvimento da política industrial nacional, sendo atualmente composto em sua maioria por empresas de pequeno e médio porte (COSTA, 2008). As empresas que compõem esse setor estão distribuídas por todo país, destacando as regiões sul (Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e nordeste (Pernambuco, Bahia e Ceará), produzindo R\$ 32,9 bilhões, equivalendo a 4,1% do PIB total brasileiro (SEBRAE, 2009).

Atualmente, o Brasil é o sexto produtor mundial de têxteis e confeccionados, respondendo por cerca de 2,5% da produção nacional em 2006. Contudo, no que tange ao comércio mundial, encontra-se na 46ª posição entre os maiores países exportadores e na 43ª entre os maiores importadores. Se considerarmos apenas o segmento vestuário, o mais dinâmico do comércio mundial da cadeia têxtil e de confecções, o país cai para a 69ª posição entre os países exportadores e a 51ª posição entre os importadores (COSTA; ROCHA, 2009).

Para Rangel (2008) o Brasil é um país “produtor/consumidor”, cuja maior parte da produção se destina ao mercado interno. Ainda segundo o autor, o desempenho das importações e exportações brasileiras obedeceu ao

comportamento da taxa de câmbio e da grande expansão do comércio internacional na última década. Entretanto, as importações nesse período tiveram um declínio entre 2000 a 2002, reagindo conforme a valorização cambial iniciada em 2004 (Figura 1):

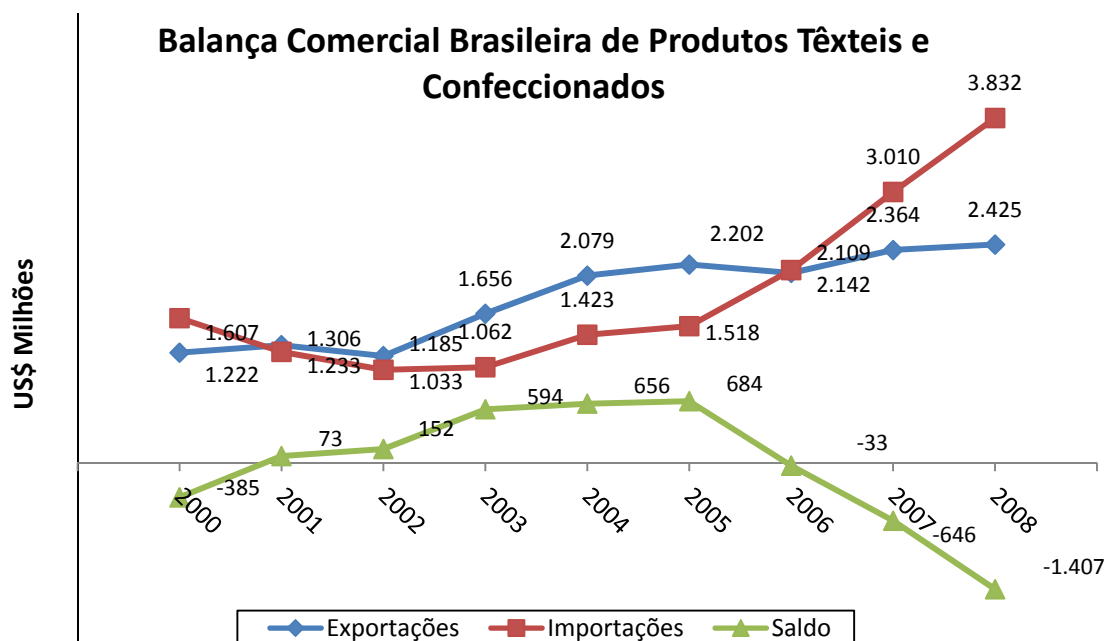


Figura 1. Exportações e importações dos produtos têxteis comercializados no período de 2000 a 2008 (ABIT, 2008).

Após cinco anos de superávits, a balança brasileira apresentou déficits em 2006 a 2008. Costa e Rocha (2009) justificam esses déficits em função da manutenção da valorização do Real e do fim do Acordo de Têxteis e Vestuários em 2005, quando foram abolidas restrições quantitativas às importações de artigos têxteis e de confecção.

2.2. O USO DA ÁGUA NA INDÚSTRIA TÊXTIL

De toda a água disponível para o consumo mundial, cerca de 88% é utilizada na agricultura. A indústria é responsável por apenas 7%, ficando os 5% restantes para o uso doméstico. Na indústria, o setor têxtil consome cerca de 15% da água, devolvendo-a depois dos processos têxteis de produção extremamente poluída (PERES; ABRAHÃO, 1998). Essa água é utilizada como meio solvente para diversos produtos químicos que entram nos processos têxteis como, por exemplo, as lavagens, o branqueamento e o tingimento dos fios e tecidos.

Os problemas ambientais provocados pela indústria têxtil são bem documentados, sendo estes associados a problemas como o elevado volume de resíduos sólidos e líquido, à sua elevada carga orgânica, a fatores físico-químicos do efluente e problemas relacionados com a liberação de corantes que não foram fixados no processamento ou ainda aqueles que não foram removidos pelo tratamento convencional. O corante tem um elevado potencial de impacto ambiental por que ele interfere nos processos fotossintéticos, além de muitos deles terem características mutagênicas (KUNZ *et al.*, 2002; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2002).

Peres; Abrahão (1998) citam que a maior parte da carga contaminante é constituída por impurezas inerentes à matéria-prima, produtos adicionados para facilitar os processos de fiação e tecelagem, auxiliares e corantes eliminados durante as diferentes etapas de acabamento. A qualidade e a quantidade da carga poluente se encontram intimamente relacionadas com as fibras utilizadas na elaboração dos tecidos, sejam naturais ou sintéticos.

A quantidade do consumo de água pela indústria têxtil depende diretamente da matéria prima a ser processada. Alguns processos, como o tingimento dos fios, alvejamento e lavagens geram um grande volume de água, de modo que, ao ser emitido para o efluente, carrega bastante poluente, dentre os quais se destacam os corantes (CAMMAROTA; COELHO, 2001).

2.3. PROCESSO TÊXTIL

Segundo Araújo; Castro (1984) e Guaratini; Zanoni (2000) as fibras têxteis são estruturas filiformes que possuem flexibilidade, espessura e um grande comprimento em relação à dimensão transversal máxima da fibra. Essas fibras podem ter várias origens, sendo este o critério usado para sua classificação. Por exemplo: de origem vegetal (algodão, linho), animal (lã, seda), mineral (asbesto) e sintéticas (poliéster, polimida).

O processo têxtil de produção de tecidos é dividido em três etapas: fiação, onde a matéria prima é processada de modo a formar os fios que serão enviados para a tecelagem (segunda etapa) onde serão transformados em tecidos nos teares. Em seguida, são enviados para o acabamento para retirar as imperfeições (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Forgiarine (2006) cita que os estágios de formação do tecido pouco contribuem para a geração de efluentes líquidos coloridos, quando comparados às operações do estágio de processos molhados ou acabamento, sendo que essas operações podem ser divididas em:

Tratamento prévio ou preparação: conjunto de operações necessárias para preparar o material têxtil a ser tingido, estampado ou receber um dado acabamento, sendo que essas operações são, por vezes, designadas apenas por alvejamento;

Tingimento: operação de coloração uniforme do material têxtil;

Estamparia: aplicação de um desenho colorido no material têxtil;

Acabamento: efetuado sobre o tecido alvejado, tingido ou estampado, conforme o caso, de forma a torná-lo mais adequado para sua aplicação.

Muitas dessas operações podem ser efetuadas não só nas fibras e nos fios, mas também após a confecção. Nas fases de acabamento têxtil são utilizadas, além do substrato têxtil (fios, fibra, tecidos ou confecções), diversas substâncias como a água, resinas, corantes, tensoativos, dentre outros (ABRAHÃO; SILVA, 2002). Essa etapa visa o aumento da resistência mecânica dos fios, remoção de impurezas, clareamento, etc. (FURLAN, 2008).

A Figura 2 mostra as etapas do processo úmido no tingimento de tecido de algodão. Os efluentes líquidos gerados no processo de tingimento variam muito em função da diversidade de técnicas, máquinas, matérias-primas e tecidos, empregados nos diferentes processos têxteis.

Figura 2. Fluxograma das etapas de uma indústria têxtil para a produção de tecido (modificado) (BRAILE; CAVALCANTE, 1993).

2.7. DESCOLORAÇÃO DE CORANTES USANDO BACTÉRIAS

Em sistemas aeróbios a degradação de corantes é usualmente feita por bactérias, como no sistema de lodo ativado, porém esse sistema apresenta baixa eficiência de degradação desses compostos (FU; VIRARAGHAVAN, 2001) devido a falta de isolamento de bactérias com capacidade de metabolização das moléculas de corantes (SHAUL *et al.*, 1991), embora ensaios de descoloração tenham sido relatados na literatura usando algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Sphingomonas* (COUGHLIN; KINKLE; BISHOP, 1999; SARNAIK; KANEKAR, 1999).

O uso de microrganismos na biodegradação de corantes sintéticos tem se tornado atrativo por ser de metodologia simples e econômica, embora os mecanismos biológicos tendem a ser complexos. Um grande número de espécies microbianas foi testada por Forgacs; Cserhádi; Oros (2004) na descoloração e mineralização de diversos corantes e mostrou que infelizmente a maioria desses compostos são quimicamente estáveis e resistentes ao ataque microbiológico (FORGIARINI, 2006). Entretanto, Chen *et al.* (2003) ao estudarem a descoloração de corantes têxteis usando bactérias isoladas de um efluente têxtil que continha 24 diferentes tipos de corantes de três classes diferentes (azo, antraquinona e índigo) encontraram elevado potencial de descoloração para algumas das cepas isoladas.

A eficiência do processo de descoloração depende da adaptação do microrganismo selecionado. Segundo Banat *et al.* (1996) dentre os microrganismos relacionados com a descoloração de corantes têxteis encontram-se as bactérias, fungos, algas e mais recentemente, os consórcios microbianos. A dificuldade na remoção desses poluentes encontra-se no isolamento de microrganismos, período de adaptação e a capacidade de descolorir diversas estruturas.

Para Walker; Wetherley (2000) o emprego de bactérias aeróbias como *Bacillus gordonae*, *Bacillus benzeovorans* e *Pseudomonas putida*, apresentaram bons resultados na descoloração do corante ácido antraquinona Tectilon Blue usado no tingimento de carpetes. Da descoloração total, 19%

ocorreram por bioadsorção do corante à biomassa bacteriana. Os autores observaram, ainda, que apesar das cepas de *Bacillus* promover a bioadsorção dos corantes, o processo de degradação foi mais rápido do que usando *P. putida*.

Em outro estudo a degradação do azo corante Acid Red 151 usando inóculo de lodo ativado de uma estação de tratamento de efluente municipal foi observada utilizando um biofiltro seqüencial descontínuo aerado recheado com rochas porosas vulcânicas. A eficiência de remoção de cor variou entre 60 e 99%, com valor médio de 87,6% (BUITRON; QUEZADA; MORENO, 2004). Além da degradação aeróbica, os autores sugerem degradação anaeróbia no interior do material poroso.

Khehra *et al.* (2005) observaram degradação de vários corantes do grupo azo com porcentagens variando de 78 a 100% ao usar um consórcio de bactérias anaeróbicas composto por *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* e *Bacillus cereus*.

Manu; Chaudhari (2003) estudaram a degradação do corante índigo em bioreator anaeróbico na concentração de 100 mg L⁻¹ na presença de dextrose, e obtiveram descoloração acima de 95%. Ao passo, que, os corantes Reactive Red 141 e Reactive Blue 13 obtiveram uma descoloração de 98 e 96%, respectivamente.

Para Supaka *et al.* (2004) a degradação dos corantes Remazol Brilliant Orange 3R, Remazol Black B e Remazol Brilliant Violet em sistema anaeróbico-aeróbico apresentou descoloração de 100, 78,2 e 100% respectivamente, com formação de aminas na fase anaeróbica, mas que foi totalmente eliminada quando o sistema recebeu aeração mecânica.

Sponza; Isik (2005a) observaram a formação de benzidina na biodegradação do azo corante Direct Red 28 em sistema anaeróbico-aeróbico. Após a etapa de aerobiose a benzidina foi eliminada, reduzindo a toxicidade no final do processo. Os autores também verificaram a formação deste metabólito em outro trabalho, na degradação do corante Direct Black 38, e constataram a eliminação deste metabólito em sistema aeróbico (ISIK; SPONZA, 2004).

2.8. GÊNERO *AEROMONAS*

O gênero *Aeromonas* (do grego aer-aire = ar ou gás e monas = unidade, portanto, unidade produtora de gás) é constituído de bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, monotríquias, que ocorrem de forma autóctone em ambientes aquáticos (água doce, costeira, salobras, esgotos, etc.) (ISONHOOD *et al.*, 2002; MAALEJ *et al.*, 2003). A morfologia celular das espécies de *Aeromonas* é muito variável. Os bacilos podem variar desde formatos cocóides até formas finas e filamentosas. Em geral, as células se descrevem como retas e de forma bacilar com extremidades arredondadas, apresentando-se isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (ICMSF, 1998; ISONHOOD *et al.*, 2002).

Esse gênero foi proposto pela primeira vez por Kluyver; Van Niel em 1936 para enquadrar as bactérias de forma bacilar que possuíam propriedades semelhantes às Enterobacteriaceae, porém móveis por meio de um flagelo polar (POPOFF, 1984).

Embora historicamente o gênero *Aeromonas* tenha sido colocado na família Vibrionaceae (POPOFF, 1984) após inúmeros estudos baseados principalmente em dados sobre a hibridização RNA-DNA, análises seqüenciais 5SrRNA, catalogação de 16RNA e diferenças imunológicas, observou-se que as bactérias que atualmente compreendem o gênero *Aeromonas* são suficientemente distintas dos membros da família Enterobacteriaceae e Vibrionaceae, garantindo a sua classificação em um grupo diferente. Colwell; MacDonell; De Ley (1986), então, sugeriram a criação de uma nova família, a Aeromonadaceae, para enquadrar essas bactérias (ALTWEGG; LUTHY-HOTTENSTEIN, 1991; KAMPFER; ALTWEGG, 1992).

Desde os primeiros estudos de hibridização RNA-DNA em *Aeromonas* (POPOFF *et al.*, 1981) e da descrição do gênero com quatro fenoespécies (*A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* e *A. sobria*) no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (POPOFF, 1984) foram identificadas novas estirpes, totalizando atualmente 38 espécies, incluindo subespécies no gênero *Aeromonas* (DSMZ, 2010).

Diversos autores relatam a habilidade das bactérias do gênero *Aeromonas* em processos de biorremediação, como a capacidade de descolorir e metabolizar alguns corantes (MCMULLAN *et al.*, 2001; STOLZ, 2001; DAVIS, *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2008). Um consórcio de bactérias isoladas de uma estação de tratamento de águas residuais (*A. hydrophila*, *Comamonas testosteroni* e *Acinetobacter baumannii*) foi imobilizado em esferas de PVC e utilizadas em um reator para a descoloração do azo corante reativo RED RBN (Everlight Chemical Industrial Co.) (Taoyuan, Taiwan) (WU *et al.*, 2005). Chen *et al.* (2008) estudando o potencial de cepas isoladas das águas da planície de Lanyang no nordeste de Taiwan identificaram cepas de *Aeromonas* capazes de descolorir o corante vermelho reativo 141.

Hsueh; Chen; Yen (2009) realizando um estudo comparativo de como a estrutura molecular do corante poderia interferir no processo de descoloração com a bactéria *A. hydrophila* usaram sete corantes do tipo azo (Reactive Black 5, Reactive Blue 171, Reactive Green 19, Reactive Red 198, Reactive Red 141, Direct Yellow 86 e Reactive Yellow 84). Os autores constataram que a taxa de descoloração dos corantes que continha naftol com grupo hidroxila era mais rápida do que aqueles que não apresentavam essa estrutura, exceto para o corante Reactive Green 19, verificando ainda que a posição dos substituintes nos anéis aromáticos era importante, apresentando taxas de descoloração que seguiam a seguinte ordem estrutural dos substituintes: *para*>*orto*>*meta*.

2.9. GÊNERO *ESCHERICHIA*

O nome deste gênero de bactérias provém do seu descobridor Theodor Escherich, médico austríaco que viveu nos finais do século XIX. Dentro deste gênero, a bactéria *Escherichia coli* foi e é muito estudada enquanto modelo geral para os mecanismos biológicos das bactérias (FENG; WEAGANT; GRANT, 2002).

O gênero *Escherichia* compreende sete espécies: *Escherichia adecarboxylata*, *E. albertii*, *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E.*

vulneris (DSMZ, 2010). São bactérias da família Enterobacteriaceae, Gram-negativas não esporuladas, formato de bastonete delgado, variando entre 1,1-1,5 µm x 2,6-6,0 µm. Quando móveis possuem flagelos peritríquios, são anaeróbias facultativas, agrupadas aos pares, isolados ou formando cadeias. São oxidase negativa e catalase positiva. Geralmente não produzem H₂S e não hidrolisam a uréia (BARNES; VAILLANCOURT; GROSS, 2003). Lautrop; Orskov; Gaarslev (1971) e Layne *et al.* (1971) relataram a ocorrência de cepas de *E. coli* H₂S positivas cujo comportamento fenotípico era mediado por plasmídeo. Fermentam a glicose e lactose com produção de ácidos láctico, acético e fórmico, sendo que o ácido fórmico é hidrolisado a hidrogênio e dióxido de carbono. As principais fontes de carbono são o acetato e a glicose que são utilizadas para o crescimento, porém o citrato não é utilizado como fonte de carbono (ACHA; SZYFRES, 2001; BETTELHEIM, 2005).

Al-Hadhrami *et al.* (1995) estudaram a distribuição de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos isoladas das areias do Golfo de Omán e citaram a *Escherichia coli* bem adaptada ao ambiente, auxiliando no processo de biodegradação. Rau; Stolz (2003) identificaram uma enzima nitroredutase, localizada no citoplasma de *E. coli* capaz de reduzir corantes do tipo azo.

Isik; Sponza (2003) avaliando o potencial de descoloração de *E. coli*, frente aos corantes Vermelho Congo e Direto Preto 38 constataram a formação da amina aromática benzina após a degradação anaeróbica do corante Preto Direto 38 e ausente no processo aeróbico. Os autores também observaram redução significativa da DQO e DBO durante o processo de degradação. Em outro trabalho, Chen; Chang (2007) confirmaram o mutualismo entre culturas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas luteola*, cujo consórcio de bactérias atuou descolorindo o azo corante Vermelho Reativo 22.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCAL

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, no Instituto de Ciências do Mar, na Universidade Federal do Ceará.

3.2. MATERIAIS

3.2.1. ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

✓ *Escherichia coli*

O isolamento das cepas de *Escherichia coli* foi realizado segundo o Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2002) usando o método de colimetria. Foram coletados aproximadamente 800 mL do efluente, na canoleta de abastecimento da ETE de uma indústria têxtil, localizada na região metropolitana de Fortaleza (Ceará) em uma garrafa de cor âmbar esterilizada. Do mesmo modo foi realizada uma coleta de água na praia do Mucuripe, em frente ao riacho Maceió, a uma profundidade de ± 1 m. No laboratório, as garrafas foram agitadas a fim de homogeneizar o material contido na água e proceder uma série de diluições das amostras (10^{-1} até 10^{-4}). Após a etapa de diluição, uma alíquota de 1 mL foi adicionado em caldo Lauril Triptose contendo tubo de Durhan invertido e, posteriormente, incubados em estufa bacteriológica

a 35°C por 48 h. A positividade dos tubos era observada pela turvação e produção de gás no tubo de Durham.

Em seguida um inóculo dos tubos positivos foi transferido para tubos contendo caldo EC e incubados a 45°C em banho-maria por 24 horas. Decorrido esse período os tubos de EC positivos foram semeados em placas de Petri contendo o meio Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias características de *E. coli*, isto é, com diâmetro de 2 a 5 mm, centro negro, com ou sem brilho metálico esverdeado, foram então isoladas em tubos de ensaio contendo Agar Triptose Soja (TSA) inclinado. Os tubos de TSA foram incubados em estufa a 35°C por 24 horas e após esse período, as cepas isoladas foram identificadas em microscópio através de sua morfologia e os testes bioquímicos do IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato) segundo FENG *et al.* (2001). As estirpes que apresentaram, nas provas bioquímicas, características como ++ -- ou - + - - foram classificadas como *E. coli*.

✓ ***Aeromonas hydrophila***

O isolamento de *Aeromonas hydrophila* foi realizado a partir de um efluente de uma refinaria de petróleo localizada em Fortaleza (Ceará). A amostra de água residuária foi coletada em garrafa âmbar esterilizada no poço de sucção localizado após o separador água-óleo e imediatamente antes do tratamento secundário da refinaria. No laboratório a amostra foi homogeneizada e em seguida inoculado 1 mL da amostra em tubos contendo 9 mL do meio de cultura mineral Bushneel Hass adicionado de glicerol (2%) como fonte de carbono, e incubadas a 37°C por 24h.

Em seguida, alíquotas dos tubos que apresentaram turvação foram estriadas em placas de Petri contendo Agar Padrão para Contagem (PCA) e incubadas a 35°C por 24 h. As colônias morfologicamente diferentes foram transferidas para tubos de ensaio contendo TSA e incubados a 35°C por 24 h.

Decorrido esse período, foi realizada a caracterização morfológica por microscopia, utilizando o método de Gram. As cepas que apresentaram características Gram negativa foram utilizadas no teste de oxidação e fermentação (O/F) da glicose (MAHON; MANUSELIS, 1995). As cepas não pertencentes à família das Enterobacteriaceae foram submetidas ao processo de identificação utilizando-se o Kit API 20NE da BioMérieux.

Os microrganismos usados na realização deste trabalho foram identificados como: *Escherichia coli* isolada de ambiente marinho, *Escherichia coli* isolada de efluente têxtil e *Aeromonas hydrophila* isolada de uma estação de tratamento petroquímico. Os microrganismos eram mantidos em Agar TSA inclinado e mantidos em BOD sob refrigeração a 15°C.

3.2.2. CORANTES

Os corantes do tipo azo reativo Orange II (C.I. 15510) e Orange G (C.I. 16230) e o corante do tipo antraquinona Remazol Brilliant Blue R (C.I. 61200) (Figura 9) foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). Inicialmente foi preparada uma solução estoque de cada corante na concentração final de 500 mg L⁻¹. Cada solução foi previamente filtrada em filtro de polietileno estéril da marca TPP (TPP[®], Techno Plastic Products AG, Trasadingen/Switzerland) com membrana polietersulfônica de 0,22 µm. A concentração final de corante empregada nos ensaios de descoloração foi de 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30 e 40 mg L⁻¹.

3.2.3. MEIOS DE CULTIVO

Cada microrganismo-teste foi crescido no meio de cultura contendo caldo Luria Bertani (LB) da marca Himedia, com a seguinte composição (g L⁻¹):

Caseína 10, Extrato de Levedura 5, Cloreto de Sódio 10. Para os ensaios de descoloração foi utilizado o caldo LB suplementado com glicose (Konishi *et al.*, 1997). Para ambos os meios o pH era ajustado em $7,0 \pm 0,2$.

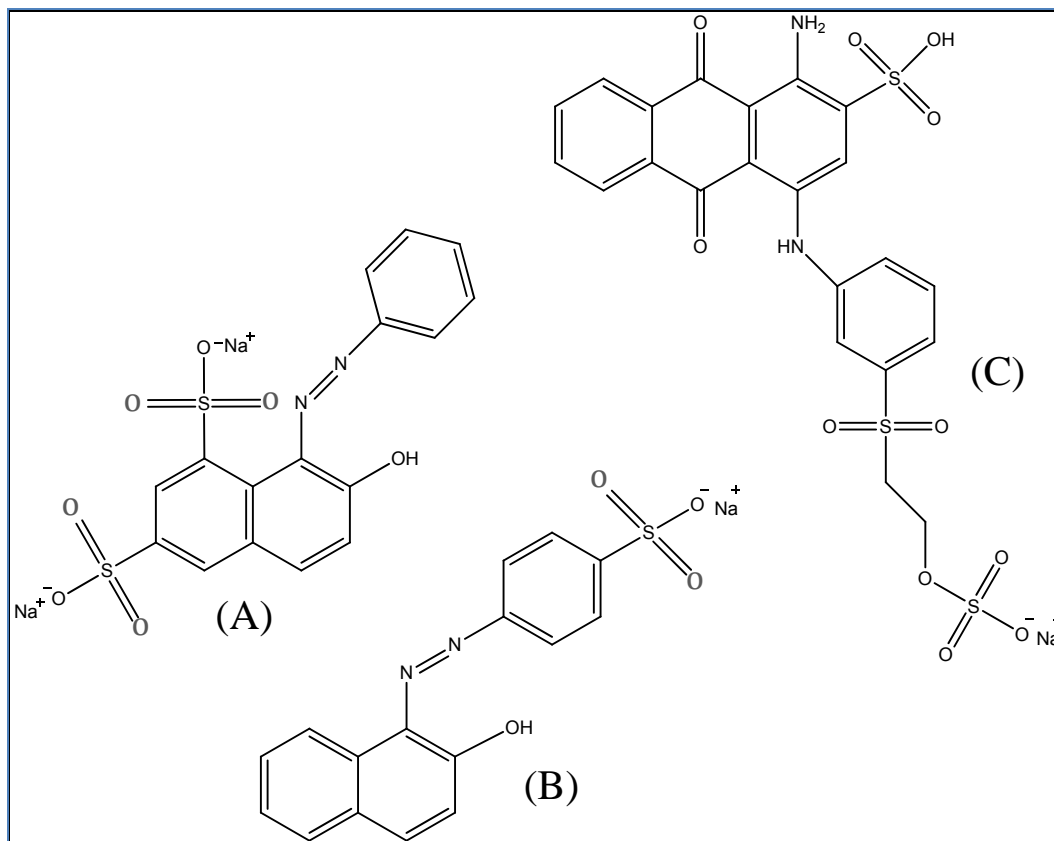


Figura 9. Estrutura química dos corantes usados. (A) Corante Orange G (C. I. 16230); (B) Corante Orange II (C. I. 15510); (C) Corante Remazol Brilliant Blue R (C. I. 61200).

3.3. MÉTODOS

3.3.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Cada ensaio de descoloração foi realizado após um cultivo “over-night” do microrganismo-teste em 50 mL de caldo LB em frascos de Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, mantido sob agitação de 100 rpm e temperatura

constante de 35°C±0,2, resultando em uma cultura de aproximadamente 10⁶ UFC mL⁻¹ (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2009).

3.3.2. ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO

Inicialmente, foi observada a capacidade de descoloração dos microrganismos (individual e em consórcio das três bactérias) para cada um dos corantes. Os ensaios de descoloração foram realizados em 120 mL de caldo LB (KONISHI *et al.*, 1997) suplementado com glicose (5 g L⁻¹), em frascos de 250 mL de capacidade, acrescido do corante na concentração final de 0,5; 1; 2 e 5 mg L⁻¹. A escolha da glicose se deve a um experimento anterior, usando o corante antraquinono RBBR (VASCONCELOS *et al.*, 2009). Após a adição do corante, era acrescido 1% (v v⁻¹) do inóculo do microrganismo-teste. Os frascos eram mantidos sob agitação de 100 rpm em shake orbital (TECNAL, mod. TE-420) por até 72 h. Frascos controle sem o microrganismo foram mantidos nas mesmas condições. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sob condições controladas.

Em seguida, alíquotas do sobrenadante nos intervalos de 0, 12, 24, 48, 72 e 96 h foram retiradas e centrifugadas a 16.000g por 8 minutos para a análise de descoloração em espectrofotômetro UV/VIS (MICRONAL, mod. B-462) através da diminuição da absorbância (ABS). A leitura era realizada no comprimento de onda específico para cada corante (485 nm para o Alaranjado II, 478 nm para o Alaranjado G e 595 nm para o Remazol Brilliant Blue R) (EICHLEROVA *et al.*, 2007; EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2009). A eficiência de descoloração foi obtida usando-se a seguinte fórmula:

$$\%DES = \frac{(ABS_{Final} - ABS_{Inicial})}{ABS_{Inicial}} \times 100$$

Onde $\%DES$ representa a eficiência de descoloração, $ABS_{Inicial}$ representa o valor da absorbância do meio LB contendo o corante e ABS_{Final} representa o valor da absorbância após o tratamento com a bactéria.

Após a verificação da capacidade do microrganismo, e do consórcio, em descolorir o corante nas concentrações testadas, foi realizado um novo ensaio nas mesmas condições descritas acima, entretanto, com concentrações do corante mais elevadas (10, 20, 30 e 40 mg L⁻¹). Caso o microrganismo, ou o consórcio, não descolorisse o corante nas concentrações entre 0,5 e 5 mg L⁻¹, usava-se a melhor concentração do corante. Depois de observada a melhor condição de cultivo (microrganismo / descoloração / corante e tempo) novos ensaios foram realizados para se analisar as variáveis pH, biomassa, DQO, proteína total e toxicidade.

3.4. TESTES ANALÍTICOS

3.4.1. POTÊNCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

Na determinação do pH do líquido metabólico livre de células foi utilizado um pHmetro da marca HANNA, modelo 211.

3.4.2. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO)

A demanda química de oxigênio (DQO) foi medida pelo Método Padrão Colorimétrica de Refluxo Fechado, citado pelo Standard Methods of Water and Wastewater (APHA, 2005). Esse método é um indicador de matéria orgânica baseado na concentração de oxigênio consumido para oxidar a matéria

orgânica, biodegradável ou não (ZUCCARI; GRANER; LEOPOLDO, 2005). Em frascos de digestão foram adicionados 2,5 mL da amostra, 1,5 mL de solução digestora (contendo Dicromato de Potássio, Ácido Sulfúrico e Sulfato de Mercúrio) e 3,5 mL de solução catalítica (Sulfato de Prata diluído em Ácido Sulfúrico). A mistura foi homogeneizada em vortex e levada para digestor (T&S, mod. TS-150/105) onde foi aquecida a $150 \pm 2^\circ\text{C}$ por 120 minutos. Após o resfriamento foi realizada a leitura da absorbância (600 nm) em espectrofotômetro (Micronal, mod. B-462). A DQO da amostra foi obtida pela interpolação dos dados obtidos da curva de calibração resultando valores expressos em $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Para a preparação da curva de calibração foram feitos padrões de Biftalato de Potássio ($\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$) correspondente a 16 a $800 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Para amostras com DQO maiores que $800 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ foram utilizadas alíquotas diluídas.

3.4.3. ANÁLISE DA BIOMASSA

A biomassa foi quantificada através do método de peso seco. Após a centrifugação (8000g por 10 minutos a 8°C) do volume de 45 mL da suspensão, o sobrenadante foi retirado e a biomassa úmida foi levada a uma estufa à temperatura de 80°C até peso constante. A quantidade da biomassa (g L^{-1}) foi determinada com base no peso seco obtido.

3.4.4. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico de Biureto usando Kit de Proteínas Totais (LabTest) (EVANGELISTA-BARRETO, 2006). Em tubos de ensaio foi adicionado 1 mL do reagente de biureto e 0,02 mL do líquido metabólico livre de células. Após a mistura o conteúdo foi

misturado e incubado a 37°C por 10 minutos. Em seguida foi feita a determinação das absorvâncias do teste (545 nm) e, com esses valores, foi realizado o cálculo com a seguinte fórmula, conforme o fabricante do Kit:

$$\text{Proteínas Totais} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Padrão}} \times 4 \text{ (g/dL)}$$

3.4.5. EFEITO DA TOXICIDADE DOS METABÓLITOS FORMADOS

O teste de toxicidade foi realizado de acordo com a técnica descrita por Meyer *et al.* (1982). Ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial (solução de NaCl a 3,8%, pH: 8,5±0,2) e deixados à temperatura ambiente por 48 horas, usando-se luz artificial e sob aeração suficiente para a movimentação dos cistos dentro do recipiente.

Para a realização do bioensaio, 10 náuplios de *Artemia salina* eram transferidos com o auxílio de uma micropipeta para microplacas de fundo chato com tampa contendo 12 orifícios (TPP®, Techno Plastic Products AG, Trasadingen/Switzerland). Em cada orifício era colocado 5 mL do líquido metabólico, livre de células, diluída em água do mar artificial (5, 25, 50 e 75%), com pH variando entre 7,5 e 8,0 (VEIGA; VITAL, 2002). Para controle do teste foi utilizado apenas água do mar artificial. Após 24 horas as larvas vivas e mortas eram contadas e, em seguida, calculada a CL₅₀, ou seja, a concentração letal para 50% das larvas, utilizando-se o método matemático Trimmed Spearman-Kärber (GRINEVICIUS *et al.*, 2009). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Consideravam-se larvas mortas todas aquelas que não apresentavam qualquer movimento em até 10 segundos de observação com auxílio de lupa de aumento.

O esquema abaixo ilustra a seqüência de ensaios realizados e procedimentos adotados com as três diferentes bactérias e para o consórcio delas (Figura 10).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE DESCOLORAÇÃO

A análise da eficiência individual de descoloração das bactérias *Escherichia coli* isolada do Ambiente Marinho, *Escherichia coli* isolada do Efluente Têxtil e *Aeromonas hydrophila* isolada do Efluente Petroquímico foi realizada usando-se uma concentração do corante não inibitória para o crescimento das culturas. A partir da eficiência de descoloração observada na menor concentração (0,5 mg L⁻¹) os demais testes de descoloração usando maiores concentrações do corante (1,0, 2,0, 5,0, 10, 20, 30 e 40 mg L⁻¹) por até 96 h, visou avaliar a concentração máxima tolerada pelos microrganismos.

De acordo com a literatura concentrações mínimas do corante (<1 mg L⁻¹) são suficientes por comprometer e prejudicar o meio aquático (CLAUSEN; TAKASHIMA, 2007) afetando, principalmente, a fotossíntese e as trocas gasosas (GUARATINI; ZANONI, 2000; MCMULLAN *et al.*, 2001). Na indústria têxtil a concentração de corantes utilizados no tingimento dos tecidos varia de 10 a 1000 mg L⁻¹ dependendo do poder de reação do corante e do processo de tingimento utilizado, sendo absorvido apenas cerca de 50 a 70% das moléculas do corante por hidrólise e o restante perdido para o efluente (TUNUSSI; SOBRINHO, 2003).

Vale ressaltar ainda que segundo a literatura, corantes antraquinônicos são amplamente empregados nas indústrias têxteis, podendo estar presentes nos efluentes em uma ampla variedade de cores e em altas concentrações (DOS SANTOS *et al.*, 2005a). Apesar disso, investigações sobre o tratamento físico-químico e biológico aplicado à remoção de cor dessa classe de corante não são tão freqüentes quando comparados com ensaios conduzidos com corantes do tipo azo (DOS SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007).

Na Tabela 1 observa-se que no período de 96 h a bactéria *Escherichia coli* Ambiente Marinho apresentou uma eficiência de descoloração de 100% para o corante antraquinona Remazol Brilliant Blue R (RBBR) na concentração

de 2 mg L⁻¹ e de apenas 54% na concentração de 5 mg L⁻¹, razão pela qual as demais concentrações não foram testadas. No entanto, para o mesmo período de tempo e usando o azo corante Orange G a bactéria alcançou 100% de descoloração na concentração de 5 mg L⁻¹. Em concentrações maiores (10, 20, 30 e 40 mg L⁻¹) do corante Orange G a bactéria apresentou baixo percentual de remoção, ou seja, 19, 12, 3 e 1%, respectivamente. Quando usado o Orange II a *E. coli* apresentou descoloração semelhantes ao obtido para o RBBR (Tabela 1). Nesse ensaio também não foi testada concentração mais alta devido a bactéria ter apresentado descoloração de apenas 55% na concentração de 5 mg L⁻¹ do corante.

Quando testada a estirpe de *Escherichia coli* Efluente Têxtil, a eficiência de descoloração foi bem melhor, alcançando 100% de remoção tanto para os corantes RBBR e Orange II (Tabela 2) na concentração de 5 mg L⁻¹ com 72 h, de cultivo. Quando testada concentrações mais altas, a bactéria não apresentou o mesmo comportamento, e os valores da remoção foram de 58, 42, 28 e 3% para o RBBR e 10, 5, 3 e 1% para o Orange II com concentrações de 10, 20, 30, 40 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 2). Para o corante Orange G o microrganismo foi eficiente apenas na menor concentração testada, alcançando 94% de descoloração com 96 h de ensaio, embora com 48 h de cultivo a bactéria já houvesse removido mais de 50% do corante.

Tabela 1 - Percentual de descoloração da bactéria *Escherichia coli* AM frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II, usando-se diferentes concentrações do corante.

Escherichia coli isolada do Ambiente Marinho	RBBR						
	Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo					
		Descoloração (%)					
		0h	12h	24h	48h	72h	96h
0,5	0	62	78 ^c	95 ^c	100 ^c	100 ^c	
1	0	36	69 ^c	84 ^c	96 ^c	100 ^c	
2	0	26	68 ^c	85 ^c	98 ^c	100 ^c	
5	0	20	49 ^c	52 ^c	54 ^c	54 ^c	
10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
20	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
40	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Orange G							
Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h	
0,5	0	61	100	100	100	100	
1	0	53	95 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c	
2	0	47	74 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c	
5	0	48 ^c	71 ^c	90 ^c	99 ^c	100 ^c	
10	0	7 ^c	13 ^c	15 ^c	18 ^c	19 ^c	
20	0	7 ^c	10 ^c	11 ^c	11 ^c	12 ^c	
30	0	2	2	2	2	3	
40	0	0	1	1	1	1	
Orange II							
Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h	
0,5	0	61 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c	
1	0	53	95 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c	
2	0	30	42	61 ^c	86 ^c	100 ^c	
5	0	19	30	40 ^c	50 ^c	55 ^c	
10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
20	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
30	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
40	NR	NR	NR	NR	NR	NR	

^c biomassa colorida; NR - ensaio não realizado.

Tabela 2 - Percentual de descoloração de *Escherichia coli* ET frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II, usando-se diferentes concentrações do corante.

	RBBR						
	Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo					
		Descoloração (%)					
	0h	12h	24h	48h	72h	96h	
	0,5	0	72	96 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c
	1	0	40	64 ^c	89 ^c	100 ^c	100 ^c
	2	0	25	59 ^c	87 ^c	99 ^c	100 ^c
	5	0	24	56 ^c	70 ^c	91 ^c	100 ^c
	10	0	17	38 ^c	48 ^c	56 ^c	58 ^c
	20	0	3	17 ^c	32 ^c	40 ^c	42 ^c
	30	0	1	15 ^c	18 ^c	27 ^c	28 ^c
	40	0	1	2	3	2	3
	Orange G						
	Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h
	0,5	0	14	30	51	70	94 ^c
	1	0	8	18	27	34	37 ^c
	2	0	7	10	13	16 ^c	17 ^c
	5	0	1	4	5	5	5
	10	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	20	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	30	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	40	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	Orange II						
	Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h
	0,5	0	51	93 ^c	100 ^c	100 ^c	100 ^c
	1	0	49	86 ^c	96 ^c	100 ^c	100 ^c
	2	0	28	74	94 ^c	99 ^c	100 ^c
	5	0	28	60	92 ^c	100 ^c	100 ^c
	10	0	2	4	5	8 ^c	10 ^c
	20	0	0	2	4	5	5
	30	0	1	3	3	3	3
	40	0	0	1	1	1	1

^c biomassa colorida; NR significa ensaio não realizado.

As estirpes de *E. coli* promoveram a descoloração dos corantes, mas são poucos os dados na literatura sobre a eficiência de biodegradação dessa bactéria sem que tenha algum melhoramento genético.

Apesar das baixas taxas de remoção dos corantes esperava-se que a estirpe de *E. coli* isolada do Efluente Têxtil apresentasse melhor eficiência em virtude de ser proveniente de um ambiente que continha estruturas químicas semelhantes aos corantes testados, diferentemente da estirpe de *E. coli* isolada do Ambiente Marinho.

A diferença de comportamento dos microrganismos, mesmo sendo da mesma espécie, ocorre em razão do ambiente do qual foram isoladas. Bactérias aeróbicas necessitam de um período de adaptação para que o processo redutivo seja significativo. Essa adaptação envolve um longo período de exposição da cultura aos corantes de modo que sob condições controladas, a bactéria possa sintetizar enzimas específicas e assim promover a clivagem dos compostos (STOLZ, 2001).

Acredita-se que parte da descoloração tenha ocorrido por absorção celular, visto que a biomassa bacteriana se apresentou colorida quando cultivada com o RBBR. As culturas em contato com os corantes Orange II e Orange G também apresentaram coloração, porém com menor intensidade (Figura 11). O acúmulo de corante na biomassa pode indicar toxicidade crônica à célula, sendo a bioacumulação uma condição possivelmente necessária para a sobrevivência da célula (CHEN, 2002; ONG *et al.*, 2005; EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2009).

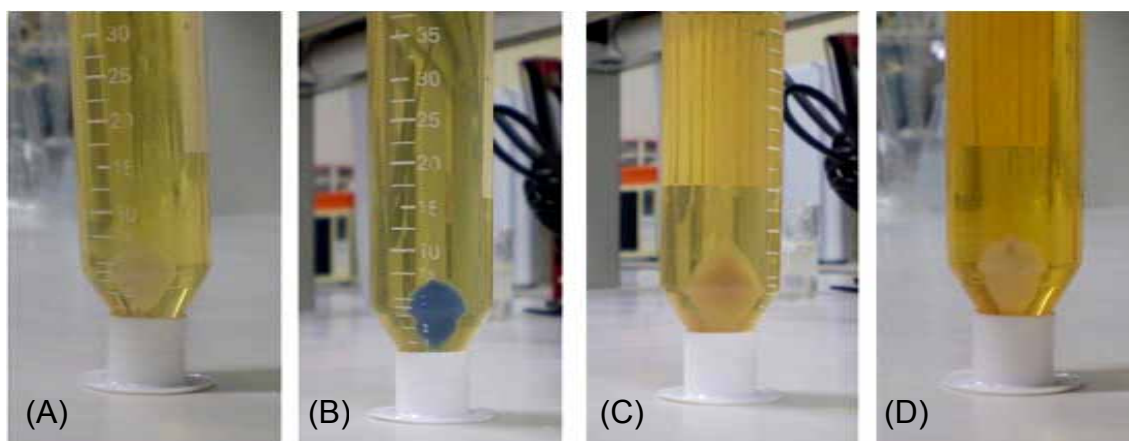


Figura 11. Biomassa colorida das cepas de *Escherichia coli* AM e *Escherichia coli* ET. Controle sem corante (A), Ensaio com RBBR (B), Orange G (C) e Orange II (D).

A capacidade de descoloração de *Escherichia coli* também foi relatada por Chang; Chen; Lin (2004) ao promoverem a descoloração do azo corante Vermelho Reativo 22 em condições aeróbias. Os autores observaram que houve descoloração de 95% em 16 h de cultivo, embora o mesmo percentual tenha sido observado com 8 h de cultivo sob condições estáticas. Isik; Sponza (2003) observaram remoção de cor por *Escherichia coli* de 98 e 72% para os corantes Vermelho Congo (C.I. 22120) e Direct Black 38 (C.I. 30235) respectivamente, quando a bactéria foi cultivada em anaerobiose. Em condições micro-aerofílicas a remoção foi de 39 e 63% e sob condições aeróbicas apenas de 30 e 24%, demonstrando que o oxigênio afeta o processo de descoloração.

Os processos de biodegradação ocorrem em sistemas anaeróbicos, aeróbicos ou na combinação dos dois. Segundo Dos Santos; Cervantes; Van Lier (2007) a remoção de cor em sistemas anaeróbicos é mais eficiente do que em sistemas aeróbicos, em virtude do corante ser o único acceptor de elétron gerado nos processos oxidativos.

Nos sistemas de descoloração sob condições aeróbicas, os elétrons gerados são transferidos para o oxigênio devido o seu potencial de redução ser elevado, razão pela qual não se liga ao corante. Em sistemas anaeróbicos, os elétrons são transferidos diretamente para a molécula do corante, promovendo a clivagem dos mesmos e formando subprodutos como as aminas aromáticas que são potencialmente tóxicas e carcinogênicas (ROBINSON *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2007; OZMEN *et al.*, 2008) necessitando de um pós-tratamento antes dos resíduos serem descartados no ambiente (KUNZ *et al.*, 2002; PADMAVATHY *et al.*, 2003; VIJAYA; SANDHYA, 2003; DOS SANTOS, 2005a).

Apesar da eficiente de remoção na cor observada em cultivos anaeróbicos, diversos autores também relatam a descoloração de corantes têxteis em cultivos aeróbicos, demonstrando que a presença do oxigênio no meio não inibe diretamente a atividade das enzimas azoredutases, mas sim que o processo de remoção seja um evento dependente de oxigênio pelo metabolismo bacteriano (CHANG *et al.*, 2001; RAU; STOLZ, 2003).

Moutaouakkil *et al.* (2003) isolaram uma cepa de *Enterobacter agglomerans* de uma amostra de lodo contaminado com corantes, que foi capaz de produzir uma azoredutase e descoloriu o corante azo Vermelho de

Metila (C.I. 13020) sob condições aeróbicas. A produção desta enzima pela *E. agglomerans* era induzida por uma flavoproteína que utilizava o NADH e o NADPH como doadores de elétrons para a clivagem da ligação azo.

Diversas bactérias têm sido relatadas como eficientes degradadoras de corantes têxteis, como por exemplo, *Serratia* sp., *Yersinia* sp. e *Erwinia* sp. (JIRASRIPONGPUN *et al.*, 2007). A utilização de *Aeromonas hydrophila* na degradação de corantes também é bastante relatada na literatura. O isolamento de culturas dessa espécie teve início na década de 1970 com relatos de Idaka e Ogawa (1978), prosseguindo até os dias de hoje (YATOME *et al.*, 1987; HU, 1996; STOLZ, 2001; CHEN *et al.*, 2003; SHARMA *et al.*, 2004; REN *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2010).

A eficiência de descoloração pela bactéria *Aeromonas hydrophila* frente ao corante RBBR alcançou 100% de remoção com 72 h de cultivo na concentração de 10 mg L⁻¹ do corante. Embora no intervalo de tempo de 24 h, taxas de remoção de 99, 94, 87 e 89% tenham sido alcançadas por essa bactéria nas concentrações de 1, 2, 5 e 10 mg L⁻¹, respectivamente. Remoção de 63% do corante também foi observada quando usado 20 mg L⁻¹ do corante. Para os corantes Orange G e Orange II a eficiência de remoção foi menor, apresentando 100% de descoloração quando usado 5 mg L⁻¹ dos corantes (Tabela 3). Diferentemente do resultado observado para o Orange G, a bactéria ainda promoveu a remoção de 51% do corante Orange II na concentração de 10 mg L⁻¹ em 96 h de cultivo. Quando usado concentrações de 1, 2 e 5 mg L⁻¹ foram obtidas taxas de remoção de 100, 98 e 96% para o Orange G e 100, 100, 98% para o Orange II com 48 h de cultivo, respectivamente (Tabela 3).

Resultados semelhantes foram encontrados por Chen *et al.* (2003) ao isolarem seis linhagens de *A. hydrophila* a partir de amostras de lodo. Os autores relataram a degradação de mais de 90% do corante RED RBN em oito dias de incubação utilizando uma concentração de 3000 mg L⁻¹ do corante. Para aumentar a eficiência de descoloração pela bactéria, fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) foram adicionadas ao meio. Zhang *et al.* (2010) ao isolarem três estirpes de *A. hydrophila* observaram descoloração do corante azul reativo 160 (RB160) em menos de 20 h de cultivo. A eficiência de remoção na cor pela bactéria foi de 9-16 vezes maior que a bactéria *Pseudomonas*

luteola, isolada do lodo de uma estação de tratamento de efluentes de uma indústria têxtil (CHEN, 2002; CHEN *et al.*, 2006)

Ren *et al.* (2006) ao testarem um isolado de *A. hydrophila* (DN 322), sob condições semelhantes ao experimento desta pesquisa e utilizando 13 corantes de diferentes tipos (trifenilmetanos, azo e antraquinonas), conseguiram remoção na cor de 60 a 96% com 6 a 72 h de incubação para todos os corantes, exceto para o corante Acid Blue 56 com apenas 21% de remoção.

Tabela 3 - Percentual de descoloração da bactéria *Aeromonas hydrophila* EP frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II usando-se diferentes concentrações.

	RBBR						
	Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo					
		Descoloração (%)					
		0h	12h	24h	48h	72h	96h
Aeromonas hydrophila isolada do Ambiente Petroquímico	0,5	0	64	96	100	100	100
	1	0	50	83	99	100	100
	2	0	48	82	94	100	100
	5	0	31	67	87	100	100
	10	0	31	56	89	100	100
	20	0	24	38	48	54	63
	30	0	11	18	19	20	20
	40	0	2	3	3	4	4
	Orange G						
		Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h
	0,5	0	69	96	100	100	100
	1	0	62	92	100	100	100
	2	0	52	88	98	100	100
	5	0	48	70	96	100	100
	10	0	23	26	29	30	31
	20	0	16	17	18	18	18
	30	0	0	0	0	1	1
	40	0	0	0	0	0	0
Orange II							
	Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h
	0,5	0	62	100	100	100	100
	1	0	62	94	100	100	100
	2	0	51	90	100	100	100
	5	0	40	80	98	100	100
	10	0	30	34	42	47	51
	20	0	13	18	22	27	33
	30	0	7	12	14	16	17
	40	0	2	2	3	2	3

A capacidade de descoloração de *Aeromonas hydrophila* frente a 24 diferentes corantes (quatro monoazo, dez diazo, um poliazo, sete azo, um antraquinona e um índico), variou entre 80 e 100% na remoção da cor, para, praticamente, todos os corantes estudados. Apenas para os corantes Vermelho Direto 224 (diazo), Azul Reativo 198 (azo) e o Ácido Azul 264 (antraquinona) a cepa se mostrou ineficiente, apresentando descoloração de 5, 9, 45%,

respectivamente, em até sete dias de exposição ao corante (CHEN *et al.*, 2003). Ainda neste trabalho, a descoloração pela bactéria frente ao corante antraquinona RBBR foi maior do que a observada para os azo corantes Orange II e Orange G. Chen *et al.* (2003) ainda observaram que a bactéria *A. hydrophila* mostrou maior facilidade de descoloração para os corantes que continham apenas uma estrutura azo (monoazo) e maior dificuldade para aqueles que possuíam em sua estrutura núcleos metálicos. Esse fato também foi observado por Podgornik; Grgic; Perdih (1999) quando trabalharam com um isolado fúngico de *Phanerochaete chrysosporium* e observaram que a capacidade de degradação se devia a enzima lignina peroxidase que atuava melhor em corantes monoazo.

A posição dos substituintes estrutural na molécula do corante é muito importante no processo de descoloração microbiano. Hao; Kim; Chiang (2000) observaram que a posição “*para*” dos substituintes estrutural do corante ácido Orange 20 era facilmente descolorido por *Pseudomonas* sp. quando comparado com a posição “*orto*” do corante monoazo Orange II.

Não foi constatada a presença de biomassa colorida por *Aeromonas hydrophila* em nenhum dos ensaios. Esses dados são contrários aos observados por Hsueh; Chen; Yen (2009) que ao avaliarem a biodescoloração do corante Vermelho Reativo 141 por *Aeromonas hydrophila*, isolada de um rio no nordeste de Taiwan, observaram que a descoloração do meio de cultivo ocorreu por biosorção da biomassa.

A aplicação de microrganismos na descoloração de corantes têxteis sintéticos é um método atraente por ser de simples aplicação. Entretanto, Ghazali *et al.* (2004) relatam que o processo de descoloração de corantes por microrganismos individuais é um processo limitado, sendo a aplicação de consórcios bem mais atrativos. Há casos em que os microrganismos envolvidos apresentam maior capacidade enzimática para degradar poluentes complexos, caso dos corantes, e produzir compostos intermediários, tais como o ácido sulfanílico. Esse metabólito foi encontrado na clivagem do azo corante Orange II quando usado um consórcio em um reator aeróbico. Apesar disso, o consórcio foi capaz de mineralizar cerca de 90% do corante em 18 dias cultivo em reator (COUGHLIN; KINKLE; BISHOP, 2002).

A utilização do consórcio envolvendo as duas estirpes de *Escherichia coli* (AM e ET) e *Aeromonas hydrophila* (EP) promoveu 100% de remoção na concentração de 5 mg L⁻¹ com 72 h de cultivo para cada corante testado isoladamente (Tabela 4). Entretanto, quando o consórcio foi submetido a concentrações maiores, se observou uma diminuição na eficiência de descoloração acentuada no corante Orange G, seguido pelo Orange II e RBBR respectivamente. Quando comparado com o comportamento individual de descoloração das bactérias, observa-se que o consórcio removeu concentrações mais altas dos corantes RBBR e Orange II quando comparado com a *Escherichia coli* AM e Orange G para a *Escherichia coli* ET. Entretanto, o consórcio apresentou baixa eficiência quando comparado a *Aeromonas hydrophila* individualmente e corante RBBR. *Aeromonas hydrophila* alcançou remoção de 20 mg L⁻¹ do corante (Tabelas 3 e 4). É possível que tenha havido competição entre as bactérias ocorrendo à diminuição na eficiência de descoloração quando usadas em consórcio.

Tabela 4 - Percentual de descoloração do consórcio frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II usando-se diferentes concentrações.

	RBBR							
	Concentração (mg L ⁻¹)	Tempo						
		Descoloração (%)						
Consórcio entre <i>Escherichia coli</i> (AM e ET) e <i>Aeromonas hydrophila</i> (EP)		0h	12h	24h	48h	72h	96h	
	0,5	0	71	100	100	100	100	
	1	0	65	91	100	100	100	
	2	0	54	82	98	100	100	
	5	0	49	77	93	100	100	
	10	0	30	42	65	72	78	
	20	0	10	18	26	28	31	
	30	0	4	5	9	11	12	
	40	0	2	3	4	4	4	
		Orange G						
		Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h
		0,5	0	58	93	100	100	100
		1	0	51	93	98	100	100
		2	0	43	72	92	100	100
		5	0	39	67	93	100	100
		10	0	8	19	28	36	40
		20	0	4	10	12	14	15
		30	0	2	3	5	6	6
		40	0	1	1	1	1	2
		Orange II						
		Concentração (mg L ⁻¹)	0h	12h	24h	48h	72h	96h
		0,5	0	75	100	100	100	100
		1	0	58	93	100	100	100
		2	0	51	87	100	100	100
		5	0	48	71	92	100	100
		10	0	32	44	49	51	53
		20	0	28	35	40	41	42
		30	0	7	20	23	26	26
	40	0	3	6	8	8	9	

Esses dados se assemelham com os resultados encontrados por Khehra *et al.* (2005) que encontraram eficiência de descoloração variando de 78 a 100% para vários azo corantes ao utilizar um consórcio de bactérias composto por *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* e *Bacillus cereus*. Segundo os autores, a eficiência é proveniente da adaptação natural ocorrida entre as bactérias, já que os isolados foram retirados do lodo de uma estação de tratamento de efluentes localizado em

uma indústria de processamento têxtil na cidade de Amritsar (Índia). A descoloração obtida com 24 h de cultivo diminuiu para 12 h quando houve uma suplementação com glicose.

Sharma *et al.* (2004) investigando a remoção do corante ácido azul 15 com o consórcio de *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.* e *Aeromonas sp.*, observaram um percentual de descoloração de 94%. Diversos autores relatam a potencialidade da ação sinérgica dos microrganismos quando aplicados em tratamento de efluentes da indústria têxtil (ABRAHAM *et al.*, 2003; HE; HU; LI, 2004). Esse sinergismo foi observado na degradação do corante diazo Remazol Black B pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus circulance*, com taxas obtidas de até 84% de descoloração (DAFALE *et al.*, 2008). Fato semelhante foi relatado por He, Hu; Li (2004) ao estudarem a degradação do azo corante direto Fast Scarlet 4BS como única fonte de carbono e constataram descoloração de 90% em 24 h de incubação.

4.2. ANÁLISE DO PH, BIOMASSA, DQO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A descoloração por bactérias é diretamente influenciada por alguns fatores que afetam a produção de proteínas totais, como a temperatura, tamanho do inóculo e o pH do meio de cultivo (DANESHVAR *et al.*, 2007; YESILADA; ASMA; CING, 2003).

Com relação ao pH as duas cepas de *Escherichia coli* apresentaram um comportamento semelhante no cultivo, partindo de um pH inicial de 7,3 para 4,5 ao final do cultivo. *Aeromonas hydrophila* e o consórcio por sua vez, apresentaram um pH final um pouco mais elevado, ao redor de 5,3 (Tabela 5). A diminuição no pH é resultante do acúmulo de ácidos orgânicos provenientes da degradação da glicose presente no meio (CHEN *et al.*, 2003).

Na Tabela 5 se observa que a cepa de *Escherichia coli* AM apresentou um decréscimo de 0,1233 e 0,0703 g L⁻¹ em sua biomassa quando cultivada na

presença do RBBR e Orange II, respectivamente. Entretanto, na presença do Orange G a bactéria apresentou um incremento de $0,1038 \text{ g L}^{-1}$. Já a cepa de *Escherichia coli* ET apresentou um incremento na biomassa de $0,0257$, $0,0255$ e $0,0027 \text{ g L}^{-1}$ respectivamente, no cultivo contendo os corantes RBBR, Orange G e Orange II, mostrando melhor adaptação na presença desses corantes (STOLZ, 2001) e a possível utilização desses corantes como fonte de carbono para o crescimento celular. Situação contrária aconteceu com a produção de biomassa da bactéria *Aeromonas hydrophila* e consórcio, demonstrando competição entre as bactérias pelos nutrientes, visto que a biomassa não se apresentava colorida.

Ren *et al.* (2006) estudando a eficiência de descoloração de *A. hydrophila* frente a diferentes corantes (trifenilmetanos, azo e antraquinonas), observaram boa eficiência quando o cultivo estava à temperatura de 25 a 37°C e o pH variando de $5,0$ a $10,0$, ratificando os resultados desta pesquisa. Nesse trabalho, os autores observaram que a eficiência aumentou quando o ensaio foi submetido à agitação, indicando que a descoloração dependia da presença de oxigênio. Com relação à biomassa, os autores relataram que a presença do corante cristal violeta como fonte de carbono favoreceu um incremento de aproximadamente cinco vezes na biomassa depois de 72 h de cultivo.

Tabela 5 - Resultados do pH, DQO e biomassa no processo de descoloração usando *Escherichia coli* (AM e ET), *Aeromonas hydrophila* (EP) e o consórcio frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II.

Bactéria	Corante	Concentração (mg L ⁻¹)	pH		DQO (mg O ₂ L ⁻¹)			Biomassa sem corante (g L ⁻¹)	Biomassa no final do ensaio (g L ⁻¹)	Rendimento (g L ⁻¹)
			Inicial	Final	Inicial	Final	Remoção (%)			
AM	RBBR	2,0	7,34	4,48	39.393	15.589	60	0,0486	-0,1233	D
	ORANGE G	5,0	7,24	4,49	36.619	15.285	58	0,1719	0,1038	I
	ORANGE II	2,0	7,35	4,41	23.781	11.283	53	0,1016	-0,0703	D
	RBBR	5,0	7,28	4,46	39.393	15.589	60	0,2118	0,0257	I
	ORANGE G	0,5	7,23	4,51	36.857	14.743	60	0,2116	0,0255	I
	ORANGE II	5,0	7,31	4,50	31.785	15.325	52	0,1888	0,0027	I
Aeromonas hydrophila	RBBR	10,0	7,08	5,42	39.393	15.787	60	0,1146	-0,0781	D
	ORANGE G	5,0	7,24	5,45	36.619	15.087	59	0,0768	-0,1159	D
	ORANGE II	5,0	7,21	5,10	30.200	16.672	45	0,1295	-0,0632	D
Consórcio	RBBR	5,0	7,34	5,09	38.497	12.107	69	0,1174	-0,1383	D
	ORANGE G	5,0	7,27	5,47	34.118	12.454	63	0,2557	-0,1127	D
	ORANGE II	5,0	7,32	5,12	30.027	11.748	61	0,1329	-0,1228	D

(I=Incremento de biomassa; D=Decréscimo de biomassa)

Barbosa; Gondim; Paz (2007) evidenciaram um aumento da biomassa do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* quando a bactéria estava adaptada à presença do corante preto pirazol e na sua utilização como única fonte de carbono.

Chang; Lin (2001) verificaram que ao aumentar o pH de 4,0 para 10,0 havia um aumento na eficiência de descoloração por *E. coli* em ensaios usando o azo corante vermelho reativo 22. Entretanto, em pH acima de 10,0 havia significativa redução na eficiência. O efeito do pH na descoloração dos corantes azo por bactérias ocorre devido à diferenças de determinantes genéticos responsáveis pela produção de enzimas (principalmente do tipo azoredutase) ou responsáveis por parte da fisiologia bacteriana, como por exemplo, o mecanismo de transporte de moléculas do corante. Zimmermann *et al.* (1984) e Ghosh *et al.* (1993) relataram que o peso molecular de enzimas azoredutases varia de espécie para espécie, indicando a diversidade de genes na produção dessas enzimas utilizadas no processo de descoloração.

Chen *et al.* (2003) verificaram que a descoloração do corante vermelho RBN por *A. hydrophila* foi melhor na faixa de pH entre 5,5 a 10,0 sendo que valores abaixo de 4,5 e acima de 11,0 prejudicam o crescimento da bactéria.

Com relação à DQO do meio, diversos autores relatam os elevados valores de DQO encontrados nos efluentes têxteis em virtude da presença de corantes (ARAUJO, ROCHA, 1989; METCALF; EDDY, 2003; DANTAS *et al.*, 2004). Nesse trabalho, quando as cepas foram usadas individualmente (*Escherichia coli* AM, ET e *Aeromonas hydrophila* EP), houve diminuição na taxa da DQO. A maior taxa de remoção foi obtida no ensaio do consórcio das três cepas frente ao corante RBBR (69%), sugerindo que houve biodegradação do corante, enquanto a menor taxa de remoção (45%) foi observada para o ensaio contendo *Aeromonas hydrophila* e o corante Orange II (Tabela 5). A baixa diminuição na DQO sugere ocorrência de biotransformação na molécula do corante ou a presença de compostos recalcitrantes (SUPAKA *et al.*, 2004; MENDEZ-PAZ; OMIL; LEMA, 2005).

Valores semelhantes foram encontrados por Evangelista-Barreto *et al.* (2007) na degradação do azo corante Alaranjado II ao usar *Pseudomonas aeruginosa* e constataram a remoção da DQO entre 38 e 59%. Segundo os autores a eficiência na redução não foi maior devido à presença de compostos

intermediários provenientes da quebra dos corantes ou dos metabólitos extracelulares liberados pela bactéria. Redução na DQO variando de 56 a 85% foi observada na degradação dos corantes Magenta, Cristal Violeta e Verde Malaquita por *Kurthia* sp (SANI; BANERJEE, 1999). Enquanto Isik; Sponza (2003b) relataram redução de 85 a 90% na DQO ao utilizarem a bactéria *E. coli* na degradação do corante Azul Direto 38 sob condições aeróbicas de cultivo.

Nos testes de proteína total analisada a partir do líquido metabólico foi observado um decréscimo na concentração de proteínas totais em quase todos os ensaios, diferindo apenas nos ensaios contendo *Escherichia coli* (AM e ET) e o Orange G, que apresentaram um acréscimo no percentual de proteínas (Tabela 6). Pode-se sugerir que esse aumento na concentração de proteínas nos dois ensaios possa ter ocorrido pela presença de compostos enzimáticos, interferindo na leitura da DO.

Tabela 6 - Percentual de proteína total no líquido metabólico após a etapa de descoloração usando os microrganismos *Escherichia coli* (AM e ET), *Aeromonas hydrophila* (EP) e o consórcio frente aos corantes RBBR, Orange G e Orange II.

	Ensaio	Proteína Total (g dL ⁻¹)					Rendimento	
		Inicial	24h	48h	72h	96h		
EcAM	RBBR		0,3724	0,2763	0,2342	0,2042	D	-58%
	ORANGE G	0,4848	0,7658	0,8274	0,9094	0,9436	I	95%
	ORANGE II		0,2894	0,2532	0,2326	0,1860	D	-62%
EcET	RBBR		0,6488	0,4991	0,4492	0,4278	D	-20%
	ORANGE G	0,5369	0,5671	0,6214	0,6516	0,6576	I	22%
	ORANGE II		0,4936	0,4125	0,4199	-	D	-22%
AhEP	RBBR		0,2625	0,1732	0,1312	-	D	-68%
	ORANGE G	0,4041	0,2849	0,2258	0,1667	-	D	-59%
	ORANGE II		0,3506	0,2762	0,1965	-	D	-51%
Consórcio	RBBR		0,6164	0,5472	0,4654	-	D	-27%
	ORANGE G	0,6415	0,5967	0,5053	0,4444	-	D	-31%
	ORANGE II		0,4383	0,3951	0,3086	-	D	-52%

(I=Incremento de proteína; D=Decréscimo de proteína)

DANESHVAR *et al.* (2007) usando *Escherichia coli* na descoloração do corante Orange G como fonte de carbono, observaram que o aumento na produção de proteínas sugere uma adaptação da bactéria durante os ensaios. Ao passo que a absorção de nutrientes pelos microrganismos muitas vezes promove a diminuição de proteínas no meio, demonstrando o comportamento bioquímico clássico de absorção de nutrientes (ANDRADE; SOUZA; CAMPOS-TAKAKI, 2000).

4.3. TOXICIDADE DOS METABÓLITOS FORMADOS NO PROCESSO DE DESCOLORAÇÃO

A avaliação dos efeitos nocivos, causados por substâncias quando introduzidas em ecossistemas aquáticos pode ser feita a partir de testes de toxicidade aguda ou crônica. Esses testes consistem na observação dos efeitos adversos aos organismos utilizados em função da variação da concentração da substância estudada e do tempo de exposição do organismo às substâncias.

A Figura 12 mostra o percentual da CL₅₀ (concentração letal em 50% da população) do líquido metabólico dos ensaios, frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, calculada pelo método de Trimmed Spearman-Kärber, quando exposto por 24 h.

Todas as amostras apresentaram toxicidade ao organismo-teste. Os valores da CL₅₀ variaram de 5,00 a 46,53% ($v v^{-1}$), enquanto nos testes realizados com o corante sem o tratamento microbiológico a mortalidade foi baixa, não alcançando 15%. Na maioria dos casos o corante *per se* não é tóxico ao ambiente e que, durante o processo de biodegradação sem completa mineralização do composto há a formação de intermediários tóxicos.

Quando comparou-se os valores da CL₅₀ dos líquidos metabólicos dos isolados com o consórcio, observou-se que para alguns casos, essa concentração aumentou, configurando uma diminuição da toxicidade dos compostos produzidos durante a descoloração. Como ocorreu com os ensaios das estirpes de *Escherichia coli* (AM e ET) frente ao corante RBBR (17,22 e

13,18%), e quando em consórcio, o valor da CL_{50} passou para 28,28%. Fato oposto aconteceu quando essas estirpes foram colocadas em contato com o corante Orange II que, quando isoladamente, apresentaram valores de CL_{50} 44,98 e 46,53% respectivamente, e quando em consórcio diminuiu para uma CL_{50} de 25,01%. Situação semelhante também foi encontrada com a estirpe de *Aeromonas hydrophila* estudada. Esta apresentou uma diminuição da CL_{50} frente aos azo corantes (11,18 e 19,20% para 15,49 e 25,01% quando em consórcio) e um aumento da CL_{50} quando testada com o corante antraquinono (de 35,36% para 28,28% em consórcio).

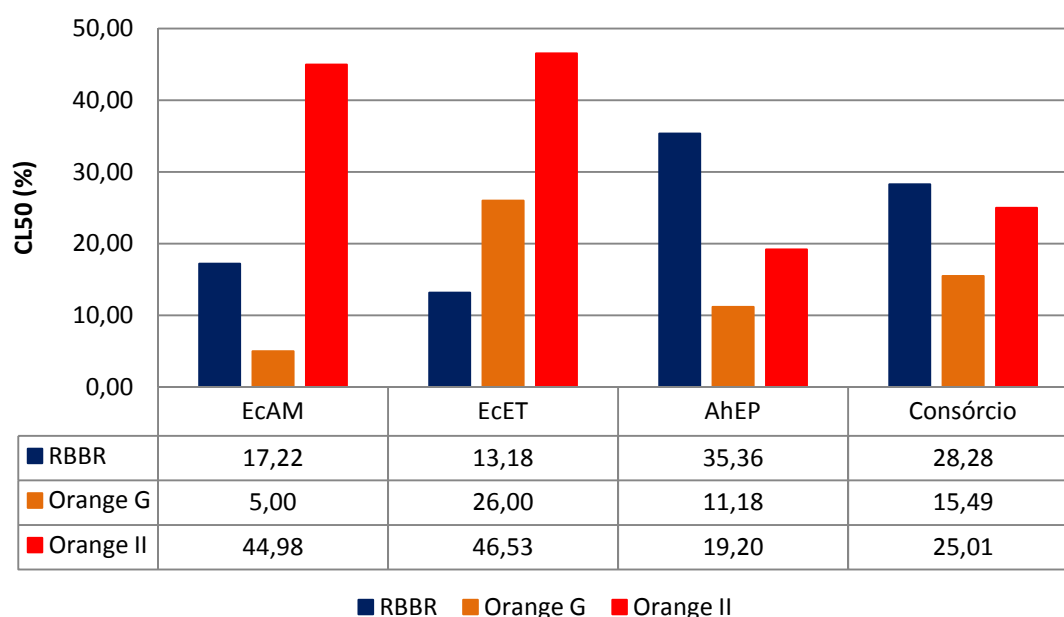


Figura 12. Percentual da CL_{50} usando *Artemia salina* após o processo de descoloração dos corantes RBBR, Orange G e Orange II utilizando *Escherichia coli* (AM e ET), *Aeromonas hydrophila* (EP) e o consórcio das bactérias.

Resultados semelhantes foram encontrados por Evangelista-Barreto *et al.* (2007) ao usar *Pseudomonas aeruginosa* e o corante Orange II sob condições aeróbicas. Ainda com o mesmo corante, porém usando *Geobacillus stearothermophilus* (UCP 986) Evangelista-Barreto *et al.* (2009) encontraram uma CL_{50} de 49,28%, ou seja, maior do que a encontrada no presente trabalho. Para Clausen; Takashima (2007) a remoção de cor do efluente é tão importante quanto a remoção da toxicidade dos substratos orgânicos incolores provenientes do metabolismo secundário. A avaliação da toxicidade de um

tratamento aeróbico em um efluente têxtil usando o microcrustáceo *Daphnia magna* demonstrou que a parcela não degradável do corante era responsável pela toxicidade encontrada (ISIK; SPONZA, 2004).

Toxicidade aguda do corante Turquesa Remazol G, Azul Lanaset 2R e efluente têxtil, antes e após tratamento enzimático (enzima HRP) foi avaliada por Forgiarini (2006). Nesse estudo se observou que o corante Turquesa Remazol G sem tratamento apresentava baixa toxicidade ($CL_{50} = 87,5\%$), mas que após o tratamento enzimático, a toxicidade para o microcrustáceo *Artemia salina* elevava-se ($CL_{50} = 60,70\%$). O mesmo ocorrendo com o corante Azul Lanaset 2R, que antes do tratamento apresentava $CL_{50} = 95,86\%$ e pós-tratamento apresentou CL_{50} de $60,71\%$. Forgiarini observou ainda que os testes de toxicidade aguda usando o efluente têxtil apresentava resultados diferentes, ou seja, os bioindicadores *Artemia salina* e *Daphnia magna*, e a inibição do crescimento da raiz de cebola (*Allium cepa*), mostraram que houve uma redução da toxicidade do efluente têxtil após o tratamento com a enzima HRP. É importante ressaltar que cada bioindicador responde de forma diferente ao entrar em contato com a solução teste.

Souza; Forgiarini; Souza (2007) observaram que a toxicidade dos corantes remazol Turquesa Blue G e Lanaset Azul 2R foi semelhante à toxicidade dos produtos formados depois da degradação enzimática dos mesmos, utilizando o bioindicador *Artemia salina* e obtendo uma CL_{50} entre 55% e $58,33\%$, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo conduziram às seguintes conclusões:

- A cepa de *Escherichia coli* isolada do Ambiente Marinho foi capaz de descolorir os corantes RBBR e Orange II na concentração máxima de 2 mg L⁻¹) e de 5 mg L⁻¹ do Orange G.
- A cepa de *Escherichia coli* isolada do Efluente Têxtil foi capaz de descolorir o corante Orange G apenas em baixas concentrações (0,5 mg L⁻¹) enquanto para os corantes RBBR e Orange II remove até 5 mg L⁻¹.
- *Aeromonas hydrophila* apresentou melhor eficiência de descoloração quando comparada as outras duas bactérias uma vez que removeu os corantes Orange G e Orange II e RBBR até 5 e 10 mg L⁻¹, respectivamente.
- O consórcio microbiano apresentou melhor eficiência de descoloração quando comparado a *Escherichia coli* AM e o RBBR e *Escherichia coli* ET e o Orange G. Com relação a *Aeromonas hydrophila* o comportamento foi semelhante.
- Na maioria dos cultivos os microrganismos promoveram diminuição da DQO ao redor de 60%.
- Os microrganismos tanto isoladamente quanto em consórcio no processo de clivagem da molécula produzem metabólitos com características recalcitrantes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM - Associação Brasileira da Indústria Química, 2005. **Citação de referências e documentos eletrônicos**. Disponível em: <<http://www.abiquim.org.br>>. Acesso em: 13 ago. 2009.

ABIT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA TÊXTIL. “**BNDES: A cadeia têxtil e de confecções – uma visão de futuro**”. Apresentação realizada no BNDES, Rio de Janeiro, nov. 2008.

ABRAHAM, T. E.; SENAN, R. C.; SHAFFIQU, T. S.; ROY, J. J.; POULOSE, T. P.; THOMAS, P. P. Bioremediation of textile azo dyes by an aerobic bacterial consortium using a rotating biological contactor. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 19, p. 1372-1376, may. 2003.

ABRAHÃO, J. A.; SILVA, G. A.; Influência de Alguns Contaminantes na Toxicidade Aguda de Efluentes da Indústria Têxtil. **Química Têxtil**, São Paulo, v. 25, n. 67, p. 8-34, jun. 2002.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis e enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animais**. Bacterioses y micosis. Ed: Organization Panamericana de La Salud (OPS). Washington – DC – 20037 – EUA – 2001 – 398. p. 2001. Publicacion Científica y Técnica n° 580. 3ª ed. vol. I. 2001.

AHLSTROM, L.; ESKILSSON, C. S.; BJORKLUND, E. Determination of banned azo dyes in consumer goods. **Trends in Analytical Chemistry**, Oxford, v. 24, n.1, p. 49-56. 2005.

AHMAD, A. L.; PUASA, S. W. Reactive dyes decolourization from an aqueous solution by combined coagulation/micellar-enhanced ultrafiltration process. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 132, p. 257-265, 2007.

AKSU, Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 997-1026, 2005.

AKSU, Z.; CAGATAY, S. S. Investigation of biosorption of Gemazol Turquoise Blue-G reactive dye by dried *Rhizopus arrhizus* in batch and continuous systems, **Separation And Purification Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 24-35, Sep. 2006.

AKSU, Z.; TEZER, S. Biosorption of reactive dyes on the green alga *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 1347-1361. 2005.

AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SEOH, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and n-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 403–408, 1995.

ALTWEGG, M.; LUTHY-HOTTENSTEIN, J. Methods for the identification of DNA hybridization groups in the genus *Aeromonas*. **Experientia**, v. 47, p. 403-406, 1991.

AMUDA, O. S.; AMOO, I. A. Coagulation/flocculation process and sludge conditioning in beverage industrial wastewater treatment. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 141, p. 778-783, 2007.

ANDRADE, V. S.; NETO, B. B.; SOUZA, W.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1042-1045, 2000.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21^a ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

ARAUJO, M.; CASTRO, E. M. M. **Manual de Engenharia Têxtil**, v. 2, Fundação Calouste Gulbenkian, 1984.

ARAUJO, M.; ROCHA, A. M. **Tecnologia da Tecelagem**. Lisboa: Direção Geral da Indústria - Ministério da Indústria e Energia. v. I, 1989.

ASPLAND, J. R. Chapter 5: Reactive dyes and their application. In: **Textile Chemist and Colorist**, Colorado, v. 24, n. 5, p. 31-36, 1992.

ASPLAND, J. R. Textile dyeing and coloration. IN: **Research Triangle Park**. American Association of Textile Chemists and Colorists, p. 62-77. 1997. Disponível em <http://books.google.com.br/books?id=5fMBJZ8NPcgC&printsec=frontcover&dq=%22Textile+dyeing+and+coloration%22&source=bl&ots=a3Cyb7Sv1v&sig=0z_ttA4FpyWdeInIIWSQDwZU9QQ&hl=pt-BR&ei=BCbGS5WqCs-ruAfDp7Ef&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CAYQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false> Acesso em: 4 set. 2009.

BAE, J. S.; FREEMAN, H. S. Aquatic toxicity evaluation of new direct dyes to the *Daphnia magna*. **Dyes and Pigments**, Oxford, v. 73, p. 81-85, 2007.

BALDISSARELLI, V. Z. **Estudo da adsorção do corante reativo preto 5 sobre carvão ativado: caracterização do adsorvente e determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos**. 2006. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2006.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MERCHANT, R. Microbial Decolorization of Textile-dye containing Effluents: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, vol. 58, p. 217-227. 1996.

BARBOSA, A. P. A.; GONDIM, A. L. N.; PAZ, M. C. F. Remoção do corante preto pirazol por *Pseudomonas aeruginosa*. In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Editora CEFET/PB, 2007.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**, 11^a ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, p. 631-656. 2003.

BASIBUYUK, M.; FORSTER, C. F. An examination of the adsorption characteristics of a basic dye (Maxilon Red BL-N) on to live activated sludge system. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 1311-1316. 2003.

BETTELHEIM, K. A.; KUZEVSKI, R. A.; GILBERT, D. O.; KRAUSE, C. S.; MCSWEENEY, C. S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, Austrália, v. 98, p. 699-709, 2005.

BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. CETESB, São Paulo – Brasil, 764 p. 1993.

BRASIL - Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Brasília, DF. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 26 mar. 2010.

BUITRON, G.; QUEZADA, M.; MORENO, G. Aerobic degradation of the azo dye acid red 151 in a sequencing batch biofilter. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 92, n. 2, p.143-149, Apr. 2004.

CAMARGO, A. T.; MONTANHEIRO, A. L.; GUNHA, M. L.; ARNDT, K. M. Biorremediação de compostos coloridos por microrganismos isolados de efluentes de indústria de estampagem de tecidos, em Rio Claro, São Paulo. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu. Editora: Sociedade de Ecologia do Brasil, p. 1-2, 2007.

CAMMAROTA, M. C.; COELHO, M. A. Z. Tratamento Enzimático Para Remoção de Cor de Efluentes da Indústria Têxtil. **Química Têxtil**, São Paulo, v. 65, p. 40-47, 2001.

CHAKRABORTY, S.; DE, S.; BASU, J. K.; DASGUPTA, S. Treatment of a textile effluent: application of a combination method involving and nanofiltration. **Desalination**, Amsterdam, v. 174, p. 73-85, 2005.

CHANG, J. S.; CHEN, B. Y.; LIN, Y. S. Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO₃. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 91, p. 243-248. 2004.

CHANG, J. S.; CHOU, C.; LIN, P. J.; HO, J. Y.; HU, T. L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Research**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 2841-2850. 2001.

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

CHEN, B. Y. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 437-446, nov. 2002.