



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos



Biodegradação de azocorantes por bactérias isoladas de efluentes industriais

**Elisangela Francison
Bióloga**

**Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant
Orientadora**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos.**

**Campinas-SP
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

F847b Franciscon, Elisangela
Biodegradação de azocorantes por bactérias isoladas de efluentes industriais / Elisangela Franciscon. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Biodegradação. 2.Corantes. 3.Bactérias. I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant
(ORIENTADORA)

Dr^a Andréa Roberta Clemente
(MEMBRO)

Dr^a Érika Cristina Pavarina
(MEMBRO)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(SUPLENTE)

Em especial

Dedico este trabalho,

*Aos meus pais Maria Lúcia e Alexandre Roberto e, a toda minha família
pela educação, amor, carinho, força e coragem que tenho recebido em todos os
momentos de minha vida.*

*Ofereço ao meu marido Fabio,
pelo amor, ajuda, paciência e
companheirismo*

*Tu és, divina e graciosa, estátua majestosa do amor
por Deus esculpida
e formada com ardor, da alma da mais linda flor
de mais altivo olor que na vida
és preferida pelo beija-flor...*

Pixinguinha

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as graças alcançadas em minha vida e pela força em todos os momentos que lutei pelos meus sonhos e realizações.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Durrant, por quem tenho muita estima, respeito, amizade e admiração profissional e pela grande oportunidade dada em minha vida acadêmica, a qual, serei sempre grata.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, em especial ao Fábio, Cristiano, Éder, Ísis, Sara e Ana pelos ensinamentos, ajuda, amizade e colaboração.

A minha amiga Elede, pela alegria, ajuda e amizade.

A todas as minhas amigas pelos momentos de descontração.

À indústria Vicunha Têxtil, pela colaboração e fornecimento dos corantes e amostras de efluentes.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições e sugestões apresentadas na redação da elaboração final da tese.

Ao Cosme, pela eficiência e competência, todas as vezes que necessitei.

Ao pessoal da Neotex Consultoria Energética e Ambiental, pelos cursos oferecidos e experiência profissional.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa.

Muito Obrigada

Elisângela

ÍNDICE GERAL

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1. A Industria Têxtil no Brasil e no Mundo.....	3
2.2. O Processo têxtil.....	4
2.3. A industria têxtil e o meio ambiente.....	5
2.3.1. Características do efluente têxtil e seus principais contaminantes.....	6
2.4. Processos de tratamento em efluentes têxteis.....	7
2.4.1. Tratamento de efluente primário.....	8
2.4.2. Tratamento de efluente secundário.....	9
2.4.3. Tratamento de efluentes terciário.....	10
2.5. Corantes têxteis e sua liberação no ambiente.....	11
2.5.1. Formação de aminas aromáticas.....	14
2.6. Métodos de descoloração utilizados.....	16
2.7. Biodegradação dos azo corantes reativos por microrganismos.....	19
2.8. Corantes e saúde humana.....	22
2.9. Legislação brasileira para coloração das águas.....	23
3.0. OBJETIVOS.....	25
4.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Local.....	26
4.2. Materiais.....	26
4.2.1. Pontos de amostragem da estação de tratamento de efluentes.....	26
4.2.2. Microrganismos utilizados.....	26
4.2.3. Corantes Utilizados.....	26

4.2.4. Meios de Cultura e soluções utilizadas.....	27
4.2.4.1. Meio Nutriente.....	27
4.2.4.2. Glicose, extrato de levedura, amido e ácido fólico.....	27
4.2.4.3. Composição da solução de vitaminas do ácido fólico.....	27
4.2.4.4. Meio mínimo de sais minerais para bactérias.....	27
4.2.4.5. Meio de cultivo.....	28
4.2.4.6. Solução tampão fosfato de potássio.....	28
4.2.4.7. Solução tampão fosfato de sódio.....	28
4.2.4.8. Testes bioquímicos para identificação de bactérias.....	28
4.2.4.9. Colorações utilizadas.....	29
4.2.4.10. Reagentes utilizados.....	29
4.3. Métodos.....	30
4.3.1. Inóculo.....	30
4.3.2. Análise da descoloração por espectrofotometria.....	30
4.3.3. Determinação do potencial hidrogeniônico.....	31
4.3.4. Análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO).....	31
4.3.5. Análise da curva de crescimento bacteriano.....	32
4.3.6. Análise de adsorção dos corantes.....	32
4.3.7. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	32
4.4. Experimentos.....	33
4.4.1. Isolamento dos microrganismos.....	33
4.4.2. Pré-seleção dos microrganismos.....	36
4.4.3. Seleção de um substrato como fonte de carbono.....	36
4.4.4. Seleção de microrganismos em condições aeróbias e microaeróbias	37
4.4.5. Crescimento das linhagens sob condições aeróbias em diferentes meios de cultivo.....	38
4.4.6. Crescimento das linhagens sob condições microaeróbias em diferentes meios de cultivo.....	38
4.4.7. Efeito da agitação nas linhagens inoculadas em condições microaeróbias.....	39
4.4.8. Identificação das linhagens selecionadas.....	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. Isolamento dos microrganismos.....	41
5.2. Pré-seleção dos microrganismos.....	41
5.3. Seleção do substrato como fonte de carbono.....	43
5.4. Seleção dos microrganismos sob condições aeróbias e microaeróbias	48
5.5. Crescimento das linhagens sob condições aeróbias em diferentes meios de cultivo.....	50
5.5.1. Comportamento das linhagens em meio de sais não tamponado.....	51
5.5.2. Comportamento das linhagens em meio tamponado com fosfato de potássio .	56
5.5.3. Comportamento das linhagens em meio de sais com adição de ácido fólico....	59
5.6. Discussão sobre a descoloração e redução da DQO nos corantes testados nos diferentes meios de cultivo.....	63
5.7. Crescimento das linhagens sob condições microaeróbias em diferentes meios de cultivo.....	65
5.7.1. Comportamento das linhagens em meio de sais contendo 0,1 % de glicose....	66
5.7.2. Comportamento das linhagens em meio de sais contendo ácido fólico e ausência do extrato de levedura.....	69
5.8. Efeito da agitação na descoloração e DQO após crescimento das linhagens sob condições microaeróbias.....	72
5.8.1. Efeito da agitação na descoloração.....	72
5.8.2. Efeito da agitação na DQO.....	74
5.8.3. Efeito da descoloração dos corantes através das mudanças no espectro de absorção.....	77
5.8.4. Análise cromatográfica da degradação dos corantes.....	89
5.8.4.1. RB 220.....	90
5.8.4.2. RR 198.....	94
5.9. Identificação das linhagens selecionadas.....	99
6. CONCLUSÕES.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICE.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupo reativo clorotriazina.....	12
Figura 2. Grupo reativo sulfatoetilsulfonila.....	12
Figura 3. Estrutura química do corante azo Vermelho Reativo RR 198.....	13
Figura 4. Estrutura similar ao Reactive Blue RB 220.....	14
Figura 5. Aminas aromáticas derivadas da degradação de corantes.....	15
Figura 6. Fluxograma simplificado da Estação de tratamento de efluentes de uma indústria têxtil, localizada em Itatiba.....	34
Figura 7. Metodologia de isolamento dos microrganismos a partir do efluente industrial.....	35
Figura 8. Porcentagem de descoloração dos corantes pelas linhagens pré-selecionadas na presença de glicose como substrato.....	46
Figura 9. Porcentagem de descoloração dos corantes pelas linhagens pré-selecionadas na presença de amido como substrato.....	46
Figura 10. Descoloração dos corantes pelas linhagens selecionadas sob condições aeróbias.....	48
Figura 11. Descoloração dos corantes pelas linhagens selecionadas sob condições microaeróbias.....	50
Figura 12 DQO das linhagens selecionadas após crescimento em meio de sais não tamponado.....	52
Figura 13. Curva de crescimento X descoloração das linhagens em meio de sais não tamponado contendo os corantes RR 198 (linha vermelha) e RB 220 (linha azul).....	53
Figura 14. Espectros UV-VIS após crescimento das linhagens selecionadas em meio não tamponado contendo corante azul RB 220.....	54
Figura 15. Espectros UV-VIS após crescimento das linhagens selecionadas em meio de sais não tamponado contendo corante RR 198.....	55
Figura 16. Comparação dos gráficos obtidos a partir do experimento com células bacterianas não autoclavadas (A) e autoclavadas (B) para verificar adsorção abiótica em meio não tamponado.....	56

Figura 17. DQO das linhagens selecionadas após crescimento em meio de sais tamponado com fosfato de potássio.....	57
Figura 18. Curva de crescimento X descoloração das linhagens em meio de sais tamponado contendo os corantes RR 198 (linha vermelha) e RB 220 (linha azul).....	58
Figura 19. Comparação dos gráficos obtidos a partir do experimento com células bacterianas não autoclavadas (A) e autoclavadas (B) para verificar adsorção abiótica em meio tamponado.....	59
Figura 20. DQO das linhagens selecionadas após crescimento em meio de sais contendo ácido fólico.....	60
Figura 21. Curva de crescimento X descoloração das linhagens selecionadas em meio de sais contendo ácido fólico com os corantes RB 220 (linha azul) e RR 198 (linha vermelha).....	62
Figura 22. Comparação dos gráficos obtidos a partir do experimento com células bacterianas não autoclavadas (A) e autoclavadas (B) para verificar adsorção abiótica em meio com ácido fólico.....	63
Figura 23. Descoloração após crescimento das linhagens em meio contendo 0,1% de glicose.....	67
Figura 24. DQO após crescimento das linhagens em meio contendo 0,1% de glicose..	68
Figura 25. DQO após crescimento das linhagens em meio contendo 0,5% de glicose e 0,1% de extrato de levedura em condições microaeróbias.....	68
Figura 26. Descoloração após crescimento das linhagens em meio contendo 0,5% de glicose e 0,25 % de ácido fólico.....	70
Figura 27. DQO após crescimento das linhagens em meio contendo 0,5% de glicose e 0,25% de ácido fólico	71
Figura 28. Descoloração após crescimento das linhagens em meio de sais contendo corante RB 220 e RR 198 sob condições microaeróbias seguidas de agitação e adsorção abiótica nas células bacterianas autoclavadas.....	73
Figura 29. DQO durante sete dias de crescimento sob condições de agitação em meio contendo o corante RB 220.....	75
Figura 30. DQO durante sete dias de crescimento sob condições de agitação em	

meio contendo o corante RR 198.....	76
Figura 31 Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-3 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra.....	80
Figura 32. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-11 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra.....	82
Figura 33. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-31 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra.....	84
Figura 34. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-39 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra.....	86
Figura 35. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-46 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra.....	88
Figura 36. Cromatogramas obtidos a partir da degradação do corante RB 220 no 7º dia de incubação microaeróbia e após o 7º dia de agitação com as linhagens VN-3, 31 e 39 no λ de 350 nm.....	91
Figura 37. Cromatogramas obtidos a partir da degradação do corante RB 220 no 7º dia de incubação microaeróbia e após o 7º dia de agitação com as linhagens VN-3, 31 e 39 no λ de 254 nm.....	93
Figura 38. Cromatogramas obtidos a partir da degradação do corante RR 198 no 7º dia de incubação microaeróbia e após o 7º dia de agitação com as linhagens VN-3, 31 e 39 no λ de 272 nm.....	95
Figura 39. Sobrenadante do meio após crescimento com as linhagens bacterianas que descoloriram o corante RB 220, visualizadas em condições microaeróbias (M) e após agitação (A) em relação ao controle (Ctrl).....	97
Figura 40. Sobrenadante do meio após crescimento com as linhagens bacterianas que descoloriram o corante RR 198, visualizadas em condições microaeróbias (M) e após agitação (A) em relação ao controle (Ctrl).....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Processo de Tratamento de Efluentes.....	8
Tabela 2. Crescimento visual das 17 linhagens selecionadas em meio mínimo de sais minerais contendo azocorantes como única fonte de carbono em meio líquido e sólido..	42
Tabela 3. Porcentagem de descoloração dos corantes na presença de glicose como substrato pelas linhagens pré-selecionadas.....	44
Tabela 4. Porcentagem de descoloração dos corantes na presença de amido como substrato pelas linhagens pré-selecionadas.....	45
Tabela 5. pH final do sobrenadante das linhagens no meio não tamponado.....	52
Tabela 6. pH final do sobrenadante das linhagens no meio tamponado.....	57
Tabela 7. pH final do sobrenadante das linhagens no meio com adição de ácido fólico..	60
Tabela 8. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-3.....	81
Tabela 9. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-11.....	83
Tabela 10. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-31.....	85
Tabela 11. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-39.....	87
Tabela 12. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-46.....	89
Tabela 13. Resultados dos testes de identificação bioquímica e fisiológica das linhagens VN-3, 11, 31, 39 e 46.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

DQO	Demanda Química de Oxigênio
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
RB 220	Reactive Blue 220
RR 198	Reactive Red 198
MDIC	Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior
ITMF	Internacional Textile Manufacturers Federation
OMC	Organização Mundial do Comércio
ABNT-NBR	Associação Brasileira de Normas Técnicas
EDTA	Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufactures
AOX	Adsorbable Organic Halogen

RESUMO

A expansão do parque industrial têxtil no Brasil tem aumentado o consumo de azo corantes reativos, utilizados no tingimento de algodão. Este aumento é devido a maior produção deste, devido às condições climáticas, que favorece o seu plantio.

Estudos que esclareçam a biodegradação de azo corantes reativos são necessários, a fim de aprimorar os processos de tratamento de efluentes, que não tem sido efetivos para a remoção destes corantes. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos de efluentes têxteis, capazes de descolorir e ou degradar os azocorantes reativos RB 220 e RR 198, bem como obter mais informações, para aprimorar os processos de tratamentos existentes. Além disso, estudou-se a redução da demanda Química de Oxigênio (DQO), dos meios de cultivo contendo os corantes. Os microrganismos foram isolados do efluente através da técnica de semeadura em superfície. Uma pré-seleção, com 62 linhagens de bactérias foi realizada, através de crescimento visual, em meio líquido e sólido, onde os corantes foram empregados como única fonte de carbono a 0,03%. Foram pré-selecionadas 17 linhagens, onde foi feito um estudo e, constatou-se a necessidade da presença de uma fonte extra de carbono para auxiliar a descoloração. Três linhagens foram selecionadas e testadas quanto à descoloração e, redução da DQO em meio líquido com agitação, variando-se o pH, concentração de açúcar e introduzindo ácido fólico. Cinco linhagens foram selecionadas, quanto à capacidade de descoloração e redução da DQO em condições microaeróbias variando-se a concentração de glicose, extrato de levedura e ácido fólico. As análises de descoloração e ou degradação foram realizadas por espectrofotometria. Confirmou-se a degradação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A descoloração e ou degradação dos corantes ocorreu para todas as linhagens, variando a extensão da descoloração. A redução na DQO pelas bactérias apresentou valores altos, quando em condições aeróbias. Após estudo as linhagens foram identificadas como sendo *Bacillus* sp, *Trichococcus* sp e *Enterobacter* sp.

ABSTRACT

The expansion of the industrial textile park in Brazil has increased the consumption of azo-reactive dyes, used in the dyeing of cotton. This increase is due to the greater production of cotton, owing to climatic conditions, which favour its growth.

Studies, which elucidate the biodegradation of reactive azo dyes, are necessary to perfect effluent treatment processes, which have not been effective for the removal of these dyes. The objective of this work was to isolate microorganisms from textile effluents able to decolourise or degrade reactive azo dyes RB 220 or RR 198 or both, and to obtain more information to improve existing treatment processes. In addition, the reduction in the Chemical Oxygen Demand (COD), of the culture media containing dye was also investigated. The microorganisms were isolated from the effluent using the surface-seeding technique.

A pre-selection, with 62 bacterial strains, was undertaken, through visual growth, in liquid and solid media, with dyes as the only carbon source (0.03%). Seventeen strains were pre-selected and a study carried out, in which it was found that the presence of an extra carbon source was needed to aid discoloration. Three strains were selected and tested for their ability to discolor and reduce the COD, when grown in a liquid medium with agitation, glucose and folic acid. Five strains were selected for their discoloration capacity, reduction in COD in microaerobic conditions, varying the concentration of glucose, yeast extract and folic acid vitamin. Either the discoloration or degradation analyses or both were realised via absorbance and scanning spectrophotometry. The degradation was confirmed by high-performance liquid chromatography. Some discoloration occurred for all the strains. A greater reduction in the COD by the bacteria was observed under aerobic conditions. The strains were identified as *Bacillus* sp, *Trichococcus* sp and *Enterobacter* sp.

1. INTRODUÇÃO

Uma das características principais do ser humano é utilizar as forças e os materiais do meio ambiente em benefício próprio. O enorme e rápido crescimento das populações humanas em todo mundo levam a uma necessidade crescente de aumentar esta produção.

Devido à moda dos descartáveis e, a tendência de possuir sempre os modelos mais modernos, dos diversos materiais oferecidos para uso, à chamada sociedade de consumo, somados a necessidade de produção, faz com que as indústrias se proliferem, consumindo quantidades cada vez maiores de matérias primas, gerando poluição e outros inconvenientes para o meio ambiente.

O processo de industrialização no Brasil teve seu início com a indústria têxtil. Suas raízes precedem a chegada e a ocupação do país pelos portugueses, porém, os índios que aqui habitavam, já exerciam atividades artesanais, utilizando-se de técnicas primitivas de entrelaçamento manual de fibras vegetais e, produzindo telas grosseiras para várias finalidades, inclusive para proteção corporal.

Hoje, a indústria têxtil pode ser considerada um dos setores mais importantes da economia brasileira, com grande peso na balança comercial. É formada por 30 mil empresas que geram mais de 1,5 milhões de empregos diretos e, faz do Brasil o 7º maior produtor têxtil mundial. Em 2003, este setor apresentou um faturamento de US\$ 22,7 bilhões de acordo com o Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (MDIC).

Sabe-se, no entanto, que as indústrias têxteis são geradoras de cargas poluentes, que lançadas ao meio ambiente causam sérios problemas. Estas indústrias são grandes consumidoras de água, utilizada como meio de transporte para os produtos químicos do processo têxtil, bem como para a remoção do excesso dos produtos indesejáveis para os tecidos. Os despejos resultantes destes processos geram efluentes com compostos orgânicos como amido, dextrinas, gomas, graxas, pectinas, ácidos, sabões, detergentes e inorgânicos como hidróxido de sódio, carbonato, sulfato e cloreto. Os corantes sintéticos das seções de tingimento e acabamento geram grandes problemas para o

gerenciamento de efluentes, pois mesmo em pequenas concentrações causam coloração visível inaceitável para a população.

Os efeitos sobre os organismos vivos presentes no meio ambiente estão relacionados à toxicidade aguda ou crônica, ligados a reprodução e crescimento. Os riscos para a saúde humana variam com a forma e o tempo de exposição, bem como as etapas de biotransformação dos mesmos quando ingeridos.

A implementação de leis e normas ambientais, cada vez mais restritivas e, a criação de mercados cada vez mais competitivos, vem exigindo que as empresas sejam mais eficientes, do ponto de vista produtivo e ambiental. Isto levaria a um aumento na produção industrial, aliado a um menor gasto de insumos e menor geração de poluentes. A partir deste conceito, várias técnicas de tratamento de efluentes para remoção da cor tem sido empregados.

Os corantes não são degradados pelos tratamentos convencionais de lodos ativados e, necessitam de tratamento físico-químico para remover a cor do efluente. Métodos como coagulação química, floculação e adsorção em carbono ativado são usados. Estes, apenas transferem o problema, devido à quantidade apreciável de lodo colorido gerado a ser disposto em aterros.

Através da biorremediação, efluentes e resíduos tratados com microrganismos, aceleram o processo de degradação de compostos perigosos e substâncias tóxicas. A digestão anaeróbia de efluentes têxteis tem sido uma técnica promissora, segura ambientalmente e de baixo custo. Algumas classes de corantes como os que apresentam a função azo, decompõem-se em condições anaeróbicas ou microaeróbicas, eliminando a cor do efluente. Os produtos da redução podem então ser tratados usando tratamentos biológicos, tornando seus produtos finais menos prejudiciais. Entre os microrganismos ligados a biorremediação e descoloração de corantes estão as culturas de bactérias puras ou consórcios. Estas são capazes de realizar a clivagem reductiva nas ligações azo deste tipo de composto, para a geração de ATP com isso reduzindo a cor.

Nos últimos anos, tem se investido o desenvolvimento de tecnologias capazes de promover a degradação de corantes até sua mineralização. A biotecnologia tem grande potencial nestas aplicações ambientais, destacando-se como uma solução efetiva para a remoção da cor em um curto período de tempo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

. Indústria têxtil no Brasil e no mundo

O ramo têxtil é um dos setores de maior tradição dentro do segmento industrial. Apresenta uma posição de destaque na economia dos países mais desenvolvidos e, é o carro-chefe de muitos dos chamados países emergentes, que devem à indústria têxtil um papel de destaque no comércio mundial. Utilizando-se como base os dados da ITMF (International Textile Manufacturers Federation), entidade que congrega os representantes dos principais países produtores, e da OMC - Organização Mundial do Comércio, verifica-se que o mercado têxtil mundial vem registrando uma significativa expansão, tanto no que se refere aos montantes produzidos, quanto ao comércio entre os grandes países produtores e consumidores. Este crescimento tem sido possibilitado pela expansão no número de consumidores em todo o mundo, pelo aumento da renda nos países mais desenvolvidos e, pela abertura dos mercados ao comércio internacional (TEXTILIA NET, 2004).

A indústria têxtil pode ser considerada um dos setores mais importantes da economia brasileira com grande peso na balança comercial. É formada por 30 mil empresas que geram mais de 1,5 milhões de empregos diretos e, faz do Brasil, o 7º maior produtor têxtil mundial. Em 2003 este setor apresentou um faturamento de US\$ 22,7 bilhões, de acordo com o Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2003). Desempenham um papel de grande relevância no processo de desenvolvimento do país, com um faturamento total equivalente a 4,4 % do PIB brasileiro e emprega cerca de 1,9 % da população ativa. Certamente este é um setor de grande importância, proporcionando o crescimento da economia interna e, a busca de novas tecnologias que contribuam para a economia do país, com forte impacto social e ambiental (CETESB, 2000).

2.2. O processo têxtil

A extrema diversidade de matérias primas e de processos de produção empregados pela indústria têxtil, causam dificuldades na caracterização dos efluentes. O processo industrial para o algodão, especificado abaixo, por ser bastante complexo serve de base às demais indústrias.

Matéria prima: O algodão é recebido em fardos que sofrem o processo de abertura e mescla para a uniformização da qualidade.

Preparação e fiação: Limpeza e paralelização das fibras, o fio é produzido em filatórios e enrolados em rolos ou cones.

Tingimento do fio: O fio é submetido a uma lavagem alcalina para a remoção de gorduras do algodão e, em seguida, passa pelo processo de tingimento, este é o primeiro local do processo onde encontramos efluentes.

Engomagem: Aplicação de amido para atribuir ao fio resistência mecânica na tecelagem. A DBO (Demanda Química de Oxigênio) do processo é bastante elevada.

Tecelagem: Transformação do fio em tela plana (pano), é um processo seco.

Chamuscagem e Desengomagem: O tecido é chamuscado ao contato com a chama direta para a eliminação da pelúcia. Em seguida, a goma de amido é retirada com produtos químicos e enzimas que provocam sua hidrólise.

Acabamento: No acabamento, o tecido passa por três processos:

- a- Pré-lavagem: onde ocorre realmente a desengomagem.
- b- Cozimento: banho alcalino com detergentes para remoção dos óleos orgânicos do algodão.
- c- Alvejamento: remoção da cor natural do algodão com hipoclorito ou peróxido.

Mercerização: O tecido acabado é submetido a um banho alcalino sob tensão, para as fibras adquirirem resistência e brilho.

Estamparia/Tinturaria/Inspeção: Aplicação de cor ou transferência de imagens para o tecido através de corantes e pigmentos e, a inspeção antes de sair da indústria (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

2.3. A indústria têxtil e o meio ambiente

A indústria têxtil é poluidora e, os poluentes estão presentes em altas concentrações, que associados a grandes vazões, conferem ao efluente final uma carga considerável. A maior parte desta carga é constituída por impurezas inerentes à matéria prima, como produtos para facilitar os processos de fiação e tecelagem e corantes eliminados durante as diferentes etapas do acabamento. Dentre os poluentes, existem aqueles que causam efeitos nocivos imediatos sobre o corpo receptor, como: pH, DBO, temperatura, compostos solúveis em hexana e sólidos. Outros como DQO, corantes e detergentes podem causar efeitos prejudiciais, dependendo do tempo de exposição e, das características do corpo receptor. Além dos poluentes citados, atenção especial deve ser dirigida aos tóxicos, cuja ação é danosa à vida aquática, interferindo diretamente no metabolismo, causando desequilíbrios no ecossistema como fenóis, outros compostos orgânicos aromáticos, e metais pesados (CETESB, 2000).

Nos últimos anos, a exportação de corantes no Brasil tem mostrado um aumento anual de 40%. Devido às características climáticas, o Brasil tem sua indústria têxtil predominantemente baseada em algodão (70%), o que aumenta o consumo de corantes reativos para o processo deste tecido (GUARATINI; ZANONI, 2000).

As indústrias têxteis consomem aproximadamente 15% de água, devolvendo-a, depois do processo extremamente contaminada, pois jamais atingem 100% de conversão da matéria prima em produto, e isto leva a formação de águas residuárias. A água é usada na indústria têxtil como meio de transporte para os produtos químicos do processo, bem como para a remoção do excesso destes produtos considerados indesejáveis para o fio ou tecido. O tecido absorve, do banho de tingimento, de 50 a 70% das moléculas de corantes. A solução residual do banho conserva de 20% a 40% dos corantes após os enxágües, os quais vão para a descarga dos efluentes (TUNUSSI; SOBRINHO, 2003). Dentro do contexto de contaminação das águas naturais, o setor têxtil apresenta destaque, pois gera grandes volumes de efluentes, que quando não tratados corretamente causam sérios problemas de contaminação ambiental.

2.3.1. Características do efluente têxtil e seus principais contaminantes

Os poluentes aparecem nas indústrias têxteis em concentrações elevadas que, associados a grandes vazões, conferem aos efluentes uma carga poluente considerável.

pH: Em torno de 12 quando chega à estação de tratamento e deve ser controlado numa faixa entre 5 e 9.

Temperatura: Alcança 60°C no início. O controle até 40°C no máximo é necessário, pois com alta temperatura a solubilidade do O₂ no efluente diminui. A elevação de temperatura no corpo receptor, quando este recebe efluentes, não deverá exceder a 3 °C (LEGISLAÇÃO ESTADUAL, 1986).

DBO: Quantidade de O₂ necessário à oxidação bioquímica dos compostos orgânicos degradáveis existentes no efluente. Depende muito do processo produtivo, geralmente é elevada.

DQO: Medida da quantidade de agente oxidante químico energético necessário para oxidar a matéria orgânica de uma amostra expressa em unidades equivalentes de mg de O₂ por litro. As matérias orgânicas e inorgânicas da amostra são oxidadas em meio ácido, por quantidades conhecidas de um agente oxidante forte. A quantidade da matéria oxidada expressa como equivalente em oxigênio, é proporcional a quantidade do agente oxidante consumido (ABNT-NBR 10357,1988).

Compostos orgânicos aromáticos: provém dos espessantes sintéticos e corantes. (CETESB, 2000).

Cor: Não se pode atribuir coloração ao rio (há padrões estabelecidos para a qualidade). Valores acima de 1 mg.L⁻¹ são críticos segundo EDTA (Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigments Manufactures).

AOX: Produtos orgânicos halogenados. É uma medida para identificar e quantificar em mg/L qualquer substância orgânica que contenha um halogênio quimicamente ligado, sendo que o flúor ainda não está contido no grupo. A grande parte dos corantes reativos contém grupos cíclicos halogenados.

Metais pesados: íons metálicos ligados à moléculas de corantes (Cu, Cr, Co e Ni). Regulados por leis que fixam os limites de concentração que não devem ser ultrapassados; Ex: Cu - 250 ppm, Cr - 100 ppm, Co - 500 ppm e Ni - 200 ppm (SALEM, 1995).

2.4. Processos de tratamento em efluentes têxteis

A implantação de uma estação de tratamento de esgotos tem por objetivo a remoção dos principais poluentes presentes nas águas residuárias, retornando-as ao corpo d'água sem alteração de sua qualidade. As águas residuárias de uma cidade compõem-se dos esgotos sanitários e industriais, sendo que estes, em caso de geração de efluentes muito tóxicos, devem ser tratados nas próprias indústrias (INFORME INFRA-ESTRUTURA, 1997).

Os processos empregados para tratamentos de efluentes líquidos podem ser classificados genericamente como: primários ou mecânicos, secundários ou biológicos e terciários ou físico-químicos que são empregados na indústria têxtil (Tabela 1). A escolha do processo, ou seqüência de processos, depende das características do efluente, qualidade requerida após o tratamento, custo, disponibilidade de área e de tecnologia adequada. Os efluentes gerados nos processos da indústria têxtil apresentam elevadas cargas orgânicas, para o qual se recomenda o processo biológico (UNEP, 1994).

O tratamento dos despejos das indústrias têxteis devem considerar como alternativas de redução: um menor consumo de água e produtos, realizar modificações no processo e, manter boa manutenção. Devem ser cuidadosamente planejados, devido às variações súbitas de vazão e de produtos químicos empregados no processo (BRAILE; CAVALCANTI, 1993).

Tabela 1. Processos de tratamento de efluentes

Tratamento	Tipo de processo	Operação Unitária
Primário	Físico	Equalização, Gradeamento, Clarificação/Sedimentação e Flotação.
	Químico	Neutralização Coagulação/Precipitação.
Secundário	Biológico	Lodos ativados, Lagoas de Estabilização e Filtros Biológicos.
	Físico/Químico	Carvão ativado
Terciário	Químico	Coagulação/Precipitação Ozonização e Cloração
	Físico	Clarificação (Carvão ativado) Ultrafiltração.
Avançado	Físico	Osiose Reversa

Fonte; UNEP-United Nations Environment Programme- Technical Report n.16 – “The Textile Industry and Environment”, 1994.

2.4.1. Tratamento de efluente primário

O tratamento primário é dividido em três etapas, sendo elas, o gradeamento, equalização e clarificação.

O gradeamento têm como função remover os sólidos grosseiros e em suspensão, evitando o entupimento de tubulações e bombas. A etapa de equalização é necessária devido as grandes variações dos efluentes têxteis. Consiste em um tanque onde o efluente bruto fica estacionado por um curto período de tempo. Na clarificação ou sedimentação ocorre a remoção de sólidos por gravidade, onde pode estar acoplada

a neutralização, coagulação e precipitação. Nessa operação ocorre remoção de 5 a 15 % da DBO e uma porção considerável de sólidos em suspensão.

A coagulação química e a precipitação pode ser uma etapa do tratamento primário ou terciário; trata-se da adição de compostos químicos como sulfato de alumínio, soda ou sais de ferro, para a remoção de colóides e materiais orgânicos ou inorgânicos em suspensão. Corantes dispersos podem ser removidos por coagulação enquanto que os reativos não são afetados (PERES; ABRAHÃO, 1995). No processo de flotação ocorre a separação de sólidos em suspensão e de óleos e graxas, auxiliada pela introdução de finas bolhas de ar, onde os sólidos se fixam nas bolhas e flutam. Esses sólidos são removidos por raspadores superficiais de lodo (NEOTEX, 1998).

2.4.2. Tratamento de efluente secundário

O tratamento de efluente secundário remove sólidos em suspensão, matéria orgânica não sedimentável e, nutrientes como nitrogênio e fósforo. Ocorre através de processos biológicos, onde a ação de microrganismos pode ser feita por via aeróbia ou anaeróbia. Após essa fase, a remoção da DBO deve alcançar 80% ou 60mg.L^{-1} conforme o padrão de lançamento previsto na legislação ambiental. Os mais utilizados são os processos de lodos ativados, filtros biológicos e lagoas de estabilização. O sistema de lodo ativado é mecanizado e aeróbio, onde a remoção da matéria orgânica é feita pelas bactérias que crescem no tanque de aeração e formam uma biomassa a ser sedimentada no decantador. O lodo do decantador é retornado, por bombeamento, ao tanque de aeração, para aumentar a eficiência do sistema. O oxigênio é fornecido por aeradores mecânicos, tubulações de ar no fundo do tanque ou O_2 líquido. No tratamento por filtros biológicos a estabilização da matéria orgânica é realizada por bactérias que crescem aderidas a um suporte de pedras ou materiais sintéticos. O efluente é aplicado na superfície através de distribuidores rotativos, percola pelo tanque e sai pelo fundo. A matéria orgânica fica retida pelas bactérias do suporte, permitindo uma eficiência na remoção da DBO de 80 a 93% e, a eliminação de patógenos entre 60 e 90%, porém, há à necessidade de tratamento do lodo gerado.

As lagoas de estabilização exigem uma área extensa para a instalação, onde o efluente sofre o processo aeróbio, devido à existência de plantas verdes, que oxigenam a água. A remoção da DBO fica entre 70 e 90% e de coliformes de 90 a 99%. Sofre variações das condições atmosféricas e produzem maus odores (INFORME INFRA-ESTRUTURA, 1997).

Bioreatores anaeróbicos podem ser usados pelo menos parcialmente para tratar efluentes, fornecendo algumas vantagens significativas. A característica mais atrativa é a descoloração de muitos corantes. Este tipo de tratamento também produz muito pouco volume de lodo quando comparado ao aeróbico, sendo que a aeração não é necessária, o que representa um processo com grande potencial econômico (DELÉE et al.;1998).

2.4.3. Tratamento de efluentes terciário

Para os tratamentos terciários e avançados utilizam-se métodos como coagulação química, ozonização, cloração, e osmose reversa. São empregados para a remoção da cor dos efluentes do tratamento secundário, bem como a remoção de sólidos em suspensão e matéria orgânica residual (PERES; ABRAHÃO, 1995). O emprego do carvão ativado, juntamente com o processo de lodo ativado, são os mais difundidos na área têxtil. As propriedades adsorptivas do carvão dependem do tamanho de seus poros e do tempo de contato para a obtenção do equilíbrio. Este é eficiente na remoção de anilinas, nitrobenzenos, fenóis voláteis e corantes azóicos (SHEN; ZHAO, 1991). Nos tratamentos de osmose reversa utiliza-se uma força mecânica elevada para fazer o solvente, usualmente a água, passar através de uma membrana, retendo os componentes dissolvidos para concentrar os mesmos e purificá-los. A ultrafiltração utiliza pressões menores e é similar a osmose reversa. A evaporação consiste na vaporização de líquidos de uma solução ou lama para concentrar o substrato (NEOTEX, 1998). Outras técnicas envolvem oxidação química usando hipoclorito de sódio para remoção da cor, entretanto, liberam grandes quantidades de aminas aromáticas que são carcinogênicas ou outros compostos tóxicos o que, conseqüentemente, agravam o problema (PORTER, 1990). Em todos os exemplos citados tem sempre uma carga

orgânica residual não removida e presença de cor em quase todos os efluentes. Os corantes ficam de forma solúvel nos efluentes e muitos se adsorvem no lodo gerado nas mais variadas etapas do tratamento, sendo somente transferidos da fase líquida para a sólida. Por esse motivo muitas vezes preconiza-se a aplicação de métodos combinados (PERES; ABRAHÃO, 1995).

2.5. Corantes têxteis e sua liberação no ambiente

Os corantes geralmente apresentam um grupo cromóforo que dá cor ao composto pela absorção de uma parte de energia radiante. São classificados de acordo com sua estrutura química, (antraquinona, azo e etc) ou de acordo com o método pelo qual ele é fixado à fibra têxtil natural ou sintética. De acordo com esta classificação podem ser reativos, diretos, azóicos, aniônicos (ácidos e básicos) a cuba, de enxofre, dispersivos, pré-metalizados e branqueadores (CIÊNCIA HOJE, 2001).

Os corantes reativos são extensivamente usados nas indústrias têxteis, por possuírem uma ampla variedade de cores, alta solubilidade em água, estabilidade, fácil aplicação, com um consumo mínimo de energia (ASPLAND, 1997). Além do algodão são usados para coloração de lã e fibras sintéticas, como as poliamidas (TAYLOR, 2000). O uso destes corantes está aumentando e pode chegar à marca dos 50 % no ano de 2004 (YOUNG; SPYROS, 2004). A molécula do corante reativo pode ser definida pelos seguintes sistemas estruturais: sistema cromofórico, que é parte responsável pelo fenômeno da cor; um grupo sulfonato, responsável pela solubilidade e caráter aniônico do corante; e um grupo reativo, que pode formar ligações covalentes com as fibras de celulose por reações de adição ou substituição nucleofílica (ZOLLINGER, 1991). Estes grupos reativos são capazes de formar ligações covalentes com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas.

Existem numerosos tipos de corantes reativos, porém os principais possuem a função azo e antraquinona como grupo cromóforo e, os grupos clorotriazina (Figura 1) e sulfatoetilsulfonila (Figura 2) como grupo reativo. Neste tipo de corante, a reação

química se processa diretamente através da substituição do grupo nucleofílico pelo grupo hidroxila da celulose (GUARATINI; ZANONI, 2000).

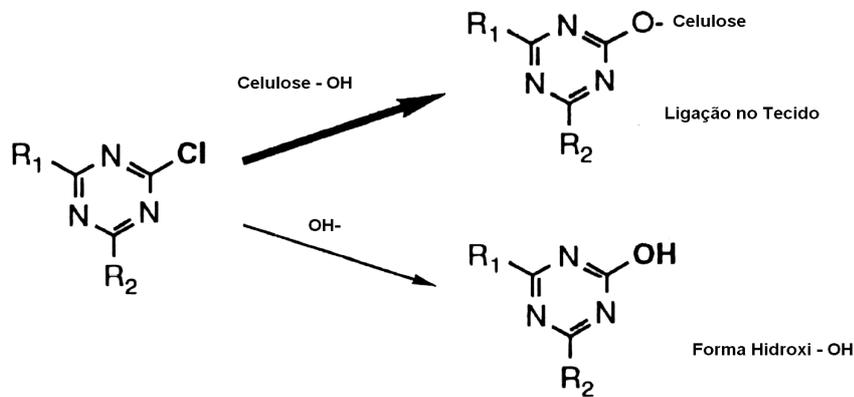


Figura 1. Grupo reativo clorotriazina.

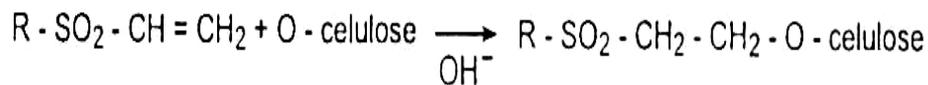
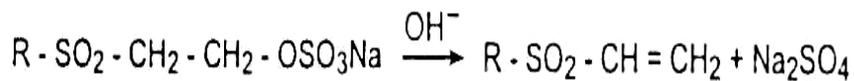


Figura 2. Grupo reativo sulfatoetilsulfonila.

De acordo com a estrutura química, os corantes mais importantes possuem a ligação azo como grupo cromóforo e são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações azo — N=N —; ligados a sistemas aromáticos (Figura 3), (MARMION, 1991).

São responsáveis por 65 % dos corantes usados em produtos têxteis, de borracha, verniz, plástico e tinta de impressão. Eles também são usados na indústria alimentícia, farmacêutica, cervejaria e cosméticos (COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993; DILLON; COMBES; BRONAUGH, 1994).

Os corantes azo incluem uma ampla classe de corantes comercialmente produzidos e não são prontamente degradados pelos microrganismos (PASZCZYNSKI; CRAWFORD, 1995).

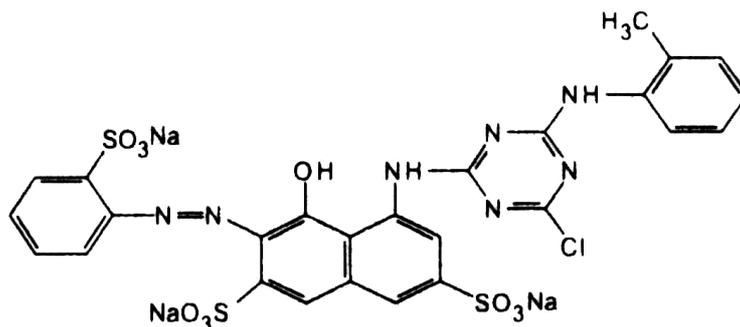


Figura 3. Estrutura química do corante azo vermelho reativo RR 198.

O corante vermelho reativo (Reactive Red 198) é bifuncional, possui um grupo vinilsulfona ligado ao cromóforo através do grupo clorotriazina que funciona como uma ponte. A principal característica de um corante bifuncional está ligada à utilização de baixas temperaturas no tingimento (60°C), é estável a hidrólise ácida e são mais eficientes quanto ao poder de fixação (ORCO, 2004). Estes corantes liberam cloro, que pode contribuir com 1,3% em peso para o valor de AOX das águas residuárias (DYSTAR, 2002).

Outro corante muito utilizado na indústria têxtil, o azul brilhante remazol (Reactive Blue 220) tem como grupo cromóforo a ligação azo e o grupo vinilsulfona (Figura 4) como reativo. Esses corantes possuem 4,0% de cobre de complexo metálico (DYSTAR, 2002), com isso promovem a interação entre o metal e os grupamentos funcionais, portadores de pares de elétrons livres, como os presentes nas fibras protéicas. Sua desvantagem ecológica está associada ao alto grau de cobre nas águas de rejeito (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Sendo sua concentração limite, para não ocorrer inibição da atividade biológica, de 1,5 mg.L⁻¹ (NEOTEX, 1998), e, seu valor máximo admissível pela legislação federal de 1,0 mg.L⁻¹ (RESOLUÇÃO CONAMA, 1986).

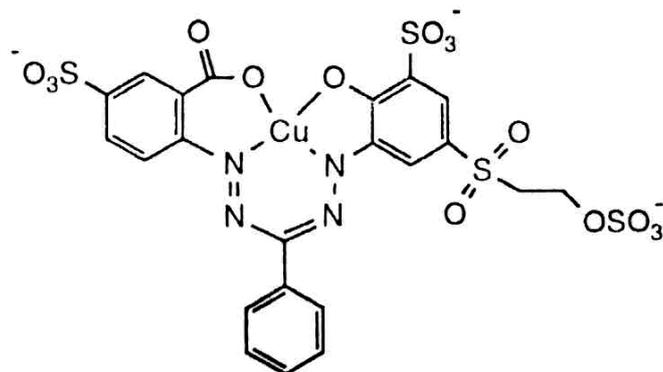


Figura 4. Estrutura similar ao corante azul reativo RB 220.

Sob condições típicas de tingimento, $\text{pH} \geq 10$, temperatura $\geq 60^\circ\text{C}$ e 60 a 100 g L^{-1} de sais, 20 - 50% destes corantes permanecem no banho na forma hidrolisada e não são fixados a fibra, resultando em efluentes coloridos (LEWIS, 1999).

Devido a sua própria natureza, os corantes são altamente detectáveis a olho nu, sendo visíveis em alguns casos em concentrações tão baixas como 1 mg L^{-1} causando mudança de coloração nos rios sendo facilmente detectada pelo público e autoridades controladoras (ZOLLINGER, 1991).

A toxicidade e carcinogenicidade de certos corantes azos em mamíferos relacionam-se com a formação de radicais livres e aminas aromáticas durante a azoredução (COLLIER; STORM; BRONAUGH, 1993).

2.5.1. Formação de aminas aromáticas

Aminas aromáticas são compostos químicos, que apresentam em sua estrutura molecular, um ou mais anéis aromáticos, carregando um ou mais substituintes amino. Pode ser uma simples anilina ou uma molécula mais complexa, com estrutura heterocíclica, ou aromáticos conjugados (Figura 5). A maior fonte de aminas no meio ambiente inclui várias indústrias do setor químico, como as refinarias de óleo, polímeros sintéticos, corantes, farmacêuticas, pesticidas e explosivos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004).

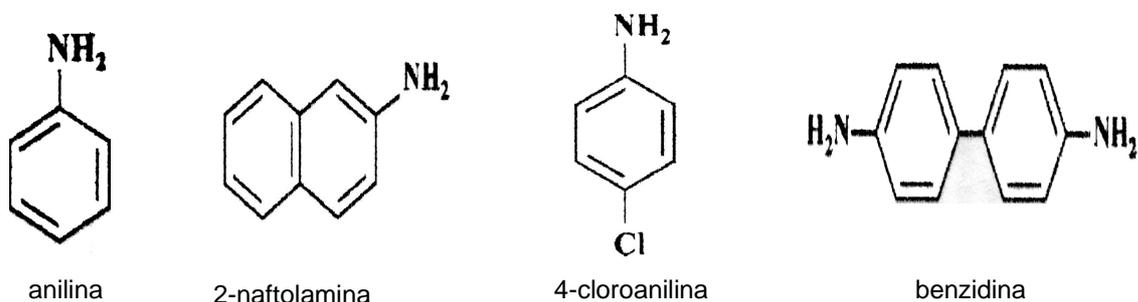


Figura 5. Aminas aromáticas derivadas da degradação de corantes.

A primeira preocupação com a exposição humana a aminas aromáticas carcinogênicas está nas indústrias de corantes, devido à possibilidade dos azocorantes serem quebrados durante o uso de seus constituintes nessas aminas. Isto tem sido demonstrado por uma variedade de condições ecológicas, incluindo as condições encontradas no trato digestivo de mamíferos (CHUNG; CERNIGLIABE, 1992). O processo de redução dos azocorantes a aminas aromáticas é um dos modos de degradação. Outros são através da foto-degradação e biodegradação por meio de hidroxilação, oxidação e hidrólise (PIELESZ, 1999). Devido à associação da toxicidade do corante com seu caráter hidrofóbico, baixa toxicidade foi alcançada através da introdução de uma parte polar na estrutura do corante, resultando em alta solubilidade. Para isso a sulfonação tem sido amplamente utilizada. Entretanto estas características podem impedir sua remoção nas estações de tratamento através da adsorção na biomassa microbiana (BENIGNI; PASSARINI, 2002).

Os azocorantes são conhecidos pela sua resistência a biodegradação em condições aeróbias, com exceção de poucos corantes. A característica recalcitrante dos azocorantes é atribuído à presença dos grupos sulfonados e das ligações azo, ambos considerados xenobióticos (RIEGER et al., 2002). As aminas aromáticas formadas em condições anaeróbias podem ser posteriormente degradadas sobre condições aeróbias (O'NEILL et al., 2000). Mustafá e Sponza (2003) observaram a formação da amina aromática benzidina após degradação anaeróbia do corante Preto Direto 38, por linhagens de *E. coli*. As mesmas benzidinas não foram detectadas após condições

aeróbias, indicando que foram degradadas sob estas condições. Ao mesmo tempo microrganismos aeróbios removeram uma quantidade significativa de DBO e DQO do efluente (YU et al., 2000).

2.6. Métodos de descoloração utilizados

Os corantes reativos são altamente solúveis em água e, ligam-se covalentemente com os grupos OH da celulose do algodão e, com os grupos NH₂ das fibras de lã e poliamidas. Também reagem com os grupos OH da molécula de água, que não se ligará à fibra, indo para o do efluente. Uma grande quantidade de NaCl e Na₂SO₄ são adicionados nos processos de tingimento para facilitar a ligação na fibra têxtil, contribuindo para um efluente com alta carga poluente (ZOLLINGER, 1991).

A coloração da água poluída com corantes pode ser reduzida, quando ocorre a clivagem de ligações — C = C—, — N = N — ou nos anéis aromáticos heterocíclicos. A absorção da luz pela associação das moléculas muda do visível para a região UV do espectro eletromagnético (STRICKLAND; PERKINS, 1995).

Até o momento três tipos de tratamento de efluentes para a remoção da cor são conhecidos: métodos físicos, químicos, e biológicos.

Os métodos físicos de tratamento mais comuns incluem a precipitação (coagulação, floculação, sedimentação); adsorção (carvão ativado, lodo biológico, sílica gel); osmose reversa (filtração), (KURBUS; SLOKAR; LE MARECHAL, 2002). A adsorção em carvão ativado é o mais comum para a remoção de corantes, é mais efetivo para corantes mordentes e corantes ácidos e menos efetivo para corantes reativos, dispersos e diretos. A remoção pode ser aumentada usando altas doses de carvão, porém, a cada regeneração, ocorre redução na performance (RAGHAVACHARYA, 1997). Outros materiais como lascas de madeira, misturas de cinza e carvão, sílica gel, palha de arroz e milho, também tem sido usados como adsorventes, sendo os dois últimos economicamente atrativos pelo custo e por não necessitar de regeneração, podendo ser usados posteriormente em fermentação semi-sólida, para produção de proteína enriquecida. A utilização de tecnologias de membranas, como osmose reversa, tem se tornado muito atrativo, pois possibilitam o reuso da água no processo industrial,

separando o corante do efluente. As membranas resistem à temperatura, compostos químicos e ataque microbiano. O resíduo produzido, após separação, apresenta problemas de disposição e, o entupimento das membranas ainda é um fato crítico sendo, porém, um método adequado para efluentes com baixa concentração de corantes (ROBINSON et al., 2001).

Os métodos químicos incluem a oxidação, redução e troca de íons. Em métodos químicos o principal agente oxidante utilizado é o H_2O_2 , porém, necessita ser ativado com outros compostos como luz ultravioleta. Muitos métodos de descoloração química variam dependendo do modo como o H_2O_2 , é ativado (SLOKAR; MARECHAL, 1997). A ozonização é um processo oxidativo, no qual a forma triatômica do oxigênio se decompõe rapidamente a oxigênio e espécies radiculares. O ozônio é mais poderoso quando comparado com o H_2O_2 , permitindo sua reação com uma numerosa classe de compostos. É capaz de degradar hidrocarbonetos clorados, fenóis, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos, mostrando uma preferência para as duplas ligações presentes nos corantes, permitindo um efluente sem cor e com baixa DQO (XU; LEBRUM, 1999). A vantagem da aplicação desta técnica é que o ozônio é aplicado no estado gasoso, não aumentando o volume de efluente e lodo, porém, tem um tempo de vida curto de aproximadamente 20 minutos, podendo diminuir se corantes estão presentes. Têm sua estabilidade afetada pela presença de sais, pH e temperatura (SLOKAR; MARECHAL, 1997). A maior desvantagem na utilização do ozônio ainda é o custo (XU; LEBRUM, 1999).

Os métodos biológicos envolvem tratamentos aeróbios e anaeróbios (VONCINA; MARECHAL, 2003). Existem dois métodos diferentes de tratamentos biológicos para a remoção da cor de efluentes têxteis. O mais utilizado é o tratamento aeróbio por lodo ativado, que consiste na agitação dos efluentes na presença de microrganismos e ar, durante o tempo necessário para metabolizar e flocular uma grande parte da matéria orgânica. É utilizado com maior frequência para tratar compostos persistentes, pois, são eficientes e operam em grande escala. O sistema apresenta uma eficiência relativamente alta, permitindo a remoção de aproximadamente 80% da carga de poluentes, porém, o teor de compostos adsorvidos pelos microrganismos como, por exemplo, corantes, são bastante elevados impedindo qualquer possibilidade de

reaproveitamento. É bastante susceptível a composição do efluente (cargas de choque), além de produzir um grande volume de lodo colorido (BORSOI, 1997).

Azocorantes reativos não são removidos pelo tratamento aeróbio e são problemáticos nos efluentes têxteis. A clivagem reductiva anaeróbia dos corantes azo tem-se mostrado adequada, a desvantagem deste processo tem sido a produção incerta de intermediários aromáticos carcinogênicos (BAUGHMAN; WEBER, 1994), levando um grande número de pesquisadores à estudar os compostos formados durante a degradação anaeróbia.

Alternativas recentes para o tratamento de efluentes com compostos resistentes à degradação, referem-se ao uso de agentes quelantes naturais, produzidos por alguns fungos e bactérias. Estes compostos, denominados sideróforos, apresentam uma alta afinidade por metais, principalmente ferro, formando complexos de alta estabilidade. A função biológica dos sideróforos é seqüestrar ferro em ambiente com deficiência deste (MACHUCA; AOYAMA; DURAN, 1999). Sendo alguns corantes complexados com metais, este também pode ser um método de remoção destes (OSES et al., 1998).

Para o tratamento de um dado efluente, muitas vezes, a solução é a utilização de processos combinados para uma melhor eficiência do sistema. Estes métodos podem ser utilizados de maneira complementar, de tal forma que possam suprir deficiências apresentadas pelos processos quando aplicados isoladamente (KUNZ; ZAMORA, 2002). A combinação de processos biológicos anaeróbio-aeróbios é útil, pois permitem a efetiva descoloração do efluente, quando azocorantes estiverem presentes (O'NEILL et al., 2000).

Um estudo realizado por Luangdilok e Panswad (2000), mostraram que a remoção da DQO, juntamente com 20 mg. L⁻¹ de um corante diazo antraquinona, foi efetivo usando um reator aeróbio-anaeróbio. Um total de 90% de DQO e 45% de cor foram removidos. Segundo Zaoyan (1992), 65% de remoção de cor e 74% de redução de DQO em um sistema aeróbio-anaeróbio de biodisco foi possível. Este sistema foi capaz de remover a cor em 8 horas e uma carga orgânica de 45 g DQO m³ por dia.

2.7. Biodegradação dos azocorantes por microrganismos

A descoloração por tratamentos biológicos tem motivado pesquisadores devido ao grande número de compostos capazes de serem degradados a baixo custo operacional.

Os fungos de podridão branca como *Phanerochaete chrysosporium*, são capazes de degradar a lignina, polímero estrutural da madeira e, outros compostos complexos, como dioxinas, PCBs e outros organoclorados (CHAO; LEE, 1994). Kirby (1999), mostrou que *P. chrysosporium* tem habilidade para descolorir efluentes têxteis contendo corantes artificiais em até 99% em 7 dias. A utilização de outros fungos como *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* também tem sido estudada para degradação de corantes (ABADULLA et al., 2000). Embora os fungos de podridão branca degradem corantes em fermentações líquidas, a produção de enzimas é incerta. A utilização destes fungos no meio ambiente natural é mais efetiva com fermentação semi-sólida (ROBINSON et al., 2001). Alguns autores como Swamy e Ramsay (1999), relataram a desvantagem de se utilizar fungos, pois, estes requerem baixos pHs para uma atividade enzimática ótima e um longo tempo de retenção hidráulica para a completa descoloração.

Culturas bacterianas, de uma ampla variedade de habitats, estão sendo usadas por pesquisadores para descolorir corantes. Consórcios microbianos podem realizar a biodegradação com mais sucesso do que uma linhagem individual, porém, os resultados não são facilmente reproduzidos, dificultando uma interpretação efetiva destes. Por esta razão, pesquisadores tem realizado trabalhos envolvendo uma única cultura bacteriana (CHANG; LIN, 2000).

Um mecanismo simples de remoção da cor por células bacterianas é a adsorção do corante na biomassa (BRÁS et al., 2001). Entretanto este mecanismo é similar a muitos outros métodos físicos para remoção da cor e não é adequado para tratamentos longos. Durante a adsorção o corante é concentrado na biomassa, que se torna saturada com o tempo, necessitando de disposição adequada (SOUTHERN, 1995).

Os processos de biodegradação podem ser anaeróbios, aeróbios ou envolver a combinação dos dois. Considerando a reação entre célula bacteriana e azocorante,

deve-se notar que há diferenças significantes entre a fisiologia e crescimento dos microrganismos sobre essas duas condições. Para bactérias aeróbias é necessário uma adaptação para ocorrer processos redutivos significantes. Esta adaptação envolve um longo tempo de crescimento aeróbio em culturas contínuas na presença de um composto azo simples. A bactéria sintetiza uma azoredutase específica para estes compostos, que sob condições controladas, podem clivar o grupo azo na presença de oxigênio. A redução bacteriana sobre condições anaeróbicas é inespecífica, com relação aos compostos azo envolvidos, e este tem sido o tipo de remoção de cor mais estudado para efluentes e, ainda não esclarecido (STOLZ, 2001).

Segundo Carliell; Barclay e Buckley (1996), a biorremediação anaeróbia permite a descoloração de azocorantes e outros corantes solúveis em água. Esta descoloração envolve uma reação de oxido-redução. Azocorantes agem como oxidante para o FAD reduzido. Para haver descoloração é necessária uma fonte adicional de carbono. Este carbono adicional pode ser convertido a metano e CO₂ liberando elétrons. Estes caminham pela cadeia de transporte de elétrons e, neste caso, o acceptor final é o azocorante reativo e não a molécula de O₂. A reação dos elétrons com o corante reduzem as ligações azo causando a descoloração.

Gingell e Walker (1971), demonstraram que o baixo peso molecular de mediadores redutores pode agir como transportadores de elétrons entre o azocorante e o NADH dependente de azoredutase que pode estar situada na membrana externa.

Segundo Moutaouakkil et al. (2003), a biodegradação microbiana de azocorantes, só é possível, quando a ligação azo é quebrada. A clivagem redutiva destas ligações é catalisada pela azoredutase, enzima chave na degradação destes corantes. Esta enzima tem sido estudada como sendo induzida por uma flavoproteína, que utiliza NADH e NADPH como doadores de elétrons para as ligações azo em condições microaeróbias.

Chang et al. (2001), determinou que ocorreu inibição enzimática na redução de um azocorante por *Pseudomonas luteola* relacionado à azoredutase. A inibição foi atribuída à competição pela utilização do NADH na respiração aeróbia, a qual provoca a transferência de elétrons do NADH para o O₂ para formar ATP. Nesta reação o NADH age como um doador de elétrons para a redução das ligações azo, o que leva a

descoloração bacteriana destes corantes. O consumo de NADH pela fosforilação oxidativa pode resultar em um efeito negativo sobre a descoloração pela azoredutase.

Russ, Rau e Stolz (2000), sugeriram que as membranas bacterianas são barreiras eficientes para a passagem dos corantes azo sulfonados e, também, são raramente permeáveis para os cofatores FAD e, entretanto, limitam a transferência dos elétrons das flavinas do citosol de células bacterianas não autoclavadas, para os corantes azo sulfonados adsorvidos a membrana. Desta forma em células ativas com membranas celulares intactas, outros sistemas enzimáticos e ou outros mediadores são possivelmente responsáveis pela redução dos azocorantes. Em bactérias que possuem o sistema de transporte de elétrons em suas membranas como as aeróbias ou anaeróbias facultativas, a transferência de elétrons para a cadeia respiratória das membranas celulares pelos transportadores, podem ser feitas diretamente. Se as redutases forem intracelulares este processo pode estar envolvido com mediadores diferentes dos cofatores FAD. Um pré-requisito para estes mediadores pode ser uma alta facilidade de atravessar a membrana bacteriana quando comparadas aos transportadores FAD.

Um mecanismo diferente para a redução dos compostos azo sulfonados que também não requer o transporte dos corantes pela membrana foi sugerido por Ráfii, Franklin e Cerniglia (1990), que isolaram diferentes bactérias do intestino humano (ex. *Eubacterium* sp, *Clostridium* sp, *Butyrivibrio* sp, e *Bacteroides* sp.), que descoloriram azocorantes sulfonados durante o crescimento em meio sólido ou líquido, mostrando que pelo menos uma parte da atividade da azoredutase foi extracelular, pois o sobrenadante da cultura foi capaz de descolorir os corantes sobre condições anaeróbias.

Outra possibilidade para a redução extracelular de azocorantes por microrganismos é a ação de compostos orgânicos reduzidos (Fe^{2+} , H_2S) que são formados como produtos finais de certas bactérias estritamente anaeróbias. Nestes casos os mediadores podem ter uma importante função (GLAUS et al., 1992). Dependendo das condições ambientais ou dos processos biotecnológicos, diferentes reações catalisadas por bactérias podem executar a redução dos compostos azo (RUSS; RAU; STOLZ, 2000).

Em estudos de escala laboratorial a glicose tem sido usada para fornecer uma fonte de carbono extra, esta adição pode ser um fator limitante em pequena escala. A degradação anaeróbica de corantes têxteis alcança somente a redução das ligações azo sendo que a mineralização não ocorre. Para ocorrer um processo de descoloração eficiente e esclarecer o problema de instabilidade nesses processos, são necessários mais estudos para conhecer os mecanismos relacionados com azo redução (NUTTAPUM et al., 2004).

2.8. Corantes e saúde humana

Os riscos toxicológicos dos corantes à saúde humana estão intrinsicamente relacionados ao modo e tempo de exposição como: ingestão oral, sensibilização da pele e vias respiratórias (CLARKE; STEINLE, 1995). Os corantes portadores de grupos reativos, grupos cromóforos diazo e sulfonados são configurados quimicamente para agirem eficientemente com substâncias que possuem grupos amina e hidroxila, presentes nas fibras naturais, porém, presentes também em todos os organismos vivos (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Alguns compostos não incorporados totalmente ao tecido podem causar dermatites, sobretudo em área do corpo sujeitas à transpiração. Os problemas respiratórios mais relatados são asma e rinite alérgica. Esses riscos, entretanto, são pequenos quando comparados à ingestão destes. Os riscos crônicos destes corantes estão relacionados às etapas de biotransformação dos mesmos, referentes às rotas do metabolismo destes nos organismos. Podem gerar substâncias carcinogênicas e mutagênicas como aminas aromáticas, toluidinas, benzidinas, radicais ativos entre outros. Alguns corantes com alto poder de fixação, usados para tingir peças de algodão ou seda, podem ser nocivos aos seres vivos. Durante a etapa de tintura da fibra, alguns corantes como os pré-metalizados, chegam a liberar substâncias tóxicas e altas concentrações de metais pesados. Outros podem ser acumulados por plantas expostas a efluentes da indústria têxtil e conseqüentemente passar para a cadeia alimentar, contaminando outros organismos (Ciência Hoje, 2003).

Experimentos clínicos realizados no final do século XIX na Alemanha com um corante industrial relataram que alguns empregados apresentaram câncer de bexiga (SABBIONI; RICHETER, 1990). Em indústrias onde os operários ficaram expostos à poeira de corantes foram detectados benzidina e seus metabólitos na urina dos trabalhadores. Inalação de 2mg por m³ durante 8 horas provoca a eliminação de 14 a 24 ppb destes compostos na urina. Segundo estimativas, uma eliminação de 100 ppb de benzidina e seus metabólitos aumenta o risco deste tipo de câncer. Na inalação das poeiras as partículas maiores que 7 µm são depositadas nas narinas, garganta, traquéia e brônquios, passando para o aparelho digestivo, as menores penetram nos pulmões. Entretanto, há indícios justificados de suspeita de efeitos carcinogênicos causados por determinados corantes azo, os quais podem ser metabolizados no organismo em aminas aromáticas, comprovadamente cancerígenas (ALINKER, 1986).

2.9. Legislação brasileira para coloração das águas

Divisão das águas doces conforme seu uso:

Classe Especial - águas destinadas:

- a) abastecimento doméstico sem prévia ou com simples desinfecção.
- b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas.

Classe I - águas destinadas:

- a) ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário (natação, esqui aquático e mergulho);
- d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película;
- e) à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

Nesta classe de águas os corantes artificiais devem estar virtualmente ausentes e com nível de cor natural do corpo de água em mg Pt/l.

Classe 2 - águas destinadas:

- a) ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário (esqui aquático, rotação e mergulho);
- d) à irrigação de hortaliças e plantas frutíferas;
- e) à criação natural e/ou intensiva (aquicultura) de espécies destinadas à alimentação humana.

Em águas de classe 2 não será permitida a presença de corantes artificiais que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais. A cor no corpo d'água não deve ultrapassar 75mg Pt/l.

Classe 3 - águas destinadas:

- a) ao abastecimento doméstico, após tratamento convencional;
- b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- c) a dessedentação de animais.

Em águas de classe 3 não será permitida a presença de corantes artificiais que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais. A cor no corpo d'água não deve ultrapassar 75mg Pt/l.

Classe 4 - águas destinadas:

- a) à navegação;
- b) à harmonia paisagística;
- c) aos usos menos exigentes.

Nesta classe de água os corantes devem estar virtualmente ausentes.

Não há padrões de coloração para efluentes, apenas para os corpos receptores, porém os efluentes não poderão conferir ao corpo receptor características em desacordo com o seu enquadramento (RESOLUÇÃO CONAMA, 1986).

3. OBJETIVOS

- Isolar microrganismos do efluente têxtil capazes de descolorir azocorantes;
- Verificar se as linhagens bacterianas selecionadas necessitam de uma fonte extra de carbono para degradação dos azocorantes;
- Determinar a capacidade destes microrganismos em degradarem os azocorantes azul reativo 220 (RB 220) e vermelho reativo 198 (RR 198) sob condições aeróbias e microaeróbias;
- Avaliar a capacidade de redução na DQO durante a degradação dos meios de cultivo contendo azocorantes pelos microrganismos selecionados
- Avaliar o efeito da agitação na degradação dos corantes após crescimento em microaerobiose;
- Propor uma identificação das melhores linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho para aplicação em processos de biodegradação de efluentes têxteis contaminados com azocorantes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/Departamento de Ciência de Alimentos na Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp na cidade de Campinas-SP.

4.2. Materiais

4.2.1. Pontos de amostragem da estação de tratamento de efluentes

Ponto 1: Entrada bruta;

Ponto 2: Tanque de equalização;

Ponto 3: Tanque de aeração;

Ponto 4: Recirculação de lodo.

4.2.2. Microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram isolados de amostras de efluente, a partir de vários pontos (item 4.2.1) da estação de tratamento de uma indústria têxtil, localizada na cidade de Itatiba-SP, na região de Campinas.

4.2.3. Corantes utilizados

Foram empregados os corantes sintéticos, Remazol Azul Brilhante BB 133% (C.I. RB 220) e Remazol Vermelho RB (C.I. RR 198) ambos da Dystar. Estes foram cedidos gentilmente pela indústria têxtil em estudo na forma em que esta os adquire. A concentração de corante empregada nos experimentos foi de 0,01%, (p/v) para meio líquido e 0,03% (p/v) em meio sólido.

4.2.4. Meios de cultura e soluções utilizadas

4.2.4.1. Meio nutriente (Agar e Caldo)

4.2.4.2. Glicose, extrato de levedura, amido e solução comercial de ácido fólico.

Glicose e amido foram utilizados como substrato para auxiliar na descoloração dos corantes e, o extrato de levedura e o ácido fólico, como fonte de vitaminas e nitrogênio.

4.2.4.3. Composição da solução de vitaminas de ácido fólico comercial

Solução que contém ácido fólico, amônia, metal alcalino e sais de metal alcalino terroso que pode conter na mistura como estabilizador o ácido dihidrofólico ou o ácido hidroxipolicarboxílico. Nesta condição de solubilidade pode ser estocado na presença de oxigênio por várias semanas sem ocorrer diminuição na sua bioatividade (BLUM, 1990). Esta vitamina foi utilizada nos testes de descoloração em substituição ao extrato de levedura.

4.2.4.4. Meio mínimo de sais minerais para bactérias (PELLIZARI, 1995)

K_2HPO_4	1,6g
KH_2PO_4	0,2g
$(NH_4)_2SO_4$	1,0g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01g
NaCl.....	0,1g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,02g
Água destilada.....	1000 mL
pH final.....	7,0

Este meio foi empregado como base para os testes de seleção das bactérias em meio líquido e sólido, acrescido de 2% de ágar, juntamente com 0,03% (p/v) dos corantes em estudo como única fonte de carbono. Também foi usado nos ensaios de descoloração em meio líquido, acrescido de 0,5 % de glicose e 0,1 % de extrato de levedura.

4.2.4.5. Meio de cultivo

Para o crescimento do inóculo foram empregados meio mínimo de sais minerais, e extrato de levedura a 1% (p/v). Foi utilizado 3% de inóculo de um volume final de 30 mL.

4.2.4.6. Solução tampão fosfato de potássio

Foi empregado tampão fosfato de potássio a 0,05 M nos ensaios em condições aeróbias para manter o pH final do meio em torno de 6,8.

4.2.4.7. Solução tampão fosfato de sódio

Foi empregado tampão fosfato de sódio a 0,075 M como composição da fase móvel para CLAE.

4.2.4.8. Testes bioquímicos para identificação de bactérias

- tioglicolato de sódio
- O/F Oxidação e fermentação para Gram+ e Gram -
- VP (Voges-Proskauer)
- VM (Vermelho de Metila)
- redução de nitrato a nitrito
- hidrólise da gelatina

- hidrólise da esculina
- TSI (Triple Sugar Iron Ágar)
- citrato Simmons
- teste de indol
- motilidade
- urease
- produção de ácido a partir de: manose, manitol, ramnose, arabinose, sacarose, glicose, xilose, e galactose.

4.2.4.9. Colorações utilizadas

- coloração de Gram
- coloração de esporos

4.2.4.10. Reagentes utilizados:

Determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO):

- HgSO_4 (sulfato de mercúrio)
- H_2SO_4 (ácido sulfúrico concentrado) com AgSO_4 (sulfato de prata)
- $\text{K}_2\text{CR}_2\text{O}_7$ (solução de Dicromato de Potássio 1,0 N)

Teste do KOH para confirmação do Gram:

- KOH a 3%.

Teste de catalase

- H_2O_2 a 3%.

Teste de oxidase: reagente de Kovac's

- solução 1% de Cloridrato de N,N,N,N-p-fenilenodiamina

4.3. Métodos

4.3.1. Inóculo

Quando necessário, as culturas crescidas em meio ágar nutriente inclinado e sob refrigeração a 4°C, foram reativadas em ágar nutriente, vertidos em placas de Petri. Após 24 horas de crescimento em estufa BOD a 30°C, foram transferidas para o meio de sais minerais (item 4.2.4.4) contendo 1% de extrato de levedura em Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL do meio, e incubadas em shaker a 150 rpm, por 24 horas a 30°C. Após este tempo foi utilizado 3% de 30 ml como inóculo em cada experimento.

4.3.2. Análise da descoloração por espectrofotometria

Inicialmente, observou-se a absorbância máxima para cada corante, através da obtenção do espectro de absorção. Para tanto se tomou uma alíquota de 1 mL de cada um dos corantes diluídos em água Milli Q, na concentração de 0,01% (p/v).

No final do período de sete dias de incubação, amostras em condições (aeróbias, microaeróbias e microaeróbias seguidas de agitação), foram retiradas e, as células bacterianas foram separadas por centrifugação a 20.000 g por 15 minutos a 4°C. Utilizou-se 1 ml do sobrenadante para análise de descoloração em espectrofotômetro UV/VIS (2101 Shimadzu) através da diminuição da absorbância (ABS), no comprimento de onda específico de cada corante (518 nm para Reactive Red 198 e 609 nm para o Reactive Blue 220) descritos na literatura e confirmados nos testes preliminares de varredura. Amostras sem microrganismos no meio, e com a presença de corantes foram utilizados como controle abiótico.

A porcentagem de descoloração ou degradação será dada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ descoloração} = \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} \times 100$$

4.3.3. Determinação do potencial hidrogeniônico

Após 30 dias de incubação, determinou-se o pH em meio líquido nas três condições descritas no item 4.4.5 e 4.4.6, para isto, empregaram-se tiras plásticas indicadoras de pH de 0 – 14 (MERCK).

4.3.4. Análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO)

Para esta análise, 2,0 ml das amostras centrifugadas (20.000 g por 15 minutos a 4°C) obtidas do meio cultivado com bactérias, foram colocadas em frascos apropriados para análise, previamente adicionados de: 0,04 a 0,05g de HgSO₄ (sulfato de mercúrio), 2,5 ml de uma mistura de H₂SO₄ (ácido sulfúrico concentrado) com AgSO₄ (sulfato de prata), 0,3 ml de H₂O destilada e 0,5 ml de K₂CR₂O₇ (solução de Dicromato de Potássio 1,0 N). Os reagentes foram adicionados na ordem descrita acima e homogeneizados. A amostra foi adicionada por último com o tubo inclinado a 45°. Cada frasco foi colocado em um reator durante 120 minutos já pré-aquecido a 150°C. Passado este tempo, os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente durante 40 minutos, e as amostras foram colocadas em frascos HACH (devidamente limpos). Para possibilitar a leitura no aparelho DR 2010 da HACH, foram utilizados o programa 435 e o comprimento de onda de 620 nm. O branco foi feito com a adição de 2,0 ml de água destilada no lugar da amostra e, mais os reagentes para DQO (ABNT-NBR 10357,1988). Foi necessário diluir as amostras (1:10) para possibilitar a leitura. Os valores de porcentagem de redução da DQO foram determinados através da comparação dos resultados, entre o controle e as amostras através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução da DQO} = (\text{DQO amostra} \times 100 / \text{DQO controle}) - 100$$

4.3.5. Análise da curva de crescimento bacteriano

A curva de crescimento microbiana foi monitorada pelo aumento da biomassa da cultura, por medida de densidade óptica em espectrofotômetro UV/VIS (2101 Shimadzu). Alíquotas foram retiradas periodicamente até completarem 30 dias de cultivo. As absorbâncias das culturas foram medidas em um comprimento de onda de 600 nm.

Para este experimento utilizou-se como branco uma amostra livre de células de cada cultura, para cada intervalo de tempo monitorado, para isto, as amostras foram centrifugadas (20.000 g por 15 minutos a 4°C) e o espectrofotômetro zerado com o sobrenadante livre de inóculo (MORETTI, 2002).

4.3.6. Análise de adsorção dos corantes

Para análise de adsorção dos corantes, células bacterianas crescidas no meio descrito no item 4.3.1 foram autoclavadas (121°C por 15 minutos) e, centrifugadas a 20.000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e, as células mortas foram resuspendidas em água e utilizadas como inóculo.

4.3.7. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os melhores resultados verificados através da descoloração em espectrofotômetro item 4.3.2 e redução da DQO item 4.3.4 pelas linhagens selecionadas, foram analisados por CLAE.

A verificação da degradação dos corantes por CLAE foi realizada através da comparação dos cromatogramas das amostras com o controle livre de inóculo.

Para separação isocrática dos corantes foi utilizada como fase móvel metanol: tampão $\text{Na}_2\text{PO}_4 - \text{NaHPO}_4$, (1:4 v/v) com pH final de 6,7 a 0,075 M. A fase móvel foi previamente filtrada em membrana Millipore e utilizaram-se diferentes comprimentos de onda para a detecção.

Estudos preliminares foram feitos variando-se a fase móvel, vazão e comprimento de onda, visando melhor resolução dos picos e separação corantes. Para o corante RB 220 foram utilizados dois comprimentos de onda, 350 nm e 254 nm. Para o RR 198, o melhor comprimento de onda foi de 272nm.

A extensão da degradação, bem como mudanças ocorridas nos picos dos cromatogramas, foram avaliadas no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de incubação aeróbia.

A extração e limpeza das amostras foram feitas por centrifugação a 20.000 g por 15 minutos a 4°C. Estas foram filtradas em membrana Millipore 0,22 µm e injetadas em cromatógrafo Shimadzu, equipado com um detector UV e uma coluna de fase reversa C 18 (4,6 x 150 mm), com fluxo de 0,6 mL/min (ZGHAL et al., 1995). Devido a uma melhor separação do corante azul para o comprimento de onda de 254 nm, a vazão nesta condição foi de 1,0 mL.min⁻¹.

A confirmação do tempo de retenção de cada corante foi feita através da injeção de padrões dos corantes (100 mg.L⁻¹ em água Milli Q) e do controle livre do inóculo.

4.4. Experimentos

4.4.1. Isolamento dos microrganismos

Foram isoladas linhagens bacterianas, coletadas de diferentes pontos (P₁, P₂, P₃, P₄) do processo biológico de lodos ativados (ETE) de uma indústria têxtil na cidade de Itatiba-SP (Figura 6).

P₁: Entrada bruta da ETE, sem equalização com temperatura até 60°C e pH entre 9 e 12;

P₂: Entrada equalizada, com temperatura corrigida para um máximo de 40°C;

P₃: Tanque de aeração, efluente com pH corrigido para 7,0, temperatura de 36°C e O₂ a 3 mg. L⁻¹;

P₄: Recirculação, local onde o lodo do decantador retorna ao tanque de aeração.

Estação de tratamento de efluentes da indústria têxtil em estudo

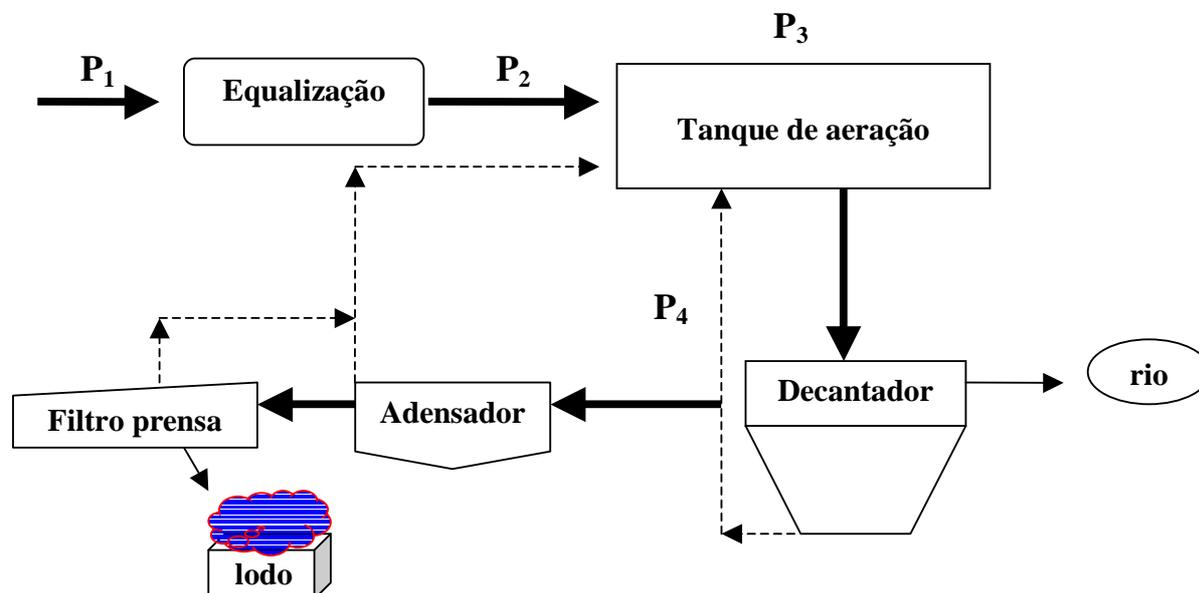


Figura 6. Fluxograma simplificado da estação de tratamento de efluentes da indústria têxtil em estudo, localizada em Itatiba -SP

As amostras foram coletadas em frascos plásticos estéreis e acondicionadas em gelo. No laboratório os microrganismos presentes nas amostras foram isolados por plaqueamento em superfície e, sofreram as seguintes diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} conforme ilustrado na Figura 7. Alíquotas de 0,1 ml das diluições, foram esgotadas em Placas de Petri na superfície do meio de cultura Agar Nutriente e, foram incubadas sob condições de crescimento de 30°C por períodos de 1 a 3 dias. Foi adicionada nistatina (anti fúngico) ao meio. As colônias foram isoladas de acordo com suas características morfológicas, onde as semelhantes presentes na mesma placa foram desprezadas. As bactérias isoladas foram posteriormente repicadas, para manutenção destas, em tubos de ensaio inclinados contendo meio ágar nutriente, e mantidas sob refrigeração a 4°C .

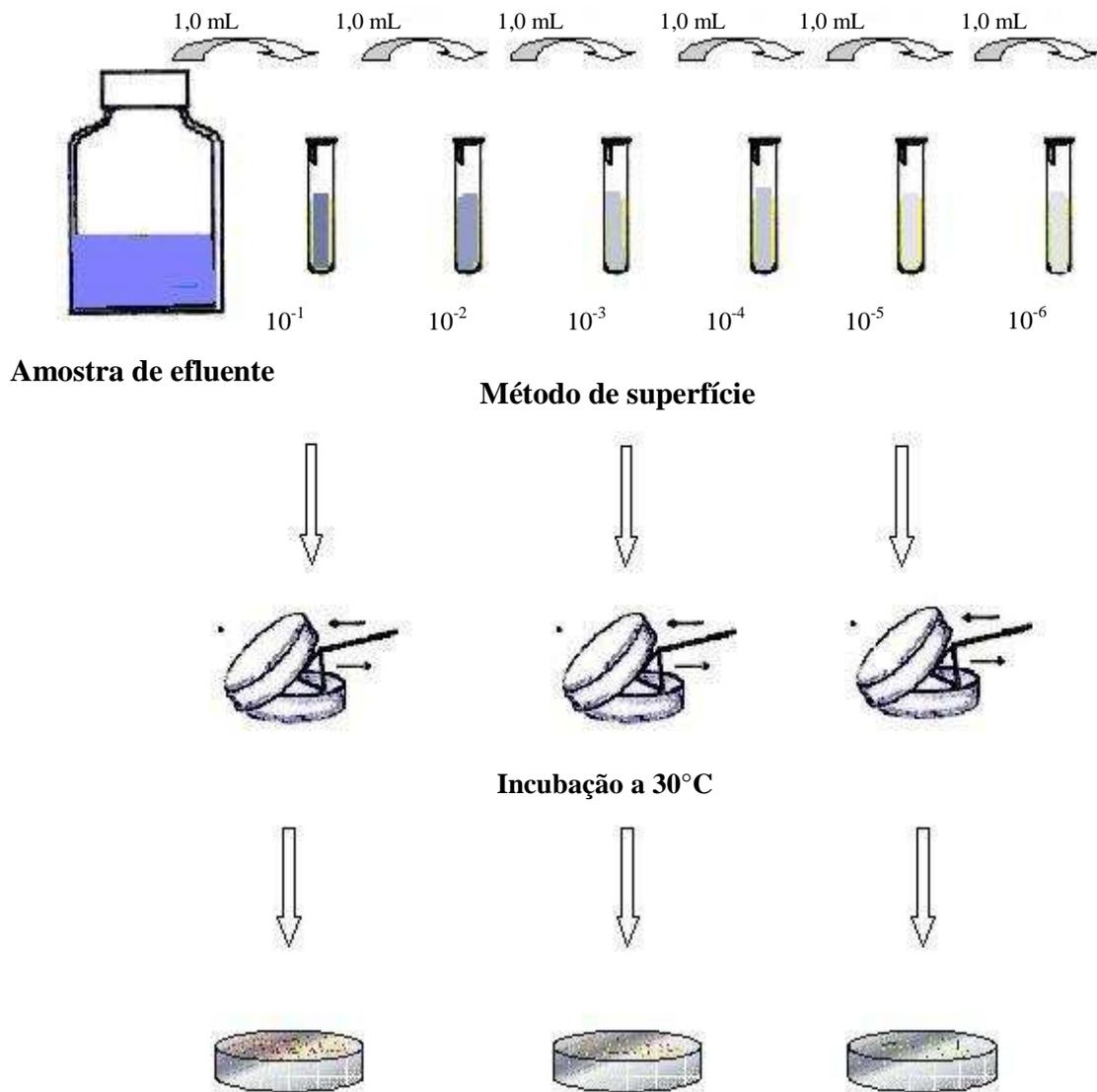


Figura 7. Metodologia de isolamento dos microrganismos a partir do efluente industrial.

4.4.2. Pré-seleção dos microrganismos

A pré-seleção dos microrganismos isolados foi realizada através do crescimento visual destes em meio de sais minerais (item 4.2.4.4) contendo azocorantes, como única fonte de carbono. O meio foi preparado e esterilizado a 121°C por 15 minutos e, colocado em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 ml do meio líquido, ou vertidos em placas de Petri, contendo 20 mL do meio adicionado de ágar a 2%. Os azocorantes estudados foram acrescidos ao meio na concentração de 0,03% (p/v) e analisados sob duas condições de pH e temperatura (30 °C e pH 7) e (45°C e pH 9), o pH foi ajustado para 9 com adição de NaOH. Foi utilizada agitação (150rpm) em shaker, para o experimento em meio líquido e, cultivo estático, em estufa BOD, para os microrganismos em meio sólido. Ambos foram incubados por um período de sete dias nas condições descritas acima.

Os microrganismos foram inoculados através de uma alça de platina para os meios de cultivo. O crescimento foi observado em meio líquido pela turbidez do meio de cultura e em meio sólido pelo tamanho e quantidade de colônias formadas. O crescimento foi observado da seguinte maneira; segundo ASTM (1990) e PAVARINA (2002).

+ = pouco crescimento; pouca turvação em meio líquido e pouco crescimento de colônias;

++ = moderado crescimento; turvação em meio líquido e crescimento de colônias;

+++ = ótimo crescimento; boa turvação em meio líquido e bastante crescimento de colônias;

O controle abiótico foi feito utilizando-se Erlenmeyers e placas de Petri, contendo o meio mínimo de sais minerais com 0,03% dos corantes individualmente, sem inóculo, nas mesmas condições de cultivo.

4.4.3. Seleção de um substrato como fonte de carbono

A fim de se verificar a necessidade de um indutor para degradação dos corantes, foram utilizados dois diferentes substratos. Glicose e o amido a 0,5% (p/v), foram

suplementados individualmente, ao meio mínimo de sais descrito no item 4.2.4.4, com os corantes separadamente a 0,01% (p/v), sendo o pH final do meio 7,0. Os Erlenmeyers foram incubados sob agitação, a 150 rpm na temperatura de 30°C por 7 dias e o crescimento visual e a descoloração dos corantes foram avaliados individualmente. A escolha do melhor substrato foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS (2101 Shimadzu), conforme descrito no item 4.3.2. O substrato escolhido para integrar o meio de descoloração foi adicionado de 0,1% (p/v) de extrato de levedura como fonte de vitaminas e nitrogênio para os testes subseqüentes.

4.4.4. Seleção de microrganismos em condições aeróbias e microaeróbias

A seleção foi realizada através do crescimento e capacidade de descoloração dos microrganismos pré-selecionados, em meio líquido contendo sais minerais (item 4.2.4.4), 0,5% (p/v) do substrato selecionado no item anterior, extrato de levedura a 0,1% e os azocorantes na concentração de 0,01% (p/v). A mistura foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos. Em condições aeróbias, as bactérias foram inoculadas em Erlenmeyers de 125ml, contendo 30 ml do meio. O crescimento destas linhagens foi realizado sob agitação, (150 rpm) a 30°C por sete dias. Sob condições microaeróbias as linhagens foram cultivadas no mesmo meio, em tubos com capacidade de 50 ml, contendo 30 ml do meio, e incubadas em jarras herméticamente fechadas contendo unidades de Anaerobac (Probac), para manter a concentração de oxigênio na atmosfera reduzida a 1% resultando em níveis de dióxido de carbono entre 9 e 13 %. As amostras foram incubadas a 30°C por 7 dias. A seleção foi feita em espectrofotômetro UV/VIS através da diminuição da absorbância no comprimento de onda específico para cada corante (item 4.3.2). A análise de pH foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.

Observações diárias foram feitas para detectar o início da descoloração até o final do período de incubação.

4.4.5. Crescimento das linhagens sob condições aeróbias em diferentes meios de cultivo

As linhagens selecionadas sob condições aeróbias foram cultivadas em meio conforme descrito no item 4.4.4, em 3 experimentos distintos:

1. sem adição de tampão ao meio
2. com adição de tampão fosfato de potássio a 0,05 M com pH final 6,8
3. com adição de vitamina solúvel de ácido fólico a 0,25% (v/v) em substituição a 0,1% de extrato de levedura.

Os frascos foram incubados sob agitação a 150 rpm, na temperatura de crescimento de 30°C por 30 dias.

Após incubação foram realizadas análises espectrofotométricas (item 4.3.2), redução da DQO (item 4.3.4), análise de pH (item 4.3.3) e curva de crescimento (item 4.3.5). Na condição que permitiu obter melhor resultado na descoloração, foi feita a varredura para verificar a ocorrência de mudanças no espectro de absorção dos corantes.

O controle abiótico foi realizado utilizando-se Erlenmeyers com os mesmos meios utilizados nestes experimentos, sem inóculo, nas mesmas condições de cultivo das amostras.

Para avaliar se ocorreu adsorção dos corantes às células bacterianas, foi realizada análise de adsorção (item 4.3.6), incubadas nas mesmas condições descritas neste item. Com isso pode-se verificar se o corante foi degradado pela bactéria ou apenas adsorvido pela mesma.

4.4.6. Crescimento das linhagens sob condições microaeróbias em diferentes meios de cultivo

As linhagens selecionadas sob condições microaeróbias foram cultivadas em meio descrito no item 4.4.4 em 2 experimentos distintos:

1. análise da influência da glicose (na concentração de 0,1% p/v) e ausência do extrato de levedura
2. análise da influência da adição de ácido fólico (0,25% v/v), glicose (na concentração 0,5% (p/v)) e ausência do extrato de levedura.

As condições em que se desenvolveram estas análises foram de incubação microaeróbia em jarras herméticamente fechadas contendo unidades de Anaerobac (Probac), em estufa BOD por sete dias a 30°C. Após incubação foram realizadas análises espectrofotométricas (item 4.3.2) e redução da DQO (item 4.3.4).

4.4.7. Efeito da agitação nas linhagens inoculadas em condições microaeróbias

As linhagens bacterianas selecionadas para descoloração dos corantes em condições microaeróbias, no final do 7º dia de incubação, foram agitadas durante mais sete dias para estudo da redução da DQO (item 4.3.4). Amostras foram retiradas diariamente para se obter um gráfico de redução da DQO. A absorvância no comprimento de onda de cada corante e, os espectros de absorção de 200 a 700 nm, em condições microaeróbias seguidas de agitação, também foram analisados para observar se houve variações no espectro de cada amostra (item 4.3.2). As amostras que apresentaram os melhores resultados foram também analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (item 4.3.7).

O controle da adsorção do corante na massa celular bacteriana foi feito através de células autoclavadas de cada linhagem, como descrito no item 4.3.6. O meio de descoloração foi o mesmo descrito no item 4.4.4.

4.4.8. Identificação das linhagens selecionadas

As melhores linhagens isoladas e selecionadas no estudo, com capacidade de descoloração/degradação dos corantes e redução da DQO, foram identificadas de acordo com a caracterização morfológica (cocos e bacilos), coloração diferencial (Gram-positivas e Gram-negativas), coloração de esporos (esporulado ou não

esporulado) e testes bioquímicos de acordo com Bergey's Manual. A série bioquímica foi efetuada, utilizando-se os seguintes testes: utilização do citrato; hidrólise da esculina; hidrólise da gelatina; TSI fermentação de açúcares (glicose, lactose e sacarose); produção de gás; produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio); redução do nitrato; Teste do KOH; utilização das enzimas catalase e citocromo oxidase; teste de Vermelho de Metila / Voges-Proskauer; produção de Indol; requerimento de oxigênio através do meio com tioglicolato; teste de motilidade; teste de O/F (Oxidação e Fermentação da glicose) e utilização dos seguintes carboidratos: D-manose, D-manitol, ramnose, arabinose, sacarose, glicose, D-xilose e D-galactose conforme descrito no manual de Bergey's (1974) e Mac Faddin (1980).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento dos microrganismos

Foram isoladas 62 microrganismos, com maior predomínio de bactérias sendo bastonetes Gram positivos, (Tabela 1, apêndice) dos quatro diferentes pontos (P1, P2, P3 e P4) de amostragem da estação de tratamento de efluentes, da indústria têxtil em estudo. De acordo com os resultados uma menor quantidade de microrganismos foi isolada do ponto 1 (entrada bruta da estação de tratamento de efluentes), onde ainda não ocorreu a correção do pH, que gira em torno de 9 e da temperatura, em torno de 60°C, podendo ser encontrados apenas microrganismos resistentes a estas condições.

5.2. Pré-seleção dos microrganismos

Dos 62 microrganismos isolados 17 bactérias foram pré-selecionadas, e denominadas de: VN-3, 7, 8, 9,11, 12, 26, 29, 31, 35, 39, 41, 44, 45, 46, 50, e 62. A capacidade de crescimento destas linhagens em meio líquido e sólido, contendo azocorantes como única fonte de carbono, foi analisada. O teste foi realizado sob duas condições de incubação, pH 7,0 e temperatura de 30°C, e pH 9,0 a 40°C. Considerando o crescimento de cada bactéria, por análise visual, estas foram classificadas de acordo com seu crescimento em: + = pouco crescimento, ++ = moderado crescimento e +++ = ótimo crescimento como indicado na Tabela 2.

As demais linhagens isoladas não apresentaram crescimento satisfatório nestas condições, ou levaram mais de sete dias para iniciar o crescimento na presença dos corantes.

Tabela 2: Crescimento visual das 17 linhagens selecionadas em meio mínimo de sais minerais contendo azocorantes como única fonte de carbono em meio líquido e sólido.

bactérias	Meio líquido				Meio sólido			
	pH 7,0 e 30°C		pH 9,0 e 40°C		pH 7,0 e 30°C		pH 9,0 e 40°C	
	RR 198	RB 220						
VN-3	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
VN-7	++	++	++	++	++	++	+	+
VN-8	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++
VN-9	+	++	+	+	+++	+++	++	++
VN-11	++	++	++	++	+++	+++	+	+
VN-12	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
VN-26	++	+	+	+	+	+	+	+
VN-29	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
VN-31	++	++	++	++	+++	+++	++	++
VN-35	++	++	+	+	++	++	+	+
VN-39	+++	+++	+	+	+++	+++	+	+
VN-41	++	++	+	+	+	+	++	++
VN-44	++	++	+	+	+	+	++	++
VN-45	++	++	+	+	++	++	+	+
VN-46	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++
VN-50	++	++	+	+	+++	+++	++	++
VN-62	++	++	+	+	++	++	++	++

Os melhores resultados foram obtidos com crescimento das linhagens em meio sólido. Isto pode ter ocorrido devido à presença do ágar, e das condições de oxigenação do meio, no qual a incubação foi estática.

As mudanças constantes de pH e temperatura que ocorrem na estação de tratamento de efluentes, devido à complexidade do processo produtivo, bem como a presença de corantes em meio líquido (efluente) e sólido (lodo) foi o motivo da escolha destes parâmetros para pré-seleção.

Com relação à descoloração dos meios contendo os corantes, nenhuma das linhagens descoloriram aparentemente. Nigam et al. (1996) também não observaram descoloração de azocorantes reativos em condições aeróbias utilizando agitação a 200

rpm ou em placas incubadas estaticamente, porém cinco de suas linhagens bacterianas isoladas foram capazes de crescer em meio mineral contendo os corantes.

5.3. Seleção do substrato como fonte de carbono

Após os resultados obtidos no item 5.2, onde não ocorreu descoloração nas amostras contendo corantes e sais minerais, foi avaliada a necessidade da presença de um substrato como um indutor para ocorrer à descoloração ou degradação.

Glicose e amido foram adicionados isoladamente na concentração de 0,5% (p/v), ao meio de sais minerais, como substratos necessários para o crescimento e descoloração.

Todas as linhagens cresceram satisfatoriamente, porém, com a glicose, o crescimento foi visualmente maior.

A porcentagem de remoção da cor do meio para o corante RR 198 foi melhor na presença de amido como substrato para as linhagens VN-3, 8, 9, 12, 26, 29, 35, 39, 41, 50 e 62, porém, este deixou o meio turvo após sete dias de experimento e, com muitos sólidos suspensos. Na presença de glicose as linhagens VN-7, 11, 31, 44, 45 e 46 apresentaram bons resultados em meio contendo corante RR 198, com uma porcentagem de redução de cor próximo ao substrato amido (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Porcentagem de descoloração dos corantes na presença de glicose como substrato pelas linhagens pré-selecionadas.

Linhagens	RR 198	RB 220
	%redução	%redução
VN-3	5,73	35,33
VN-7	73,07	76,51
VN-8	36,90	55,68
VN-9	0,37	4,052
VN-11	61,16	41,65
VN-12	71,94	78,73
VN-26	20,27	35,16
VN-29	74,63	87,58
VN-31	34,66	93,63
VN-35	0,76	94,46
VN-39	61,97	94,81
VN-41	69,27	70,10
VN-44	34,95	81,13
VN-45	73,62	39,34
VN-46	77,30	73,37
VN-50	19,92	59,65
VN-62	5,71	77,55

Tabela 4. Porcentagem de descoloração dos corantes na presença de amido como substrato pelas linhagens pré-selecionadas.

Linhagens	RR 198	RB 220
	%redução	%redução
VN-3	25,55	7,96
VN-7	29,29	69,58
VN-8	47,66	11,72
VN-9	16,83	4,586
VN-11	74,11	69,72
VN-12	77,70	75,20
VN-26	75,88	44,20
VN-29	78,74	73,10
VN-31	23,07	18,37
VN-35	24,25	1,37
VN-39	77,22	73,31
VN-41	81,74	51,34
VN-44	21,61	39,03
VN-45	68,22	71
VN-46	12,32	53,10
VN-50	46,22	6,41
VN-62	74,27	31,96

Na presença de glicose foi observada ótima remoção da cor em meio contendo corante RB 220 (Figura 8), sendo que sob a mesma condição na presença de amido o resultado foi insatisfatório, onde somente três linhagens VN-11, 26 e 45 apresentaram remoção da cor significativa na presença deste substrato (Figura 9).

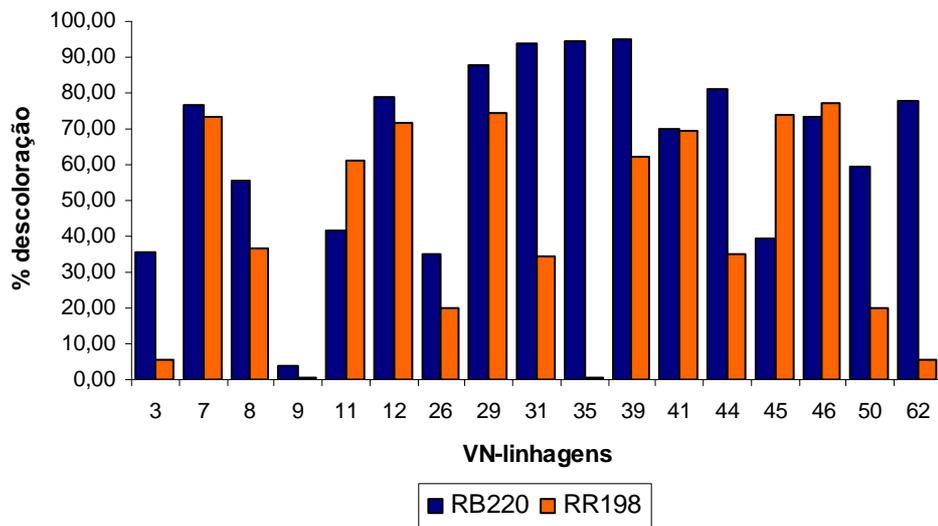


Figura 8. Porcentagem de descoloração dos corantes pelas linhagens pré-selecionadas na presença de glicose como substrato

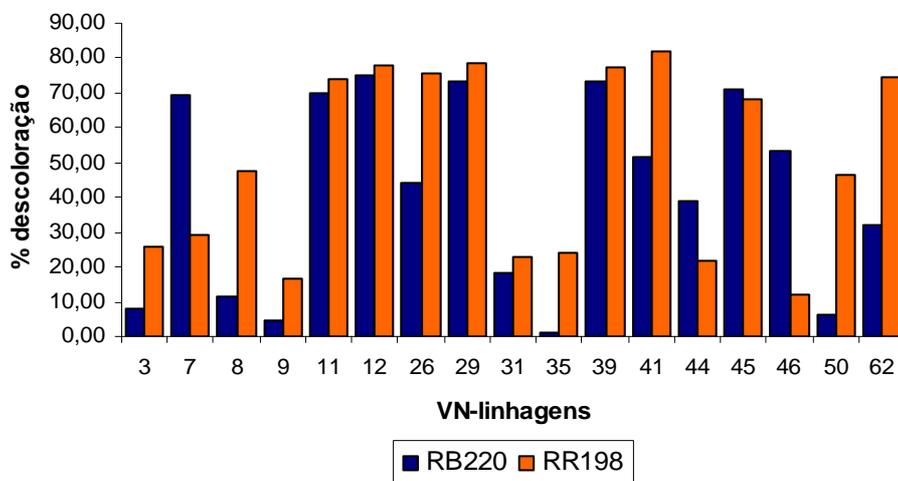


Figura 9. Porcentagem de descoloração dos corantes pelas linhagens pré-selecionadas na presença de amido como substrato

A escolha do amido como substrato, para compor o meio deste estudo, pode ser justificada pelo uso deste composto em larga escala nas indústrias têxteis. Ele é usado para atribuir resistência aos fios durante o processo de engomagem, quando estes são transformados em tecido plano nos teares, sendo gerador de uma grande quantidade de DBO e sólidos suspensos.

A glicose tem sido utilizada amplamente em vários experimentos como um indutor para descoloração de corantes, Padmavathy et al. (2003), observaram descoloração 91-94% para o corante RR 198 e redução de 95% da DQO com este substrato. Quando utilizou o amido, a eficiência na remoção da cor para o mesmo corante foi de 75-95% e 79% de redução de DQO, encontrando, porém, nestes dois substratos, valores muito próximos. Nigam et al. (1996), observaram em seus experimentos que o meio suplementado com glicose e lactose apresentou melhores resultados na remoção da cor de vários corantes reativos. Donlon et al. (1997), obtiveram 82% de descoloração com a glicose e apenas 52% com o amido. Considerando estes resultados, o substrato escolhido para compor o meio de cultura foi a glicose.

A remoção da cor do meio com estes dois substratos pode ter ocorrido pelo mecanismo de adsorção, pois as células bacterianas ficaram intensamente coloridas no final da incubação. De acordo com Knapp e Newby (1995), Sani e Banerjee (1999), a descoloração de corantes por bactérias pode ser devido à adsorção nas células microbianas ou a biodegradação. A adsorção do corante pode ser facilmente verificada através da observação das células bacterianas que se apresentam intensamente coloridas. Luangdilok e Panswad (2000), obtiveram como resultado de seus experimentos, a adsorção de um corante reativo sobre a massa bacteriana. Pagga e Brown (1986), estudaram a degradação de diferentes corantes e relataram que houve descoloração aeróbia, porém esta ocorreu parcialmente por mecanismos de adsorção.

5.4. Seleção dos microrganismos sob condições aeróbias e microaeróbias

No experimento para a escolha de um substrato para integrar o meio de cultura, houve intensa remoção do corante do meio, porém, por adsorção nas células bacterianas. Por isso, utilizaram-se as 17 linhagens selecionadas, para serem avaliadas novamente em meio aeróbio, sob agitação a 150 rpm e em condições microaeróbias, em estufa de BOD, conforme descrito no item 4.4.4 na presença de 0,1% de extrato de levedura. Sob condições aeróbias todas as linhagens apresentaram crescimento no meio utilizado e em geral o crescimento foi melhor do que quando comparado ao meio contendo somente glicose. Com relação à descoloração, o resultado foi ligeiramente melhor em meio contendo somente glicose. Provavelmente a adição de 0,1% de extrato de levedura no meio pode ter mudado o metabolismo microbiano ou, ter produzido metabólitos que impediram a melhor adsorção dos corantes nas células, como mostra a Figura 10. As linhagens selecionadas sob condições aeróbias com melhor taxa de descoloração foram: VN-12, VN-29 e VN-39.

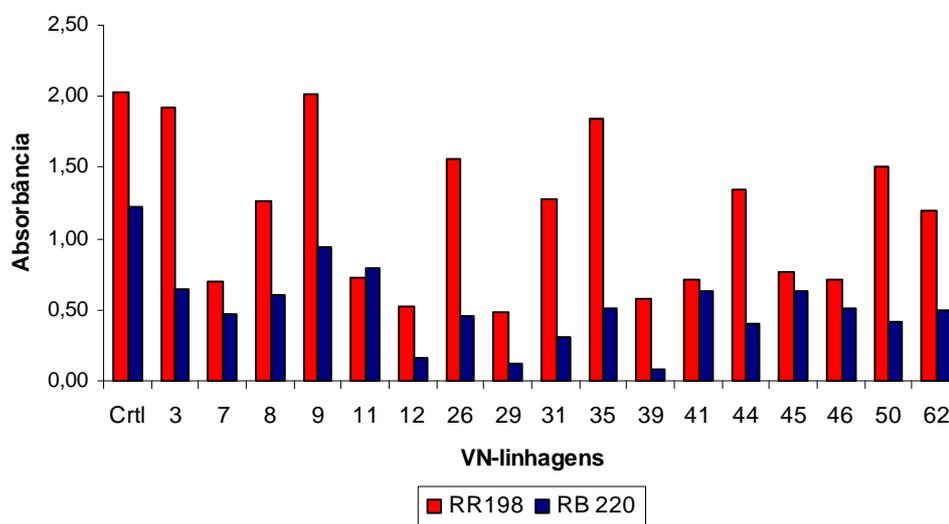


Figura 10. Descoloração dos corantes pelas linhagens selecionadas sob condições aeróbias

Os resultados referentes ao comportamento das linhagens sob condições microaeróbias, podem ser observados na Figura 11. Quanto ao crescimento, observou-se visualmente que este foi bem menor para todas as linhagens testadas, onde a massa bacteriana ficou depositada no fundo do tubo.

Quanto à descoloração, avaliada através da absorbância em espectrofotômetro e análise visual constatou-se que a mesma foi quase total para os corantes RR 198 e RB 220, para as seguintes linhagens: VN-3, VN-11, VN-31, VN-39 e VN-46. Para a linhagem VN-11, a descoloração foi de 89,5% para o corante RR 198, e ocorreu em apenas 24 horas, iniciando com formação de uma faixa de descoloração no fundo do tubo. Para o corante RB 220, a mesma linhagem mostrou um resultado de 98% descoloração e ocorreu em 28 horas. As demais linhagens selecionadas apresentaram dias diferentes de descoloração para os dois corantes sendo que o corante RR 198 descoloriu primeiro para todas as linhagens, e o RB 220 desapareceu do meio até a incubação completar sete dias. O pH do meio não teve alterações significativas, variando de 6,6 a 7,2. As demais linhagens isoladas não apresentaram descoloração satisfatória até o 7º dia de incubação. Neste experimento não ocorreu adsorção do corante na célula bacteriana, pois estas permaneceram com sua cor original.

De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que a degradação na presença de quantidade excessiva de oxigênio foi inadequada, provavelmente exista uma outra rota preferencial para degradação dos azocorantes.

Os experimentos também mostraram que a descoloração dos corantes não esteve associada ao crescimento microbiano, pois as linhagens incubadas sob condições microaeróbias cresceram muito pouco em relação às incubadas sob agitação a 150 rpm. Chen e Chen (2002), concluíram em seus estudos com azocorantes reativos, que linhagens bacterianas de *Pseudomonas luteola* necessitam de uma pequena quantidade de oxigênio para manter as atividades celulares básicas para degradação, indicando que a repressão de oxigênio é uma característica necessária para ocorrer a descoloração devido a uma enzima chamada azoredutase, sensível a este.

Nigam et al. (1996), concluíram em seus experimentos com os azocorantes reativos e diazo, que não houve descoloração em placas incubadas aerobicamente com

culturas isoladas de efluentes e, que a descoloração só ocorreu em cultivos anaeróbios, sendo que a descoloração foi mais rápida, e alcançou uma porcentagem melhor com a presença de 0,5 g. L⁻¹ de glicose e 0,5 g. L⁻¹ de extrato de levedura no meio.

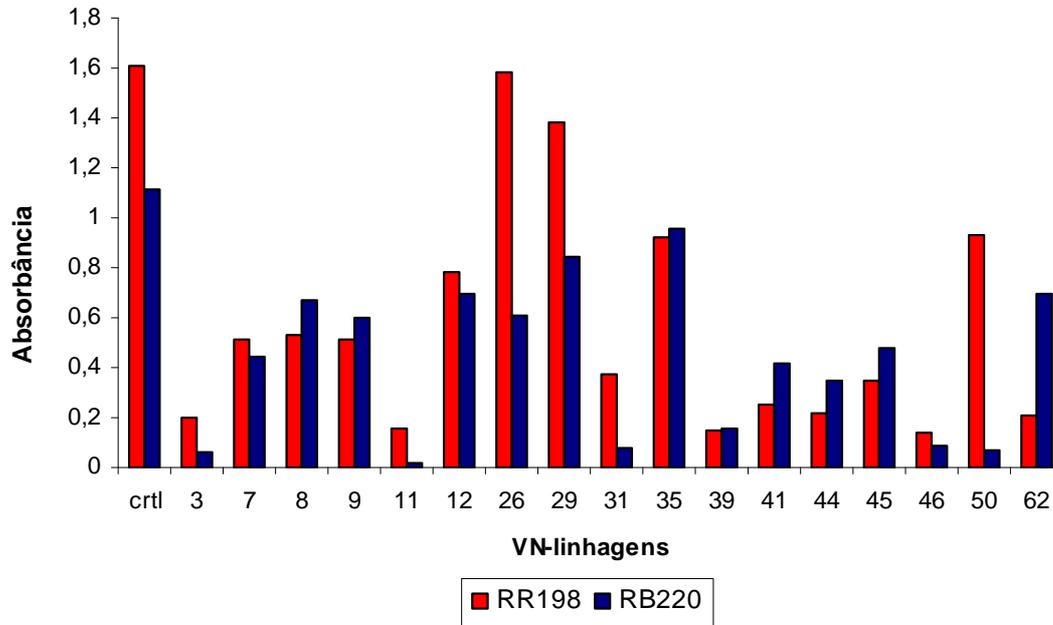


Figura 11. Descoloração dos corantes pelas linhagens selecionadas sob condições microaeróbias

5.5. Crescimento das linhagens sob condições aeróbias em diferentes meios de cultivo

As linhagens VN-12, VN-29 e VN-39, selecionadas aerobicamente foram testadas em três diferentes meios líquidos quanto ao comportamento de descoloração e/ou adsorção. Experimentos:

1. meio de sais, contendo 0,5% de glicose, 0,1% de extrato de levedura e 0,01% dos corantes separadamente, pH final 7,0;
2. o mesmo meio com adição de tampão fosfato de potássio a 0,050 M com pH final 6,8;
3. meio de sais contendo 0,5% de glicose e ácido fólico a 0,25% em substituição ao extrato de levedura, e 0,01% dos corantes separadamente, pH final 7,0.

Todos foram incubados sob agitação a 150 rpm a 30 °C por 30 dias.

A escolha de uma solução de vitaminas, para integrar um dos meios, em substituição ao extrato de levedura, pode ser justificado pelo uso contínuo deste complexo vitamínico na E.T. E. em estudo, demonstrando ótimos resultados de redução de DQO e, geração de lodo *in situ*.

Os resultados obtidos mostraram que ocorreram diferenças significativas entre os meios utilizados, referentes à adsorção. Essas diferenças foram avaliadas em espectrofotômetro e através da curva de crescimento dos microrganismos, medido por densidade ótica.

A redução da DQO nos três experimentos com meios distintos apresentaram resultados similares como apresentados a seguir.

5.5.1. Comportamento das linhagens em meio de sais não tamponado

Nas condições deste ensaio, o corante RB 220 mostrou-se mais apto à adsorção na parede celular bacteriana do que o corante RR 198.

No início do experimento o pH estava em 7,0, chegando no final do 30º dia de incubação em torno de 5,0 a 4,3. O pH dos meios com ambos os corantes, tratados com a linhagem VN-12, atingiu no final do experimento um valor de 4,5. Para a linhagem VN-29 o pH final foi de 4,3 para o RB 220 e 4,4 para o RR 198. Na linhagem VN-39 o pH final foi de 4,2 para o RB 220 e 5,0 para o RR 198 (Tabela 5). Esta mudança no pH provavelmente se deu devido ao não tamponamento do meio, e a produção de ácidos orgânicos e CO₂ pela respiração celular bacteriana, devido à presença de glicose como substrato.

A redução da DQO foi bastante significativa para as três linhagens (Figura 12). Somente para a linhagem VN-39, no corante RR 198 a redução foi menor, e alcançou somente 37 %.

Tabela 5. pH final do sobrenadante das linhagens no meio não tamponado

Valor de pH		
linhagem	RR 198	RB 220
Crtl	7,2	7,2
12	4,5	4,5
29	4,4	4,3
39	5,0	4,2

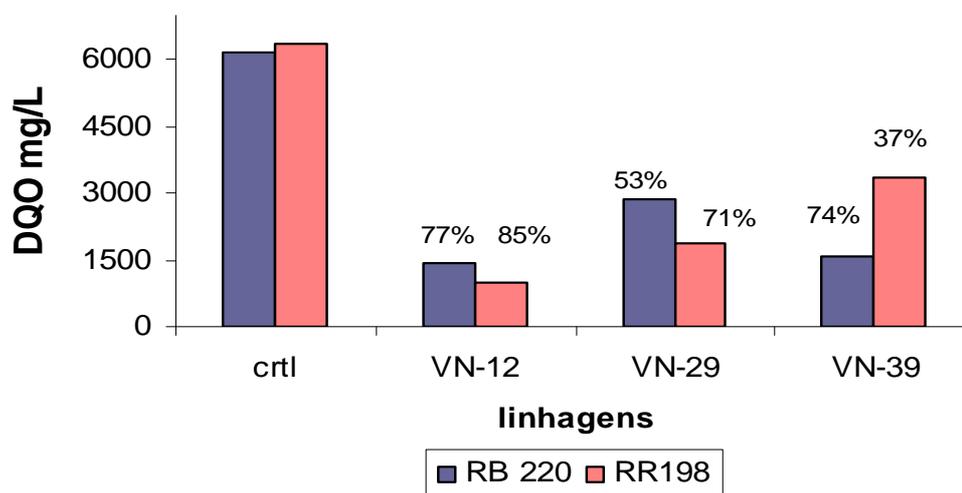


Figura 12. DQO das linhagens selecionadas após crescimento em meio de sais não tamponado.

A curva de crescimento das linhagens nestas condições, (Figura 13) mostram uma queda no crescimento aproximadamente a partir de 48 hs de incubação, enquanto a descoloração do meio teve início imediatamente após a incubação para ambos os corantes, sendo mais intensa em 24°hs.

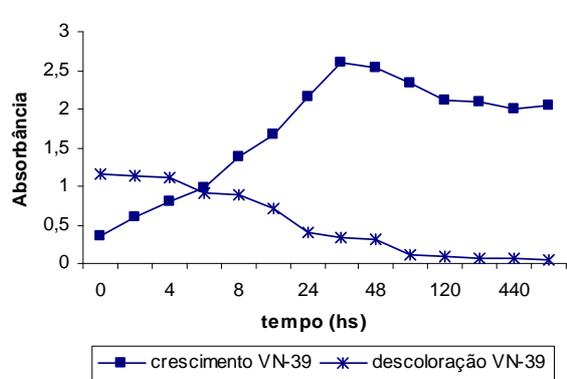
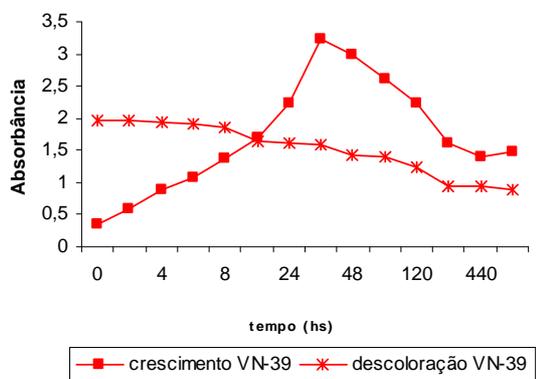
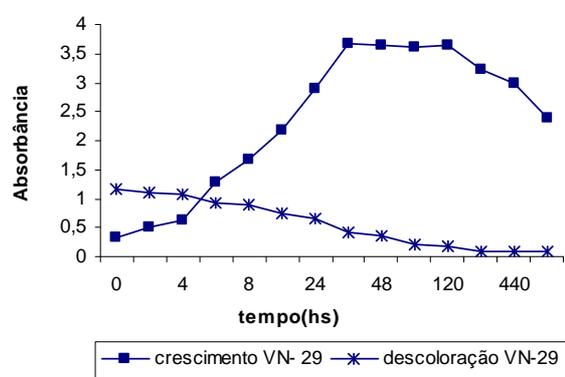
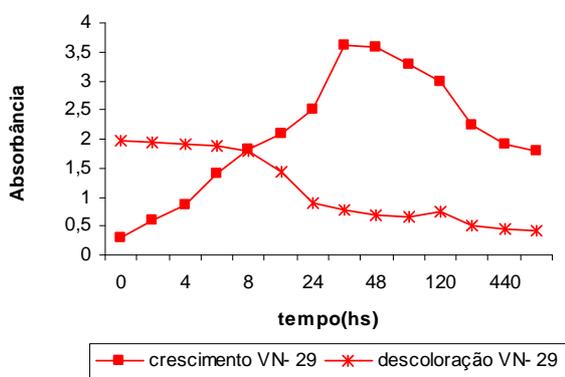
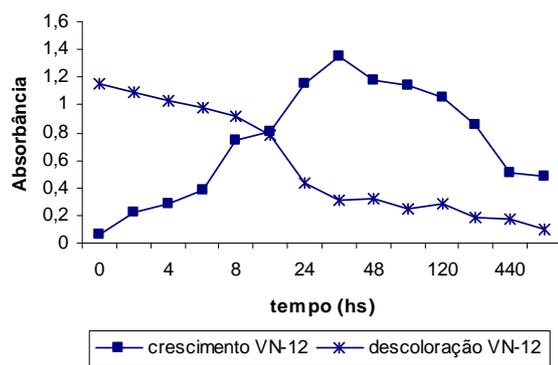
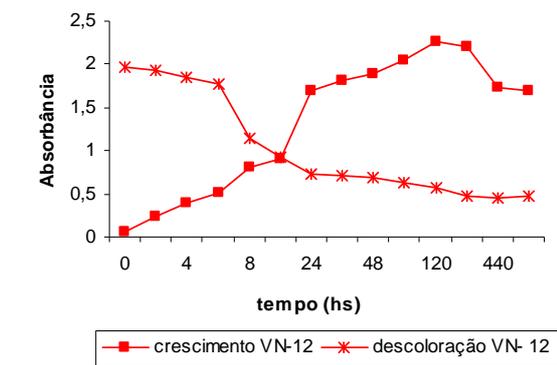


Figura 13. Curva de crescimento X descoloração das linhagens em meio de sais não tamponado contendo os corantes RR 198 (linha vermelha) e RB 220 (linha azul)

De acordo com as figuras 14 e 15 pode se verificar que as linhagens apresentaram retirada do corante do meio, sendo mais intensa para o corante azul RB 220. Os espectros UV-VIS mostram que somente ocorreu diminuição no valor da absorbância, sendo que variações no comprimento de onda dos corantes não foram observadas, permanecendo 609 nm para o RB 220 e 518 para o RR 198. Comparando a absorbância dos controles com as amostras inoculadas, a melhor linhagem para o corante azul foi VN-39 (Figura 14), apresentando também o menor pH final de 4,2. A mesma linhagem VN-39, para o corante vermelho, foi a menos eficiente quanto à remoção da cor (Figura 15), sendo que o pH final no valor de 5,0 foi o maior para todas as linhagens.

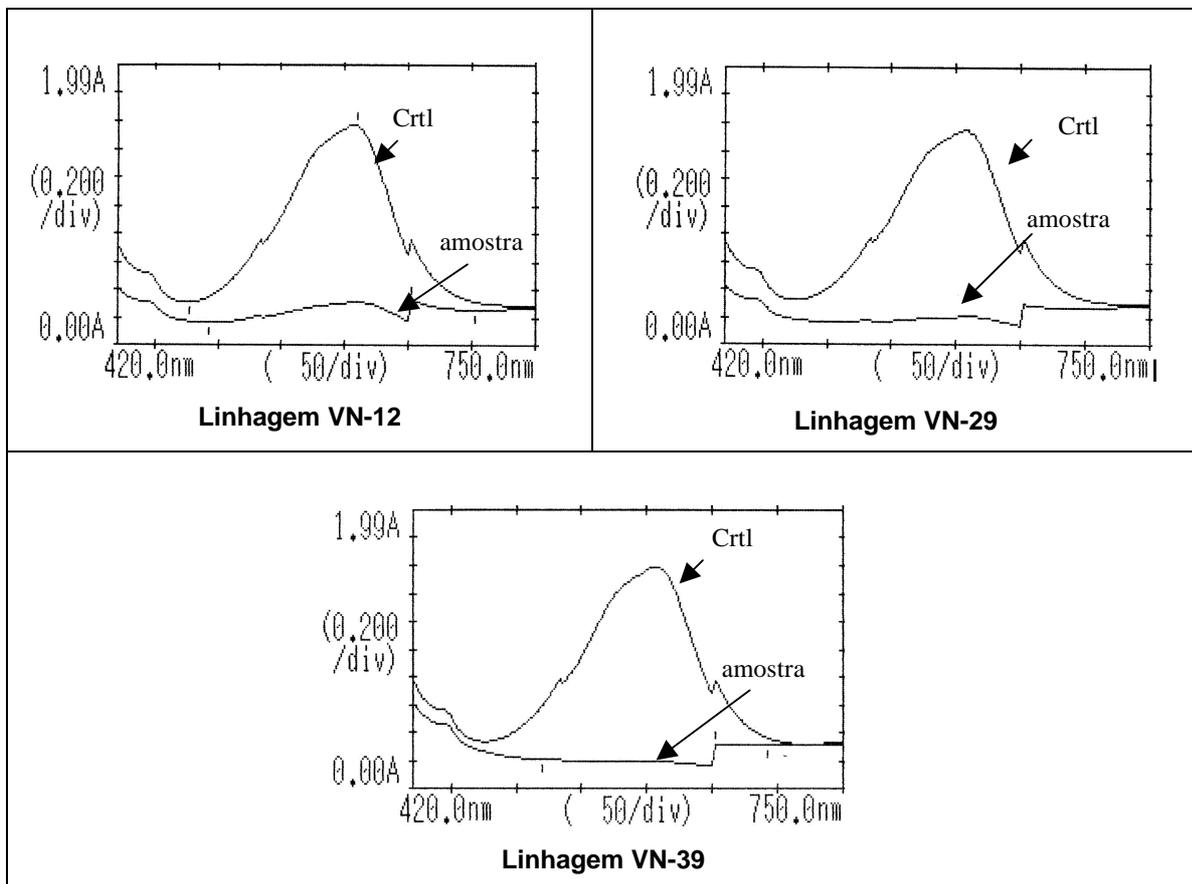


Figura 14. Espectros UV-VIS após crescimento das linhagens selecionadas em meio não tamponado contendo corante azul RB 220

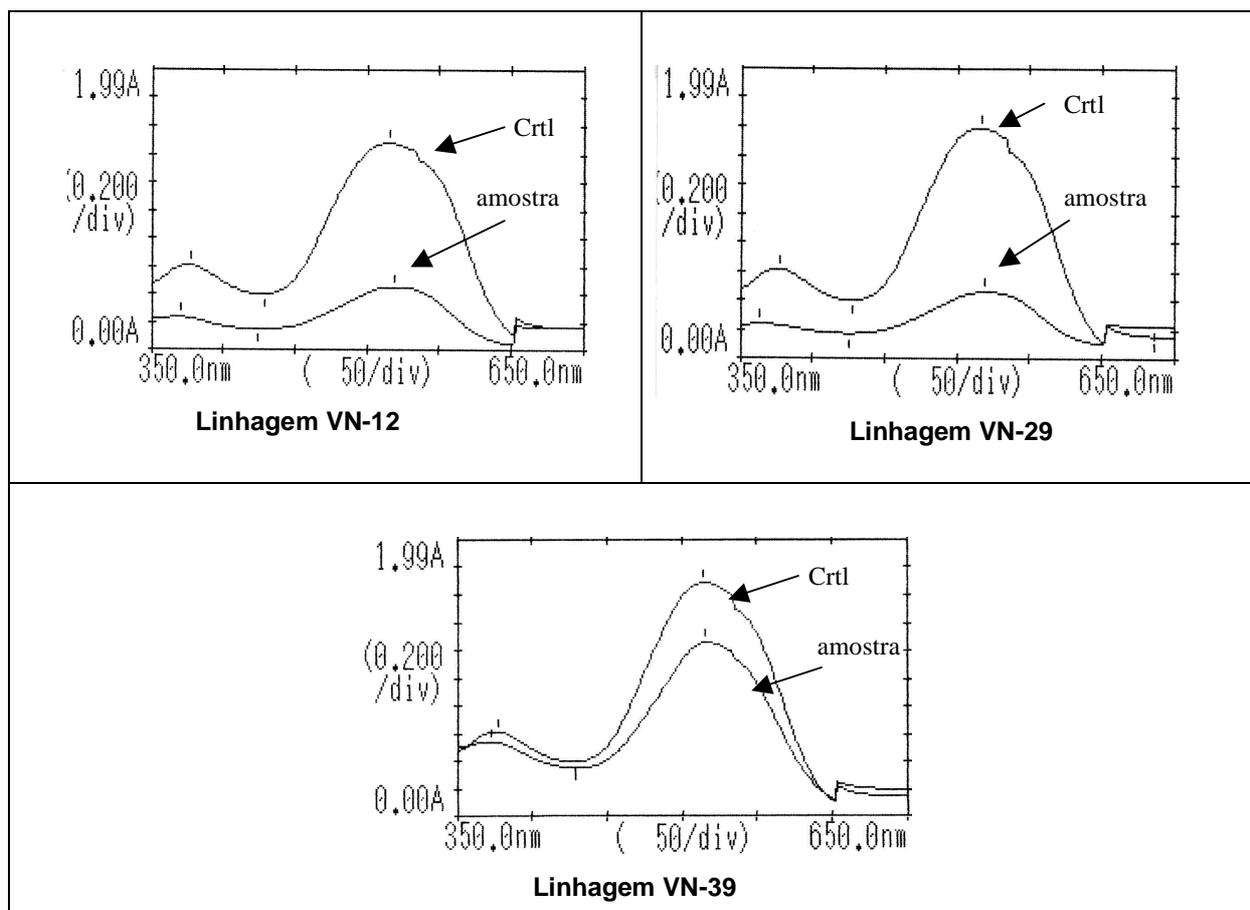


Figura 15. Espectros UV-VIS após crescimento das linhagens selecionadas em meio de sais não tamponado contendo corante RR 198

O experimento com células bacterianas autoclavadas a 121°C por 15 minutos, para medir a adsorção abiótica, mostrou que os corantes foram adsorvidos, porém, em quantidades bem menores do que as células bacterianas não autoclavadas no meio não tamponado (Figura 16). O pH inicial e final do meio contendo as células bacterianas autoclavadas permaneceu em torno de 7,0, diferentemente do meio sem tampão que foi reduzido de 7,0 para 5,0 ou 4,0 dependendo da bactéria em estudo. Provavelmente o pH do meio teve uma forte influência na adsorção dos corantes nas células bacterianas.

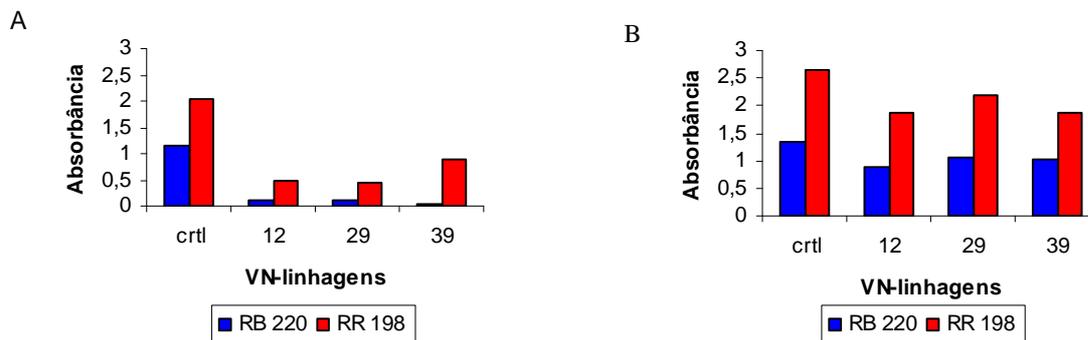


Figura 16. Comparação dos gráficos obtidos a partir do experimento com células bacterianas não autoclavadas (A) e autoclavadas (B) para verificar adsorção abiótica em meio não tamponado

5.5.2. Comportamento das linhagens em meio tamponado com fosfato de potássio

Para confirmar se o pH influencia na descoloração, uma solução tampão fosfato de potássio foi adicionado ao meio. Nas condições deste ensaio o corante azul RB 220 foi muito pouco adsorvido na célula bacteriana, removendo somente pequena parte da corante do meio. Já o corante vermelho RR 198 praticamente não apresentou adsorção na parede celular nem descoloração.

No início do experimento o pH se manteve em torno de 6,8. Ao final de 30 dias de incubação este estava em 7,0, para todas as linhagens. A não alteração do pH pode ter sido um forte indício para as células não descolorirem o meio com os corantes (Tabela 6).

A redução da DQO foi bastante significativa para as três linhagens, alcançando um máximo de redução de 83% para a linhagem VN-12 na presença do corante azul RB 220, e um mínimo de 59% para o vermelho RR 198 (Figura 17).

Tabela 6. pH final do sobrenadante das linhagens no meio tamponado

Valor de pH		
linhagem	RR 198	RB 220
Crtl	7,0	7,0
12	7,0	7,0
29	7,0	7,0
39	7,0	7,0

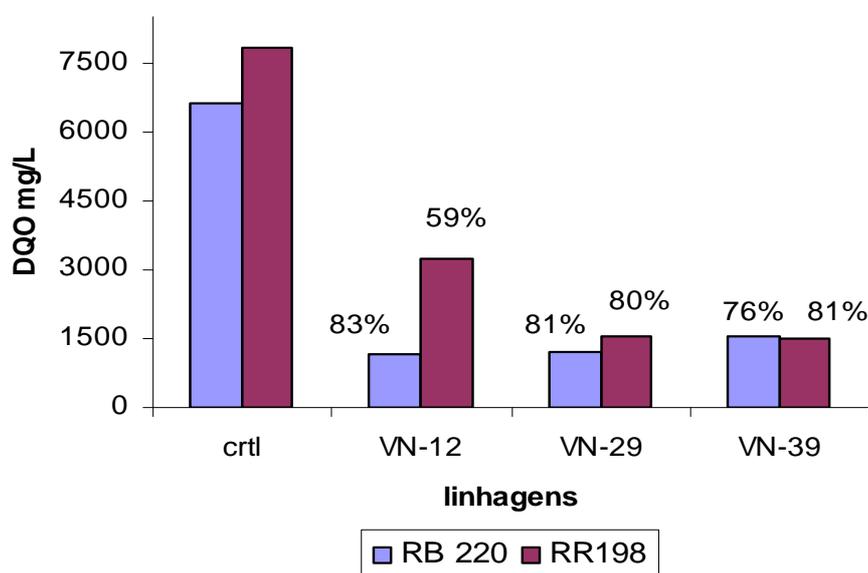


Figura 17. DQO das linhagens selecionadas após crescimento em meio de sais tamponado com fosfato de potássio

A curva de crescimento e descoloração das linhagens nestas condições, mostram fases diferentes para cada espécie. A linhagem VN-12 apresentou crescimento praticamente durante todo o experimento. Na linhagem VN-29 observou-se o início da fase estacionária em 36 hs, e uma fase de declínio, tendo início após 288 hs de incubação. Já a linhagem VN-39 apresentou crescimento até 96 hs, onde teve início à fase estacionária que se manteve até o final do experimento. Este comportamento foi muito parecido para os dois corantes frente as suas respectivas linhagens. Já referente à descoloração, foi observado que ocorreu uma leve adsorção do corante azul RB 220,

diminuindo sua concentração no meio. Para o corante vermelho RR 198, não houve adsorção nem diminuição significativa da concentração de corante no meio (Figura 18).

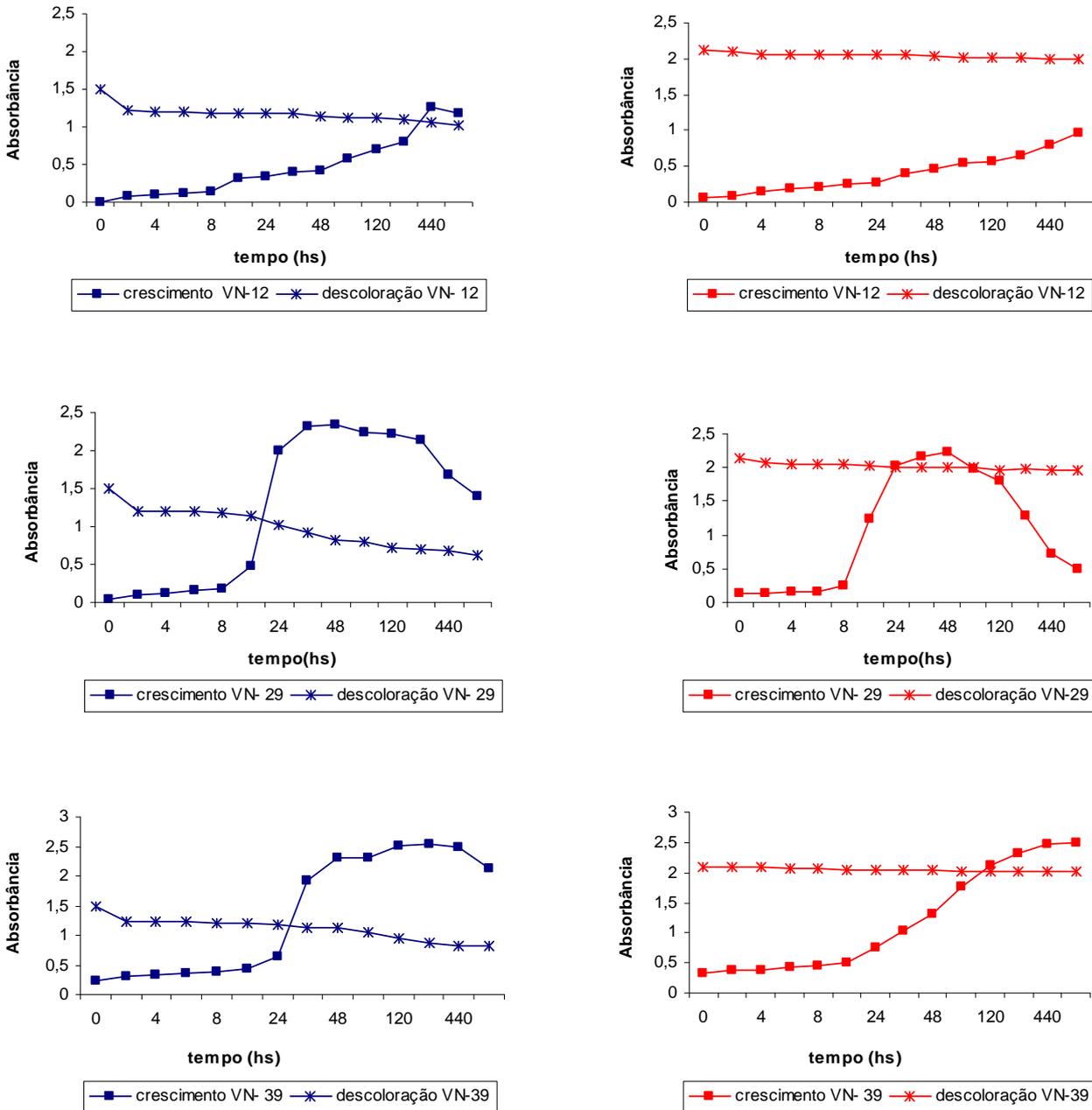


Figura 18. Curva de crescimento X descoloração das linhagens em meio de sais tamponado contendo os corantes RR 198 (linha vermelha) e RB 220 (linha azul)

O experimento com células bacterianas autoclavadas a 121°C por 15 minutos, a fim de medir a adsorção abiótica nestas condições, mostraram que o corante azul RB 220 foi adsorvido em proporções praticamente iguais para as células bacterianas não autoclavadas e para as autoclavadas. No vermelho RR 198 as células bacterianas não autoclavadas adsorveram menos corante (Figura 19). O pH inicial e final do meio contendo as células autoclavadas permaneceu em torno de 7,0.

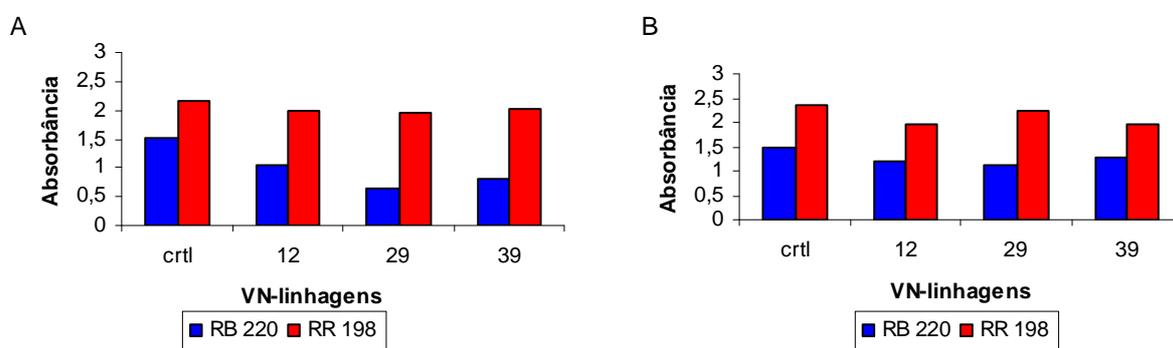


Figura 19. Comparação dos gráficos obtidos a partir do experimento com células bacterianas não autoclavadas (A) e autoclavadas (B) para verificar adsorção abiótica em meio tamponado

5.5.3. Comportamento das linhagens em meio de sais com adição de ácido fólico

Com relação à descoloração do meio, os corantes azul RB 220 e vermelho RR 198 foram pouco adsorvidos na parede celular bacteriana, ocorrendo nos últimos dias do experimento um aumento na absorbância destes para todas as linhagens.

No início do experimento o pH manteve-se em torno de 7,0, no final do 30º dia de incubação, este variou conforme as linhagens. Para a linhagem VN-12 o pH final foi de 6,2 para ambos os corantes, já para a linhagem VN-29 o pH permaneceu em 7,0 durante todo o experimento. O pH para a linhagem VN-39, no final do experimento diminuiu para 5,0. Houve alteração do pH com relação ao primeiro dia de incubação,

porém, os corantes não foram adsorvidos na célula bacteriana, e tampouco descoloridos (Tabela 7).

Nas condições deste ensaio, a redução da DQO foi boa para as três linhagens conforme observado na Figura 20, alcançando um máximo de remoção de 70% para a linhagem VN-12 no corante azul RB 220, e um mínimo de 58% para a linhagem VN-29.

Tabela 7. pH final do sobrenadante das linhagens no meio com adição de ácido fólico

Valor de pH no meio com ácido fólico		
linhagem	RR 198	RB 220
Crtl	7,0	7,0
12	6,2	6,2
29	7,0	7,0
39	5,0	5,0

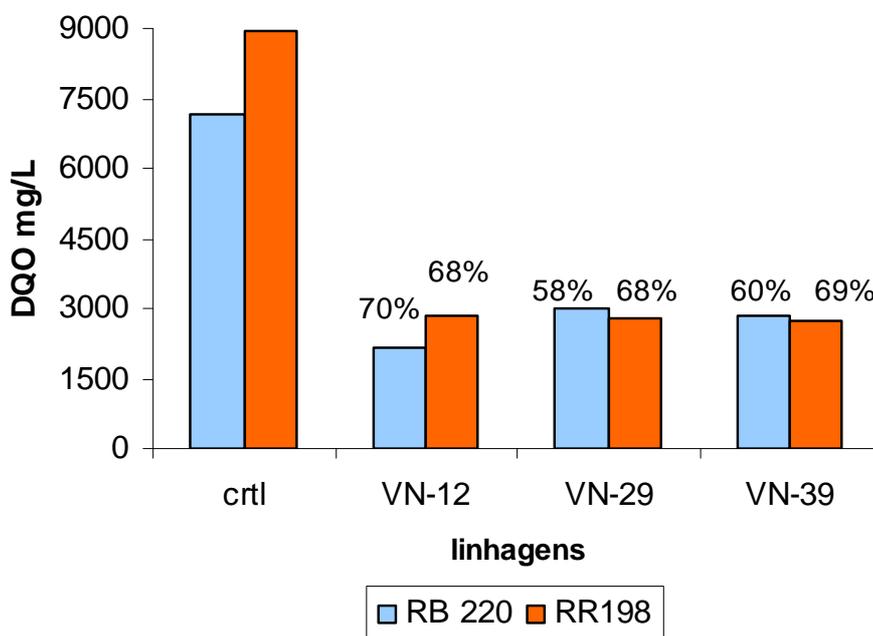


Figura 20. DQO das linhagens selecionadas após crescimento em meio de sais contendo ácido fólico

A curva de crescimento bacteriana nas condições descritas neste item, mostram fases diferentes para cada linhagem. A linhagem VN-12 apresentou crescimento praticamente durante todo o experimento. Na linhagem VN-29 observou-se um início da fase estacionária em 36 hs e uma fase de declínio tendo início após 288 hs de incubação.

Já a linhagem VN-39 apresentou crescimento até 96 hs de incubação, onde teve início à fase estacionária que se manteve até o final do experimento. Este comportamento foi muito parecido para os dois corantes frente as suas respectivas linhagens (Figura 21).

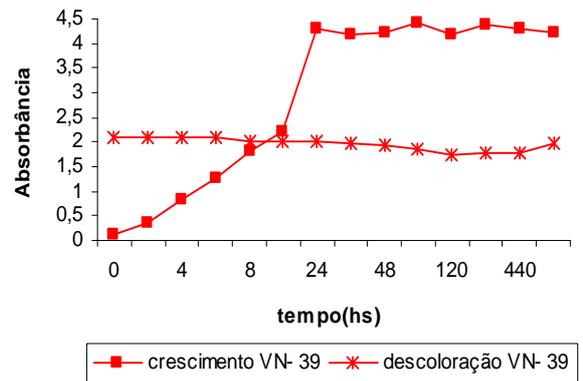
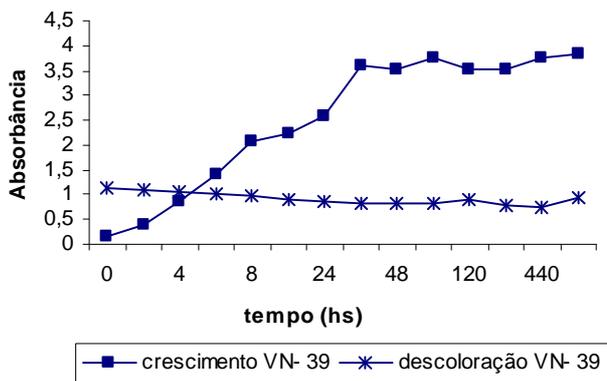
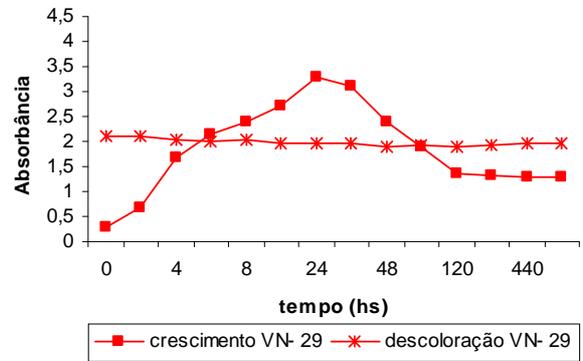
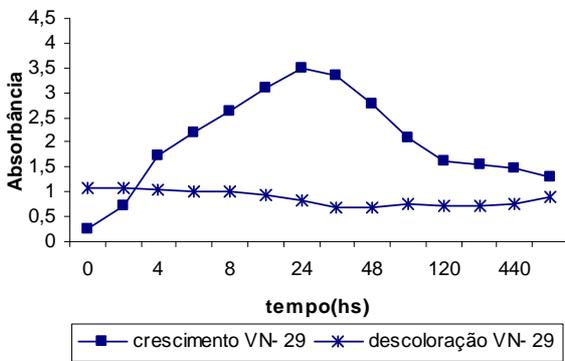
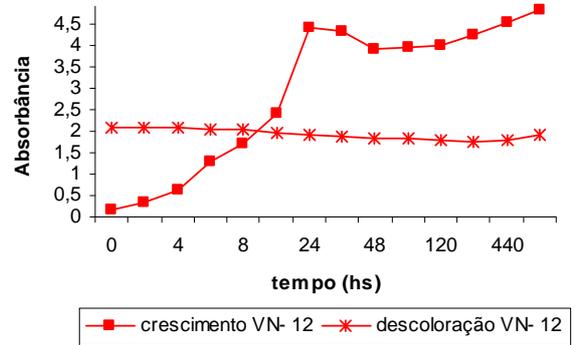
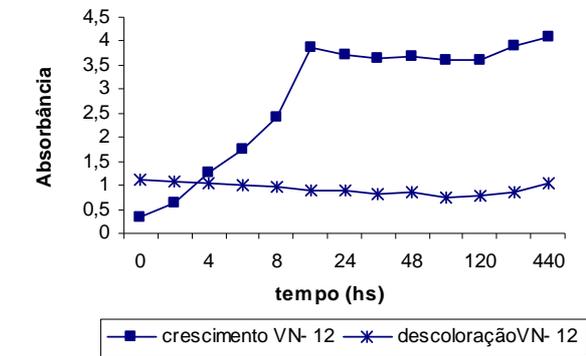


Figura 21. Curva de crescimento X descoloração das linhagens selecionadas em meio de sais contendo ácido fólico com os corantes RB 220 (linha azul) e RR 198 (linha vermelha)

O experimento com células bacterianas autoclavadas a 121°C por 15 minutos, com a finalidade de medir a adsorção abiótica, mostraram que o corante azul RB 220 foi adsorvido em proporções praticamente iguais para as células bacterianas não autoclavadas e para as autoclavadas. (Figura 22).

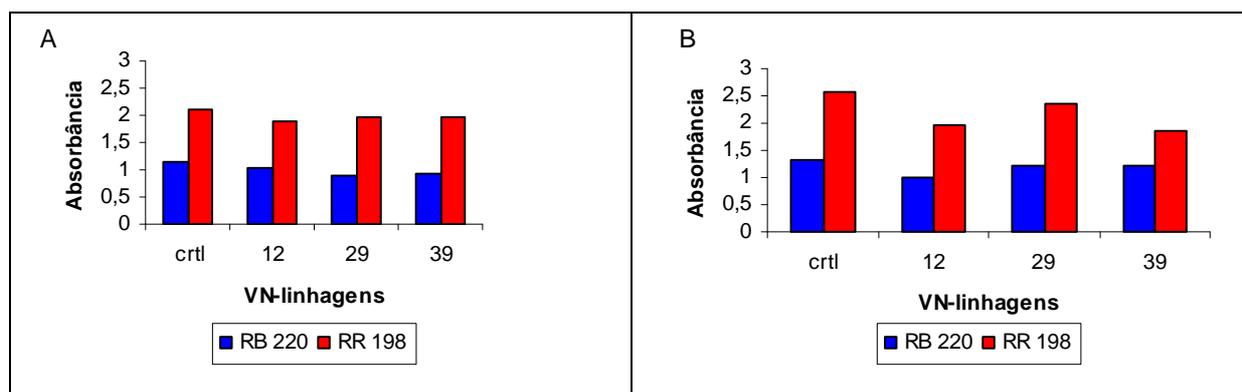


Figura 22. Comparação dos gráficos obtidos a partir do experimento com células bacterianas não autoclavadas (A) e autoclavadas (B) para verificar adsorção abiótica em meio com ácido fólico

5.6. Discussão sobre a descoloração e redução da DQO nos corantes testados nos diferentes meios de cultivo

Dos resultados obtidos, observou-se que o pH apresentado pelos diferentes meios propostos teve uma forte influência na remoção da cor dos corantes. Para o meio não tamponado, a adsorção foi alta para as linhagens que atingiram um pH ao redor de 4,5. Para a linhagem VN-39 a adsorção foi mínima para o corante RR 198 e, o pH foi o menos alterado, atingindo mínimo de 5,0.

Esta alteração do pH no meio de cultura, ocorreu devido a degradação de compostos como a glicose presente no meio. É caracterizada pela glicólise e ciclo dos ácidos tricarbóxicos, para geração de energia (ATP) para as necessidades da célula, quando bactérias aeróbias ou facultativas estão presentes. Produz ácidos orgânicos e CO₂ na presença de oxigênio, causando diminuição do pH, impedindo a partir daí, a continuidade do crescimento microbiano e a descoloração através da degradação.

Provavelmente isto tenha ocasionado a adsorção do corante na massa celular devido à diferença de carga.

Para comprovar a influência do pH na adsorção dos corantes, utilizou-se meio tamponado com fosfato de potássio que não apresentou adsorção nem descoloração, ficando o corante solúvel no meio, sendo que o crescimento bacteriano continuou por mais tempo. Resultados semelhantes foram observados por Chen et al. (2003) onde concluíram, que quando o pH da cultura caiu para 4,5, as células bacterianas de *Aeromonas hydrophila* ficaram intensamente coloridas pela adsorção dos corantes, atribuída a inibição causada pela concentração de glicose no meio através de sua conversão biológica para ácidos orgânicos. Entretanto quando o pH do meio foi ajustado para 7,0 com adição de NaOH e a incubação passou a ser estática, notou que a descoloração do RR 198 aumentou de 25 para 90% em 2 dias e a coloração da superfície celular mudou visualmente de vermelho para branco.

A adsorção do corante na superfície da célula pode estar relacionado com um mecanismo de neutralização de carga. Normalmente, os corantes reativos apresentam-se carregados negativamente devido à presença de grupos SO_3^- . Segundo Glasauer, (2001), as células bacterianas têm cargas negativas em pH neutro, porém, em solução a baixo pH tendem a possuir cargas positivas. Assim as células podem ter alta afinidade pelos corantes, que são carregados negativamente, formando com estes ligações iônicas e covalentes.

Embora a DBO seja uma das análises mais importantes para monitorar a quantidade de matéria orgânica presente no meio (efluente), medida pela quantidade de oxigênio consumido pelos microrganismos, a análise é muito demorada, e exige 5 dias de incubação em estufa de BOD. Um método indireto, mais rápido para estimar a DBO é a Demanda Química de Oxigênio (DQO), sendo determinada em apenas 3 horas (KIMBALL, 1991).

O ensaio realizado em meio contendo ácido fólico em substituição ao extrato de levedura foi utilizado para observar se ocorria maior eficiência na descoloração e redução da DQO. Foi observado, porém, que os resultados de DQO foram semelhantes nas três condições estudadas.

A descoloração ocorreu em quantidade mínima. Pode se notar que nos últimos dias de incubação a bactéria parece ter eliminado a pouca quantidade de corante que foi adsorvido.

Com relação à curva de crescimento na presença de ácido fólico, observou-se que as linhagens VN-12 e VN-39 apresentaram comportamento praticamente semelhante, não apresentando declínio após a fase estacionária. Verificou-se aumento do crescimento por volta de 120 hs de incubação, este coincidindo com um aumento na concentração de corante no meio, como se os mesmos estivessem sendo desorvidos das células bacterianas. Em relação à linhagem VN-29 praticamente não ocorreu fase estacionária, sendo que o declínio da concentração celular coincidiu com uma leve desorção dos corantes. Observou-se também uma estabilização na fase de declínio, juntamente com o aumento na concentração dos corantes no meio. Estes resultados podem ser explicados pela presença do ácido fólico, sendo conhecido por aumentar a atividade bacteriana, responsável pela degradação orgânica do efluente através de um incremento no seu metabolismo enzimático. Segundo Lemmer et al. (1998), preparações de vitaminas estão sendo usadas em tratamento de efluentes industriais a fim de compensar a deficiência de fatores de crescimento, aumentando a eficiência bacteriana e purificação do efluente. Em seus estudos, concluíram que dos efluentes testados de indústrias de papel, petroquímicas e químicas, os microrganismos presentes requerem vitaminas do complexo B como tiamina, biotina, ácido fólico entre outros para aumentarem sua atividade enzimática.

Os resultados obtidos nestes experimentos com o objetivo de descolorir os corantes, revelaram que a capacidade de adsorção é maior em meio ácido e que a principal interação com o adsorvente (célula) pode ser de natureza eletrostática.

5.7. Crescimento das linhagens sob condições microaeróbias em diferentes meios de cultivo

Após ter verificado a necessidade de um substrato e, de condições reduzidas de oxigênio para que as bactérias tenham capacidade de degradar os corantes, o meio

com sais minerais e corantes a 0,01% foi testado com concentrações de 0,1% glicose, inferior a utilizada em todos os ensaios que foi de 0,5% e, sem a presença do extrato de levedura. Em um segundo ensaio, a concentração de glicose foi mantida (0,5%) e o extrato de levedura foi substituído por ácido fólico (0,25%).

Estes experimentos foram realizados a fim de avaliar a capacidade de descoloração dos corantes pelas bactérias, de modo a melhorar a degradação e, reduzir a concentração de substratos, para aumentar a eficiência na remoção da DQO. As condições desta análise estão descritas no item 4.4.6.

5.7.1. Comportamento das linhagens em meio de sais contendo 0,1 % de glicose

Dos resultados obtidos, observou-se que, quando apenas 0,1% de glicose estava disponível no meio, a descoloração apresentou-se muito inferior em relação à presença de 0,5% de glicose e 0,1% extrato de levedura. Este comportamento foi observado na maioria das linhagens, e na presença de ambos corantes. Apenas as linhagens VN-11 e VN-31, com relação ao corante vermelho RR 198, apresentaram valores de absorvância reduzidos em relação ao controle, resultando 96,6% descoloração para a linhagem VN-11, e 62% para a linhagem VN-31 (Figura 23). Segundo Carliell et al. (1995), o extrato de levedura é essencial para regenerar o NADH que age como transportador de elétrons para a redução das ligações azo presente nos corantes. Chen et al. (2003), observaram que aumentando a concentração de extrato de levedura de (0 para 10 g. L⁻¹), obteve uma descoloração 90% maior para o corante RR 198.

Diferentes concentrações de glicose têm sido usadas por diferentes autores para melhorar o desempenho na descoloração, entretanto outros autores relataram que a glicose inibiu a atividade bacteriana de descoloração. Estas variabilidades podem estar relacionadas as diferentes estruturas dos corantes, bem como das características do metabolismo de cada bactéria (CARLIELL et al., 1995).

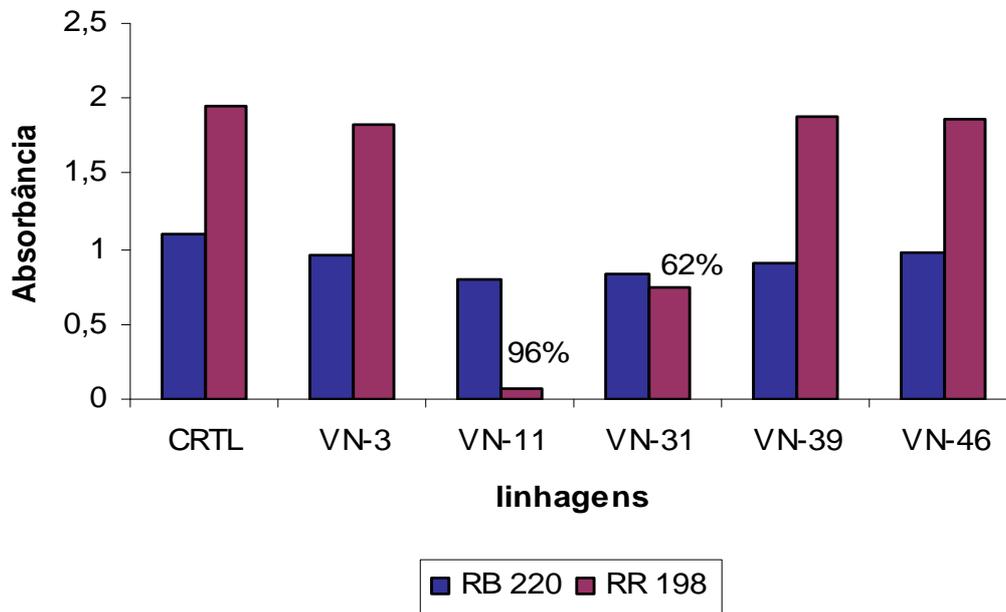


Figura 23. Descoloração após crescimento das linhagens em meio contendo 0,1% de glicose

Nos resultados observados para DQO, notou-se uma significativa redução em mg/L no valor do controle. Maior, ou similar eficiência de redução na DQO, dependendo da linhagem, foi constatada, quando a condição foi de 0,1% de glicose no meio (Figura 24). Isto deve ter ocorrido devido à diminuição no valor da concentração de açúcar no meio. Observou-se para a linhagem VN-11 em ambos os corantes, um aumento no valor da DQO com relação ao controle (Figura 24), fato este que pode estar ligado ao metabolismo desta bactéria, ou a diminuição no número de células viáveis, impedindo o consumo de substâncias orgânicas.

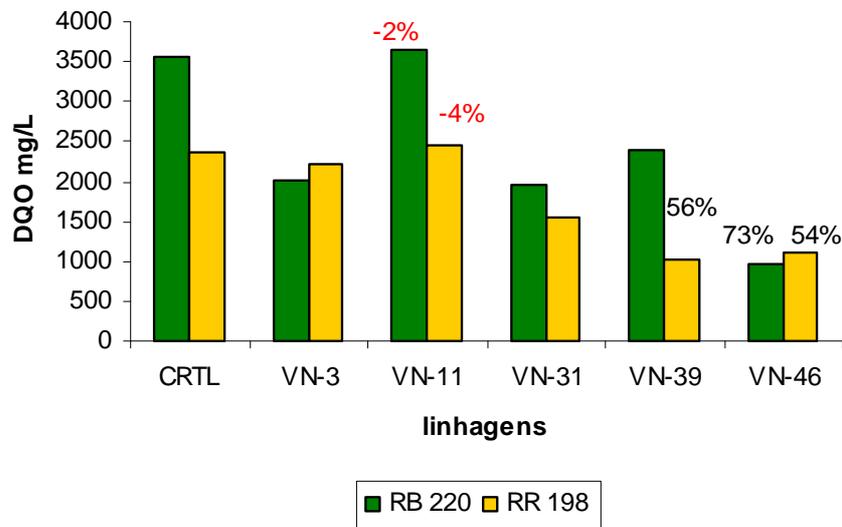


Figura 24. DQO após crescimento das linhagens em meio contendo 0,1% de glicose

Estes resultados foram comparados com os valores de redução obtidos quando o meio de descoloração apresentava 0,5% de glicose e 0,1% de extrato de levedura (Figura 25).

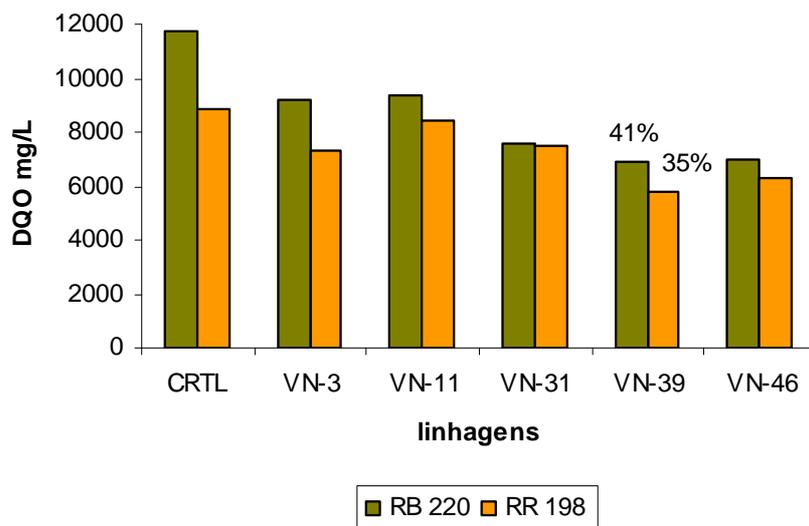


Figura 25. DQO após crescimento das linhagens em meio contendo 0,5% de glicose e 0,1% de extrato de levedura em condições microaeróbias.

Segundo o trabalho de Mustafá e Sponza (2003), que reduziram a concentração de glicose no meio de 2500 mg. L⁻¹ para 250 mg. L⁻¹ observaram que a eficiência na remoção da DQO pelas linhagens presentes no efluente, foi quase a mesma, alcançando 100 e 96% respectivamente, depois de cinco dias de incubação anaeróbica. O aumento na DQO em seus experimentos não afetou a remoção da cor, porém teve uma redução praticamente nula até o 5º dia de experimento.

5.7.2. Comportamento das linhagens em meio de sais contendo ácido fólico e ausência do extrato de levedura

Para o experimento contendo 0,5% de glicose e 0,25% de ácido fólico, observou-se um aumento na descoloração dos corantes, em relação ao meio com 0,1% de glicose, sem extrato de levedura. Estes resultados mostram a influência da concentração de glicose para a descoloração, ou a necessidade de ácido fólico como vitamina para acelerar o metabolismo enzimático, que pode estar ligado à descoloração por algumas linhagens.

A linhagem VN-3, 11 e 31, para o corante RR 198, apresentaram excelentes resultados na ausência de extrato de levedura, descolorindo o meio com este corante, em um tempo mínimo de 8 horas de incubação para a linhagem VN-11 e 18 e 24 horas respectivamente para as linhagens VN-31 e 3 (Figura 26). Estes valores reduzidos nos tempos de descoloração são muito curtos em relação ao tempo levado para o mesmo efeito nas mesmas linhagens incubadas com 0,5% de glicose e 0,1% de extrato de levedura, levando nestas condições, quatro dias para descolorir o corante tratado com a linhagem VN-31, e 7 dias para a linhagem VN-3. A linhagem VN-11 apresentou um tempo de descoloração de 24 hs nestas condições.

O corante azul RB 220, não apresentou bons resultados de descoloração na presença de 0,1% de glicose (Figura 23). Quando o extrato de levedura foi substituído pelo ácido fólico e a concentração de glicose voltou a ser de 0,5%, houve um incremento na porcentagem de descoloração para as linhagens VN-3, 11 e 31 (Figura 26).

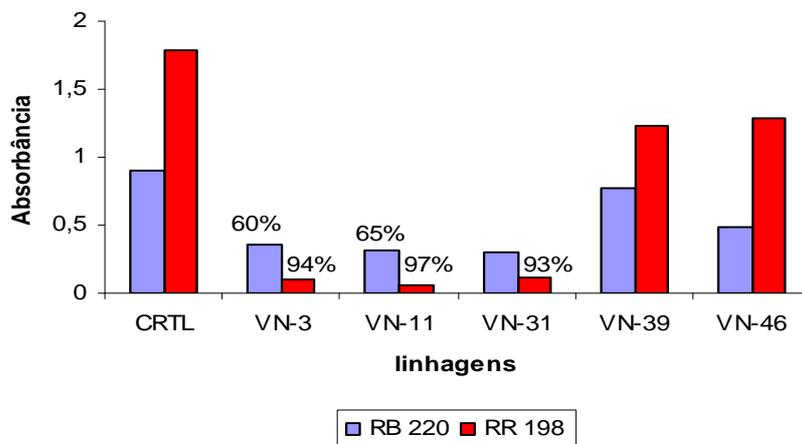


Figura 26. Descoloração após crescimento das linhagens em meio contendo 0,5% de glicose e 0,25 % de ácido fólico

A efetiva descoloração de corantes, depende da complexidade e estrutura destes, da posição dos substituintes nos anéis aromáticos, bem como sua interação com as ligações azo. Entretanto, ainda não está clara a relação entre a posição dos substituintes nos anéis aromáticos. Nos estudos publicados com as estruturas dos corantes, constatou-se que os corantes monoazo são descoloridos mais rapidamente que os diazo e antraquinona (PODGORNIK; GRGIC; PERDIH, 1999). A estrutura química do corante azul reativo RR 220 não está disponível para o domínio público, o que dificulta o estudo do mecanismo de descoloração deste corante através de sua estrutura.

Nos dados obtidos para redução da DQO em presença de ácido fólico, os valores de redução, foram os mais inferiores. A linhagem VN-31 na presença do corante RB 220 apresentou apenas 11% de redução, e para o RR 198 esta redução foi de 17 % (Figura 27). Levando em consideração, que neste meio só faltou 0,1% de extrato de levedura, este deve ter sido o motivo pelo qual as linhagens não conseguiram uma boa redução na carga orgânica.

O extrato de levedura apresenta em sua composição, proteína, de 31 a 48 %, elevados teores de vitaminas como riboflavina, niacina, biotina, tiamina e piridoxina, minerais, que incluem macro e microelementos e carboidratos entre 25-35% (HALÁSZ; LASZTITY, 1991). Com relação ao ácido fólico, este pode ser específico para

determinadas reações enzimáticas, não relacionado com a redução na DQO (Figura 27). Com estes resultados, podemos supor que exista a necessidade de um co-substrato em concentrações adequadas com relação à quantidade de corante no efluente, para ocorrer à descoloração, e que nutrientes como ácido fólico e extrato de levedura podem ser essenciais para melhorar o metabolismo bacteriano frente à descoloração (ácido fólico) e redução da carga orgânica do meio.

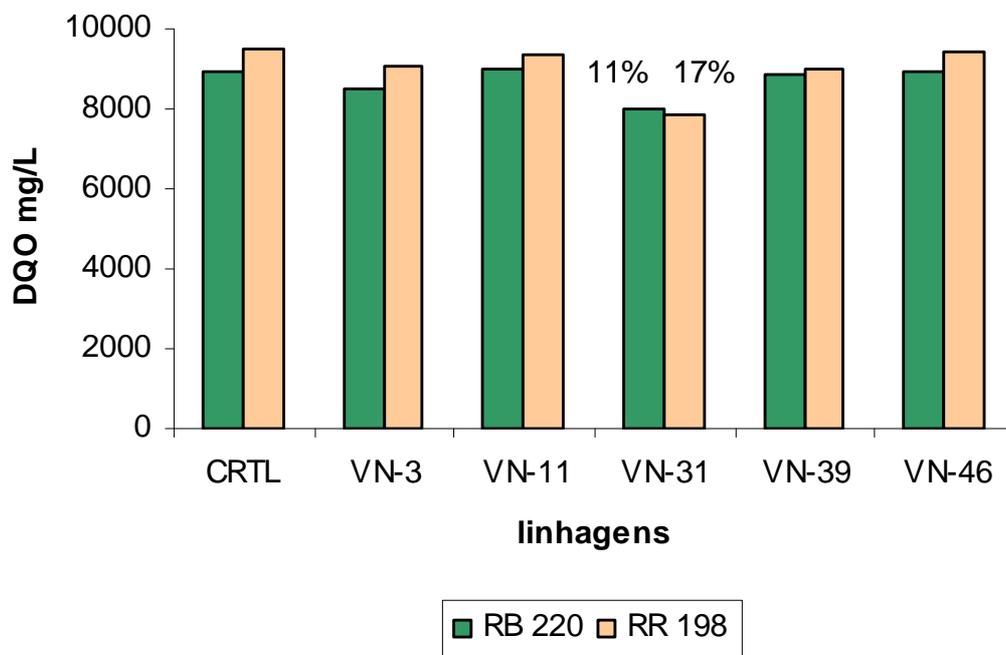


Figura 27. DQO após crescimento das linhagens em meio contendo 0,5% de glicose e 0,25% de ácido fólico

5.8. Efeito da agitação na descoloração e DQO após crescimento das linhagens sob condições microaeróbias

Nos experimentos realizados, foi verificada a importância de condições microaeróbias para ocorrer descoloração dos corantes estudados, bem como, a necessidade de agitação para uma melhor eficiência na redução da DQO.

De acordo com esses resultados, as linhagens selecionadas VN-3, VN-11, VN-31, VN-39 e VN-46, após o 7º dia de incubação no meio contendo corantes em condições microaeróbias, onde ocorreu a descoloração dos corantes nas amostras, foram agitadas por mais sete dias, para verificar a redução da DQO. Esta foi medida no final do experimento microaeróbio e, durante os sete dias de incubação em condições de agitação. Este ensaio foi realizado para verificar qual o tempo necessário para a degradação dos compostos orgânicos, onde podem estar incluídas as aminas aromáticas, formadas na degradação dos corantes em condições microaeróbias, bem como outros metabólitos de degradação.

O meio utilizado para realizar este experimento, foi aquele onde ocorreu maior descoloração dos corantes, que apresentava: meio mínimo de sais minerais, 0,5% de glicose, 0,1% de extrato de levedura e os corantes separadamente a 0,01%.

5.8.1. Efeito da agitação na descoloração

De acordo com os resultados obtidos referentes à descoloração, todas as linhagens descoloriram os corantes em diferentes extensões, sob condições microaeróbias (Figura 28). Para o corante RB 220, a linhagem VN-11 apresentou um ótimo percentual de descoloração, mas o meio manteve-se levemente azulado. Depois da aeração esta coloração desapareceu do meio. O percentual de descoloração para as linhagens VN-31 e 39 foi de praticamente 100%, e após aeração, permaneceram com os mesmos valores de absorvância. As linhagens VN-3 e 46 atingiram 75% e 62% de descoloração respectivamente (Figura 28). Como no final do experimento estático, estas duas linhagens ainda permaneciam com o meio levemente azulado, devido à presença de pequenas concentrações do corante, quando foram aeradas, houve um

incremento no percentual de redução da cor, para 92% e 90% respectivamente (Figura 28). Porém, no 7º dia de agitação, notou-se que as células bacterianas estavam coloridas, devido à presença do corante adsorvido por estas. A descoloração abiótica através de células mortas autoclavadas a 121°C por 15 minutos, não apresentou adsorção significativa, as células da linhagem VN-39 foram as que mais adsorveram os corantes (Figura 28).

Os resultados com o corante vermelho RR 198, no final da incubação microaeróbia, apresentaram descoloração de 98, 95 e 93%, para as linhagens VN-11, 31 e 46 respectivamente, foram as que mais degradaram o corante. As linhagens VN-3, e 39 apresentaram descoloração de 84 e 89%. Depois de aeradas, tiveram estes valores aumentados para 93 e 96%, porém, também ficaram com as células coloridas de vermelho, no final do experimento aeróbio em shaker (Figura 28).

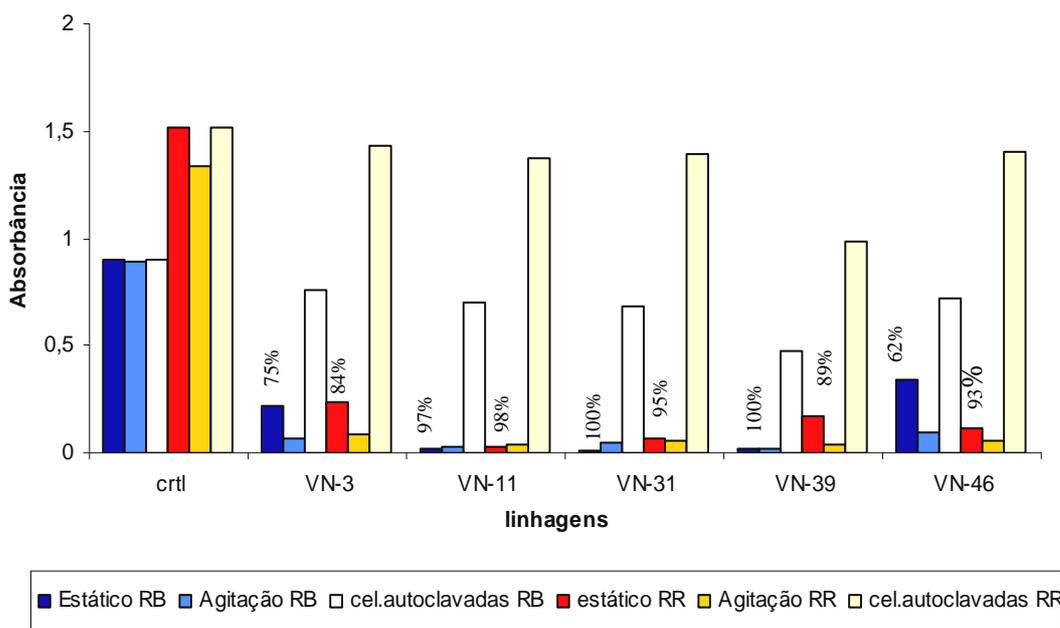


Figura 28. Descoloração após crescimento das linhagens em meio de sais contendo corante RB 220 e RR 198 sob condições microaeróbias seguidas de agitação e adsorção abiótica nas células bacterianas autoclavadas

Os dados obtidos confirmam que a concentração de oxigênio transferido ao meio por agitação inibiu a descoloração dos corantes, nas linhagens que não tinham apresentado um valor de remoção acima de 90 %, em incubação estática.

A produção de enzimas redutivas, envolvidas no processo de descoloração destes corantes, pode apresentar inibição na presença de altas concentrações de oxigênio. Embora estas linhagens tenham apresentado capacidade de descoloração em ambiente microaeróbio, como não o fizeram por completo, as condições seguintes de aeração, não foram favoráveis para a degradação da molécula do corante.

As outras linhagens, que descoloriram em mais de 92 % os corantes em cultivo microaeróbio, não apresentaram coloração nas células, devido à degradação do grupo cromóforo, responsável pela cor de um composto, podendo, entretanto ter formado compostos secundários sem cor, tóxicos para o metabolismo celular. Por esta razão a DQO foi monitorada no final do experimento em condições microaeróbias e da agitação.

5.8.2. Efeito da agitação na DQO

Os tratamentos físico-químicos, biológicos e mesmo pré-tratamentos, reduzem a toxicidade de efluentes industriais e domésticos. Brito, 1996 investigando a toxicidade de refinarias de petróleo, revelou que existe uma correlação positiva e altamente significativa entre DQO e toxicidade nas amostras de efluentes. A redução da DQO foi acompanhada da redução de toxicidade.

As Figuras 29 e 30 mostram os resultados da concentração da DQO para os meios contendo os dois corantes separadamente. A DQO foi determinada no 7º dia de incubação microaeróbia, para verificar a redução nestas condições e durante os sete dias em que foram agitadas a 150 rpm. De acordo com as figuras, foi possível observar que após a incubação microaeróbia, a remoção da matéria orgânica foi baixa, com exceção da linhagem VN-31, no meio contendo corante RR 198, com uma redução de 59%, não ocorrendo o mesmo para o corante RB 220 com a mesma linhagem que teve uma redução praticamente nula (Figuras 29 e 30). Levando em consideração que todos os experimentos foram feitos em duplicata e que a única diferença dos meios neste caso foi o tipo de corante, a degradação do RB 220 no experimento em condições

microaeróbias pode ter produzido metabólitos tóxicos inibindo a redução da DQO pela bactéria.

A linhagem VN-46, que foi responsável pela menor porcentagem de redução na descoloração em condições microaeróbias, foi a que mais reduziu a DQO do meio na presença do corante RB 220. Neste caso, a produção de metabólitos pela degradação deste corante pode não ter sido suficiente para inibir a utilização da matéria orgânica dada pela DQO, pois o mesmo não foi descolorido eficientemente por esta linhagem.

Quando ocorreu agitação, pode se observar uma redução diária no valor da matéria orgânica presente no meio. Para todas as linhagens houve redução, que foi mínima para a linhagem VN-11, 41% e máxima para a linhagem VN-3 que reduziu 88% na presença do corante RR 198 (Figura 30).

Comparando estes resultados com os obtidos na redução da absorbância, constata-se que a linhagem VN-11 apresentou o melhor resultado frente à descoloração do corante RR 198 e a menor redução de DQO.

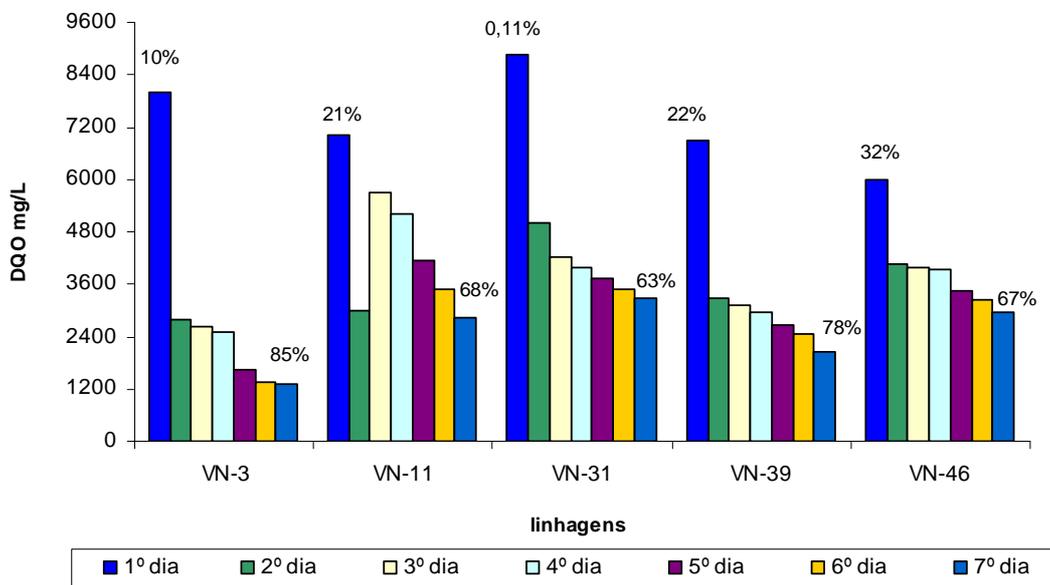


Figura 29. DQO durante sete dias de crescimento sob condições de agitação em meio contendo o corante RB 220

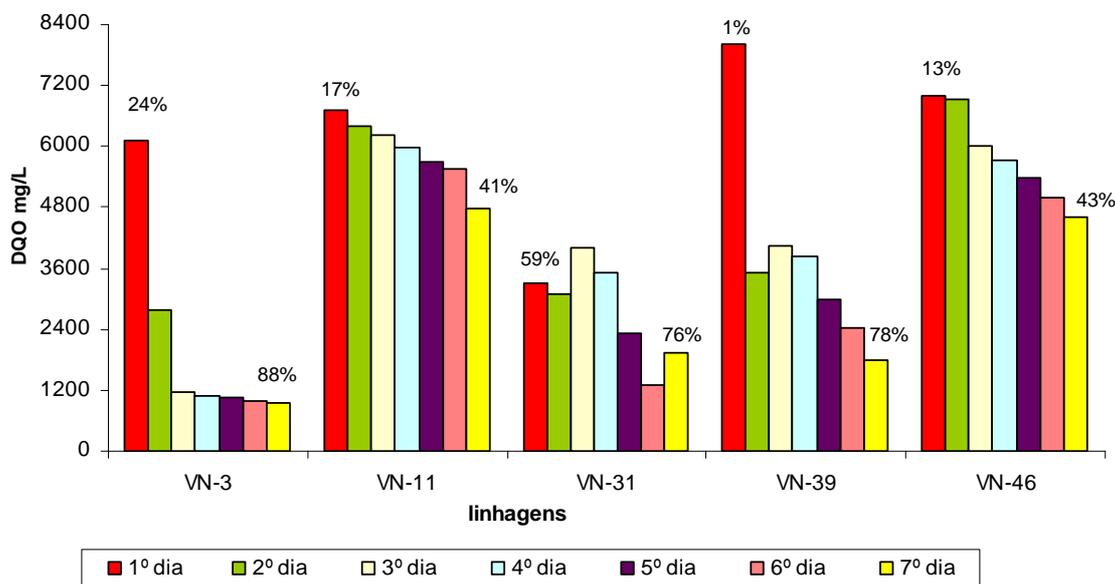


Figura 30. DQO durante sete dias de crescimento sob condições de agitação em meio contendo o corante RR 198

Os resultados obtidos confirmam que há diferenças entre as espécies bacterianas isoladas devido aos diferentes comportamentos para descoloração e redução da matéria orgânica. A baixa eficiência de remoção na DQO quando em condições reduzidas de oxigênio, pode ser devido aos produtos intermediários de degradação, ou ao metabolismo específico de cada bactéria. O aumento na redução da DQO quando as amostras foram aeradas, comprova que todas as linhagens isoladas são capazes de degradar a matéria orgânica sob condições aeróbias e também descolorir o corante em condições reduzidas de oxigênio. Os resultados sugerem que as condições reduzidas de oxigênio, não foram efetivas para remover a DQO, embora a redução desta não tenha mostrado influência para a eficiência na descoloração.

Os corantes azo reativos são recalcitrantes para a degradação microbiana, pois possuem uma estrutura molecular complexa, formada de anéis aromáticos, com um ou mais grupos sulfônicos como substituintes. O grupo azo presente nestes corantes tem uma forte propriedade de aceitar elétrons, porém são inibidos pelas oxigenases. Desta forma os processos de tratamento convencionais aeróbios, não podem descolorir

efluentes contaminados com corantes (NIGAM et al., 1996). Segundo Moutaouakkil et al. (2003), a biodegradação microbiana de azocorantes, só é possível, quando a ligação azo é quebrada. A clivagem redutiva destas ligações é catalisada pela azoredutase, enzima chave na degradação destes corantes. Esta enzima tem sido estudada como sendo induzida por uma flavoproteína, que utiliza NADH e NADPH como doadores de elétrons, para as ligações azo em condições reduzidas de oxigênio.

As flavoproteínas são enzimas que catalisam reações de oxidação-redução usando a flavina mononucleotídeo (FMN) ou flavina adenina nucleotídeo (FAD) como cofatores. São derivadas da vitamina riboflavina. Em muitas flavoproteínas o FAD está ligado de maneira muito forte a enzima, por isso são chamados grupos prostéticos. Eles não transportam elétrons por difundirem-se de uma enzima para a outra; antes, eles fornecem uma maneira pela qual a flavoproteína pode reter temporariamente elétrons, enquanto catalisa a transferência deles de um substrato redutor para um receptor de elétrons (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A melhor degradação dos corantes pela maioria das bactérias na presença de extrato de levedura ao invés de ácido fólico, pode ter ocorrido devido ao mecanismo de transporte de elétrons. A enzima azoredutase, podendo ser uma flavoproteína, pode necessitar da vitamina riboflavina para catalisar suas reações de descoloração. O extrato de levedura é rico em riboflavina e em outras vitaminas, ao contrário da adição da solução de vitamina, que só contém o ácido fólico, que também está presente no extrato de levedura.

5.8.3. Efeito da descoloração dos corantes através das mudanças no espectro de absorção.

O espectro de absorção foi monitorado através de espectrofotômetro UV-VIS em uma faixa de 200 a 700 nm para verificar se os meios de cultivo, contendo os corantes, foram descoloridos, ocorrendo o desaparecimento do pico de absorção do corante no visível. O grau de descoloração foi determinado no sobrenadante das culturas, crescidas em condições microaeróbias durante sete dias, seguidas de agitação por mais sete dias. As amostras foram analisadas no 7º dia de cada condição.

Foi verificado, através dos espectros obtidos, que ocorreu descoloração dos corantes e não houve adsorção e, a maioria das linhagens, apresentaram no final da incubação sua cor inicial. Estas observações são concordantes com as realizadas em trabalhos de descoloração como o de Knapp; Newby (1995) e Belote (2000).

Sani e Banerjee (1999), estudaram a degradação de corantes têxteis e pigmentos por linhagens de *Kurthia sp*, e constataram que a descoloração do corante por bactérias pode ser devido à adsorção ou a biodegradação. Na adsorção, o exame do espectro, revela o decréscimo proporcional nos valores de absorbância dos picos, nos comprimentos de ondas escolhidos. Se a remoção dos corantes é atribuída a biodegradação, o maior valor de absorbância, obtido no pico do visível, desaparece completamente, podendo ou não aparecer um novo pico.

De acordo com a Figura 31 pode-se observar que a linhagem VN-3 retirou o corante RB 220 do meio sob condições microaeróbias. O pico máximo do corante RB 220 no visível permaneceu na amostra, o que comprova ainda, sua presença no meio. Houve um aumento significativo na absorbância do pico a 299 nm, podendo ser atribuído à produção de algum metabólito da utilização do meio ou, da descoloração do próprio corante, como as aminas aromáticas. Quando a amostra foi agitada, este pico de 299 nm, teve uma redução de 58% (Figura 31 e Tabela 2). Comportamento semelhante foi observado para a linhagem VN-46 (Figura 35 e Tabela 6), na presença do meio contendo o mesmo corante. Para o corante RR 198, dos três comprimentos de onda registrados no controle, apenas o menor permaneceu nas amostras crescidas com as linhagens VN-3 (Figura 31 e Tabela 2) e VN-46 (Figura 35 e Tabela 6), podendo confirmar a degradação do corante sob condições microaeróbias. Com a linhagem VN-11 (Figura 32) sob condições microaeróbias para o corante RB 220, um pico em um comprimento de onda na região onde absorve o corante ainda permaneceu, mas, com uma absorbância bem menor que o controle. Em condições aeróbias, este pico desapareceu e, as células permaneceram na sua cor original. Esta linhagem foi a mais eficiente com relação ao tempo de descoloração para o corante RR 198, apresentando um mínimo de 8 horas para o meio ficar completamente sem cor. Dos três comprimentos de onda detectados no controle com o corante RR 198, apenas o de menor comprimento de onda permaneceu (Figura 32 e Tabela 3).

Uma observação interessante, frente ao comportamento da linhagem VN-31 (Figura 33 e Tabela 4), na presença do corante RR 198 foi constatada. Ocorreu uma significativa diminuição na absorbância do pico de 299 nm com relação ao controle. Algumas linhagens diminuíram a absorbância na região de 270 a 400 nm, quando foram agitadas, estas regiões podem corresponder a absorbância dos produtos de degradação dos corantes.

De acordo com os resultados apresentados pelos espectros, o desaparecimento do pico de 613 nm, sob condições microaeróbias, referente ao corante RR 220, só ocorreu com as linhagens VN-31 e VN-39 (Figura 33 e 34). Todas as linhagens foram capazes de descolorir completamente o corante RR 198, devido ao desaparecimento do pico, na região do visível, sob condições microaeróbias.

Este comportamento, frente ao corante RB 220, pode estar relacionado com a estrutura do corante, que apresenta em sua molécula 4% de cobre de complexo metálico, sendo uma classe de composto perigoso para a água. Segundo a lei alemã das águas, este composto apresenta uma classificação representada por WGK = 2 (DYSTAR, 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos por Cheng et al. (2003), que estudaram a descoloração de dois corantes reativos em condições microaeróbias, onde observaram que o pico de 515 nm referente ao corante RR 198 desapareceu completamente após sete dias de cultivo. Para o corante remazol Black B houve uma expressiva diminuição da cor a 597 nm e, também, na absorbância dos picos a 306 e 370 nm deste corante, sendo que a linhagem estudada de *Aeromonas hydrophila* permaneceu sem cor.

Young e Spyros (2004), estudando culturas metanogênicas, isoladas de um digestor anaeróbio municipal, mostrou o espectro de dois corantes em função do tempo de incubação anaeróbia. Para ambos os corantes, o grau de descoloração aumentou com o tempo de incubação. Houve um deslocamento do comprimento de onda na região do visível com relação ao comprimento máximo dos corantes, o que foi atribuído aos respectivos produtos de descoloração dos mesmos.

De acordo com os resultados obtidos nas análises de espectrofotometria de varredura, a remoção da cor pelas linhagens selecionadas, pode ser atribuída a biodegradação, pois os picos referentes aos corantes na região do visível,

desapareceram completamente, para algumas linhagens e a adsorção na superfície celular foi praticamente nula.

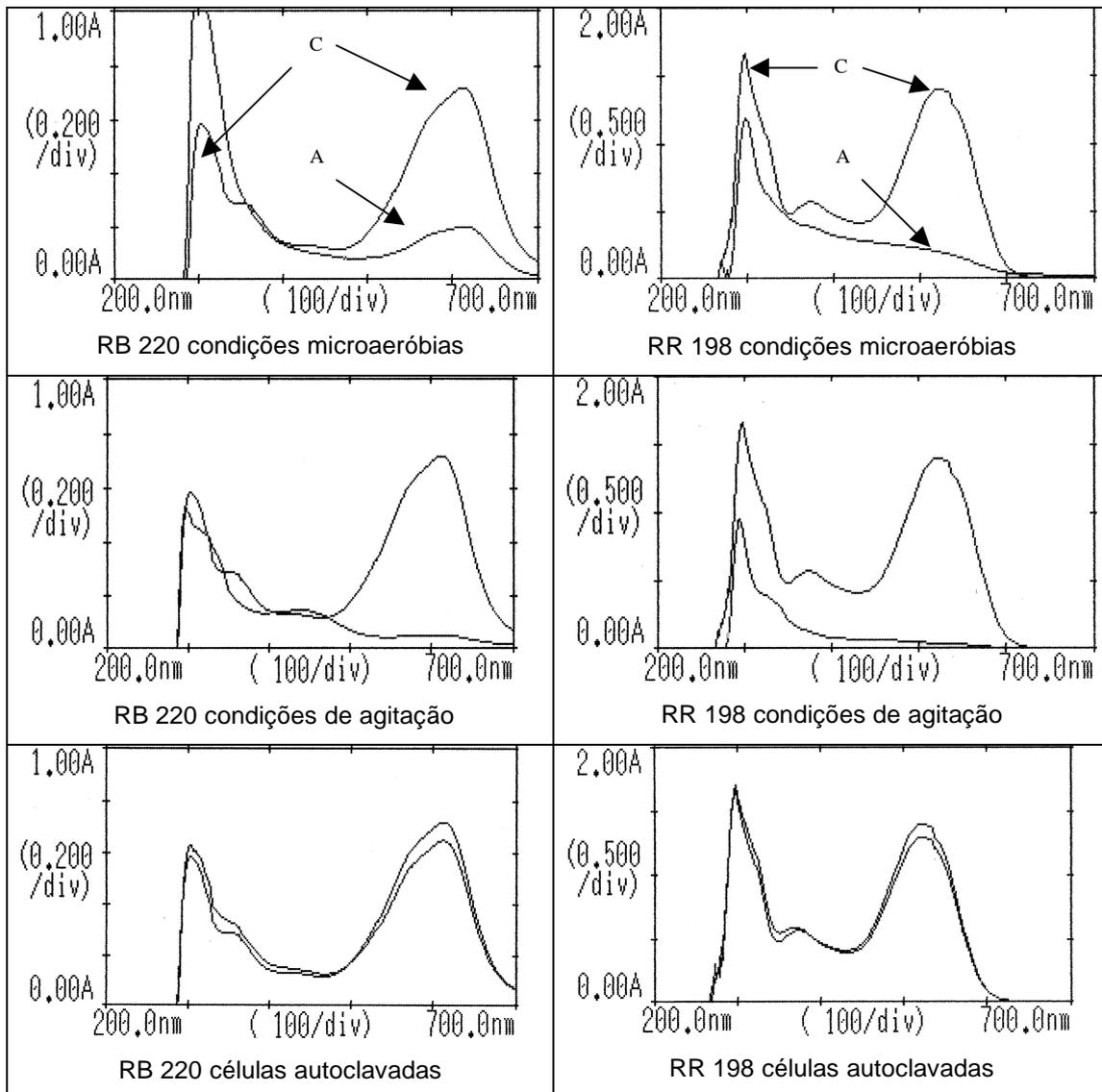


Figura 31. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-3 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra

Tabela 8. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-3

Corante azul CI: Reactive Blue 220						
linhagem	Condições microaeróbias		Condições de agitação		Células autoclavadas	
	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	613	0,716	610	0,815	-	-
	304	0,581	302	0,594	-	-
VN-3	615	0,199	594	0,047	613	0,645
	299	1,243	299	0,525	304	0,624
Corante vermelho CI: Reactive Red 198						
linhagem	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	524	1,435	520	1,458	-	-
	374	0,566	377	0,583	-	-
	299	1,661	299	1,668	-	-
VN-3	ND	ND	ND	ND	523	0,948
	ND	ND	ND	ND	377	0,464
	300	1,202	294	0,962	302	0,704

(ND) Não detectado

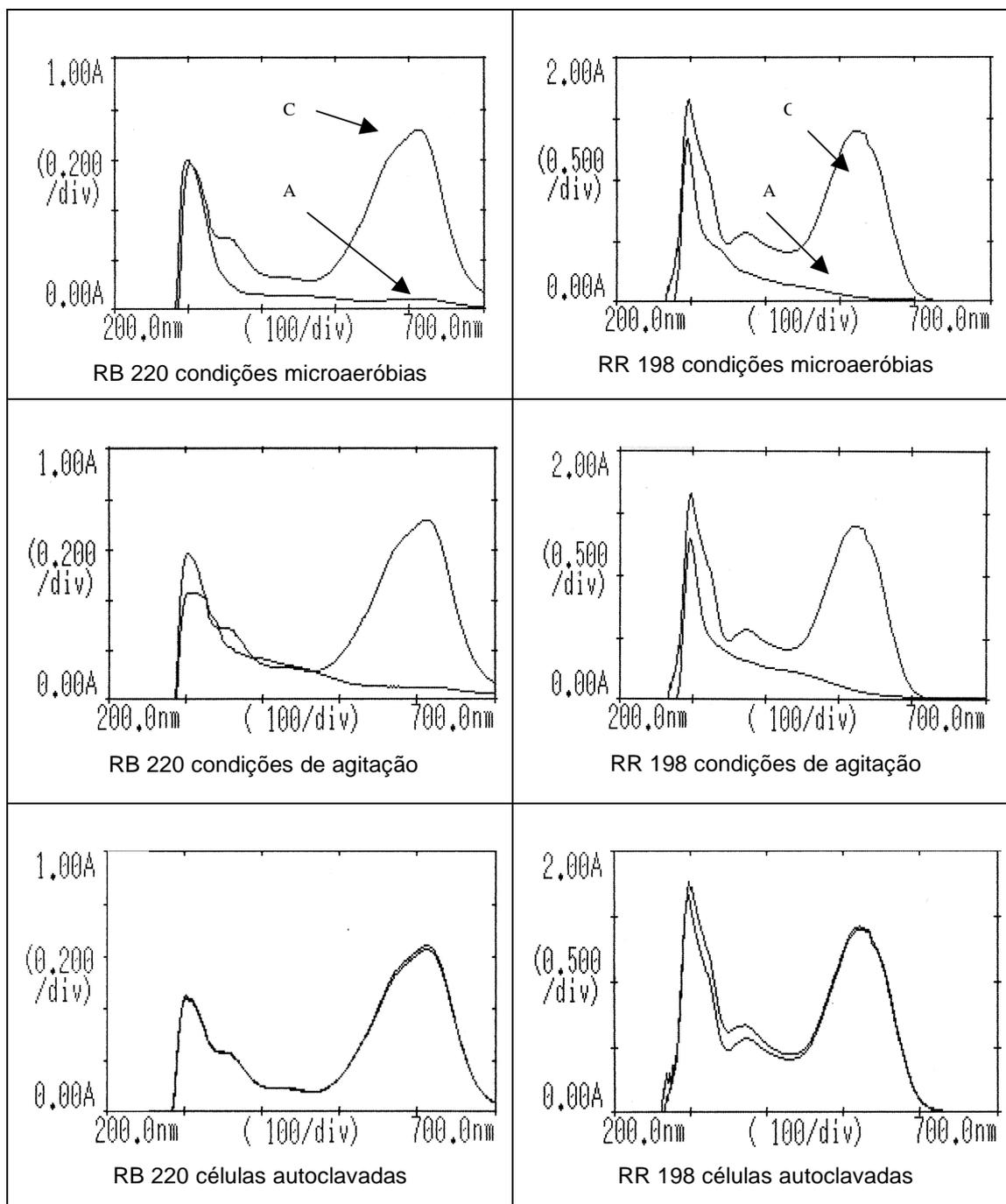


Figura 32. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-11 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra

Tabela 9. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-11

Corante azul CI: Reactive Blue 220						
linhagem	Condições microaeróbias		Condições de agitação		Células Autoclavadas	
	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	613	0,716	610	0,815	-	-
	304	0,581	302	0,594	-	-
VN-11	619	0,041	ND	ND	613	0,640
	302	0,600	313	0,427	303	0,444

Corante vermelho CI: Reactive Red 198						
linhagem	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
	Ctrl	524	1,435	520	1,458	-
374		0,566	377	0,583	-	-
299		1,661	299	1,668	-	-
VN-11	ND	ND	ND	ND	523	1,423
	ND	ND	ND	ND	370	0,699
	297	1,333	296	1,487	300	1,765

(ND) Não detectado

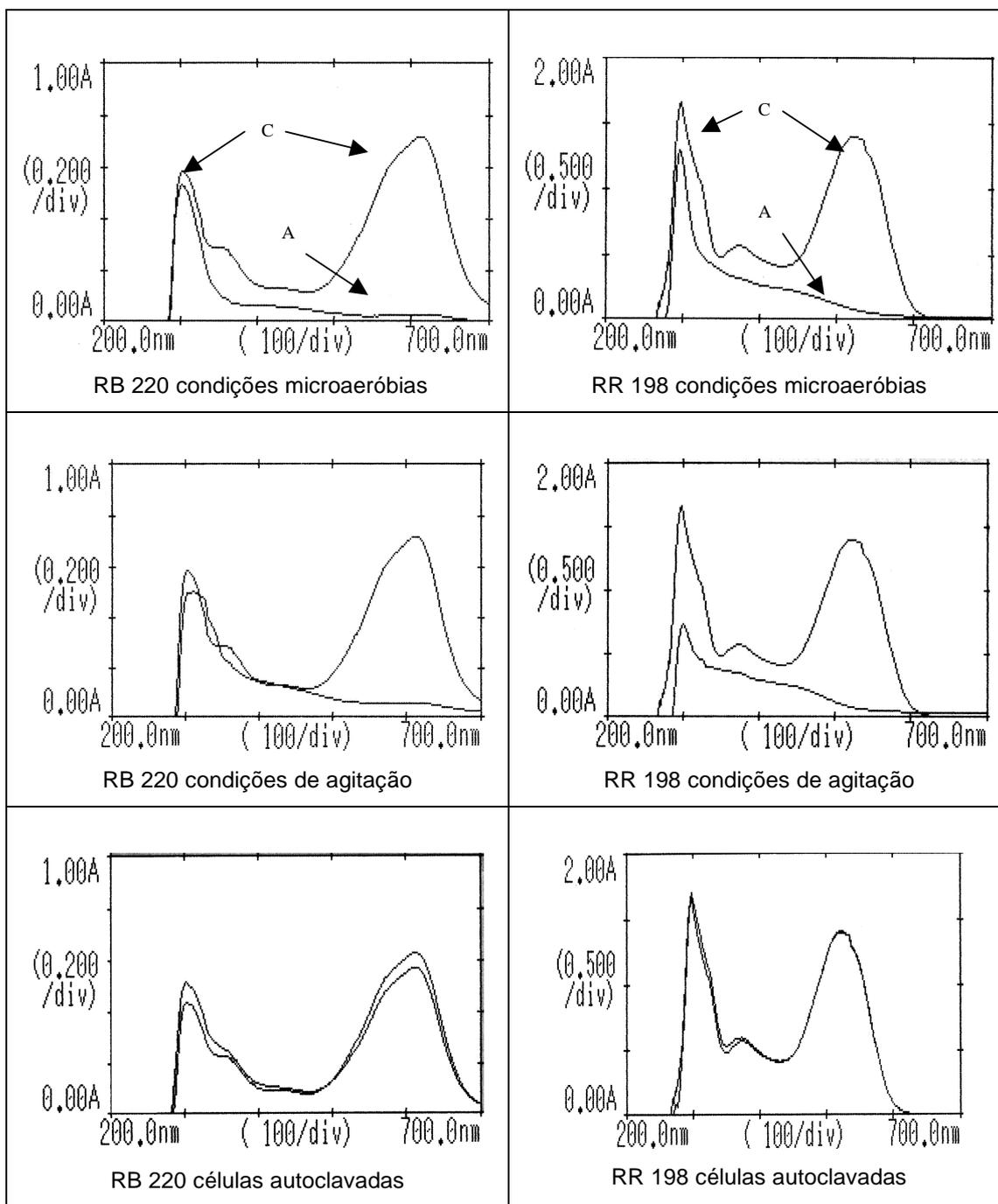


Figura 33. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-31 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra

Tabela 10. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-31

Corante azul CI: Reactive Blue 220						
linhagem	Condições microaeróbias		Condições de agitação		Células autoclavadas	
	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	613	716	610	815	-	-
	304	581	302	594	-	-
VN-31	ND	ND	ND	ND	614	583
	303	528	314	499	304	513

Corante vermelho CI: Reactive Red 198						
linhagem	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
	Ctrl	524	1435	520	1458	-
374		566	377	583	-	-
299		1661	299	1668	-	-
VN-31	ND	ND	ND	ND	524	1413
	ND	ND	ND	ND	373	593
	298	129	302	732	299	1710

(ND) Não detectado

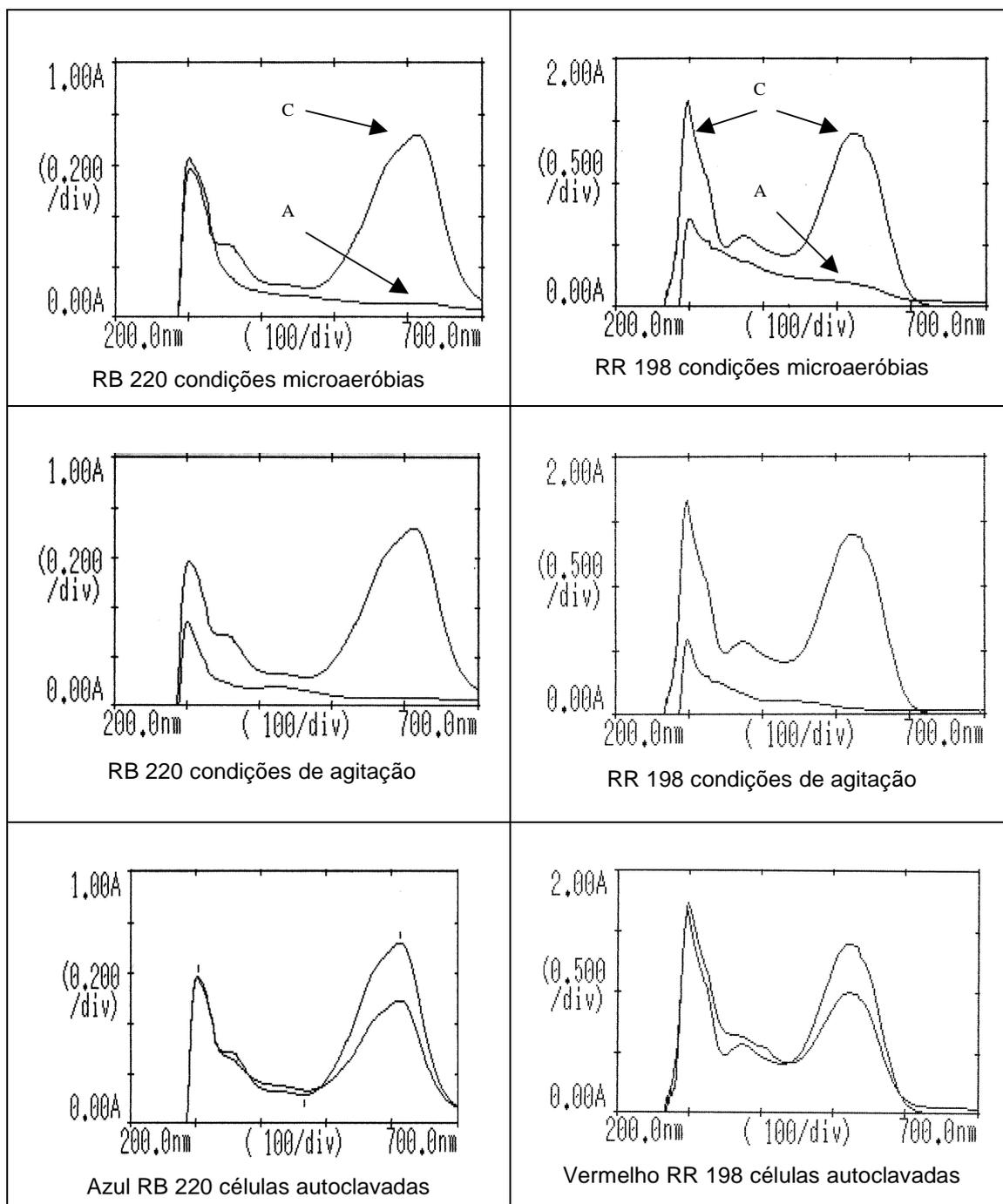


Figura 34. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-39 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra

Tabela 11. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-39

Corante azul CI: Reactive Blue 220						
linhagem	Condições microaeróbias		Condições de agitação		Células autoclavadas	
	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	613	0,716	610	0,815	-	-
	304	0,581	302	0,594	-	-
VN-39	ND	ND	ND	ND	613	0,489
	302	0,626	302	0,342	302	0,581

Corante vermelho CI: Reactive Red 198						
linhagem	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
	Ctrl	524	1,435	520	1,458	-
374		0,566	377	0,583	-	-
299		1,661	299	1,668	-	-
VN-39	ND	ND	ND	ND	523	0,997
	ND	ND	ND	ND	372	0,584
	302	0,718	299	0,583	300	1765

(ND) Não detectado

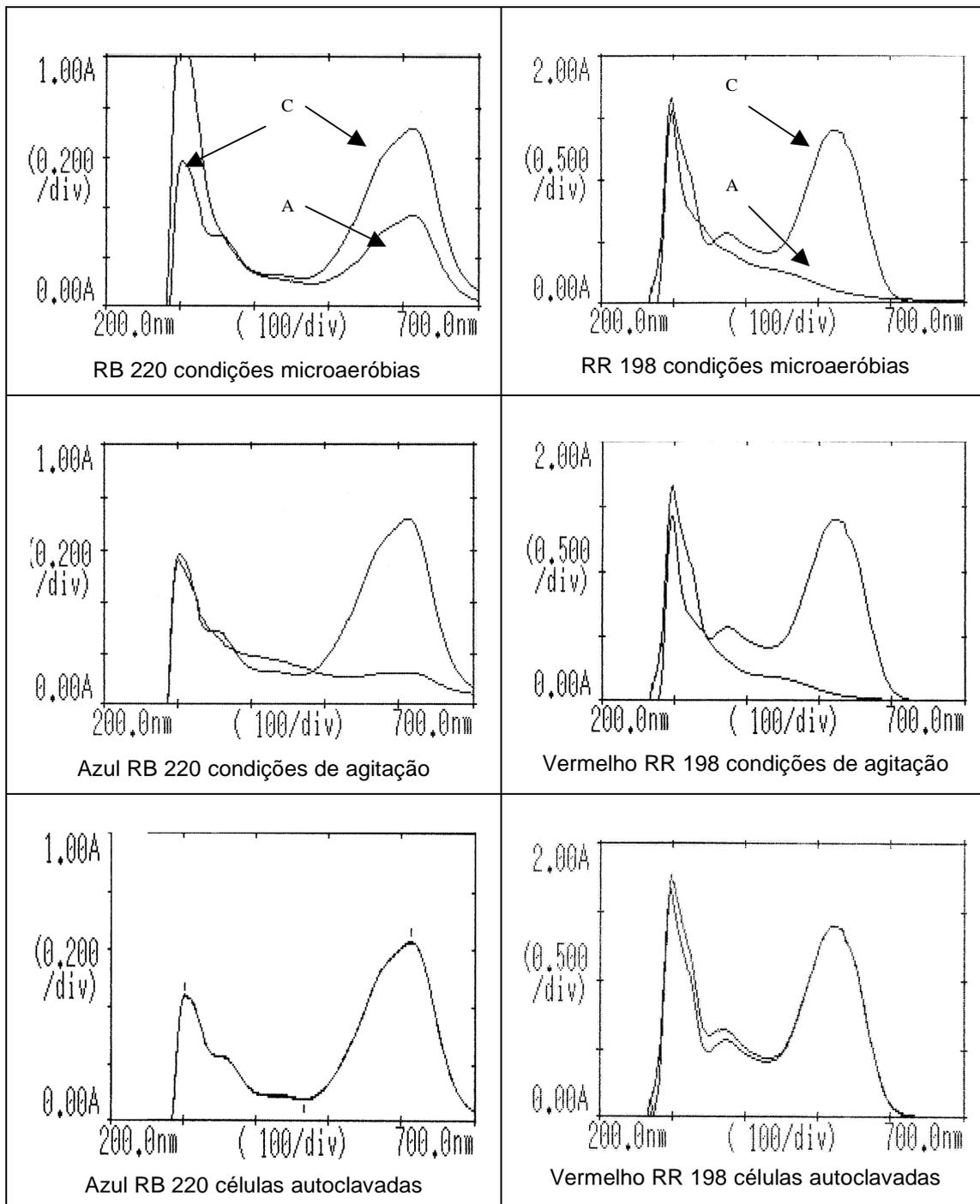


Figura 35. Espectro de absorção do meio contendo o corante RB 220 e RR 198 após crescimento com a linhagem VN-46 no 7º dia de incubação microaeróbia e no 7º dia de agitação onde (C) controle e (A) amostra

Tabela 12. Comparação dos valores de absorção dos picos presentes no controle contendo corante após crescimento com a linhagem VN-46

Corante azul CI: Reactive Blue 220						
Linhagem	Condições microaeróbias		Condições de Agitação		Células autoclavadas	
	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	613	0,716	610	0,815	-	-
	304	0,581	302	0,594	-	-
	614	0,366	610	0,125	613	0,622
VN-46	302	1,115	303	0,558	303	0,440
	Corante vermelho CI: Reactive Red 198					
Linhagem	λ	ABS	λ	ABS	λ	ABS
Ctrl	524	1,435	520	1,458	-	-
	374	0,566	377	0,583	-	-
	299	1,661	299	1,668	-	-
VN-.46	ND	ND	ND	ND	522	1,403
	ND	ND	ND	ND	370	0,642
	299	1,547	298	1,454	300	1,765

(ND) Não detectado

5.8.4. Análise cromatográfica da degradação dos corantes

Vários métodos utilizando diferentes técnicas analíticas são utilizados para análise de corantes. A CLAE é uma das técnicas mais utilizadas, principalmente pelo seu alto poder de separação e capacidade de detectar níveis muito baixos (PRADO; GODOY, 1998).

As linhagens VN-3, VN-31 e VN-39 foram selecionadas, para serem avaliadas por CLAE, por apresentaram os melhores resultados na descoloração dos corantes,

bem como, na redução da DQO. Os resultados obtidos por esta análise, tiveram a finalidade de fornecer informações confirmativas e complementares das observadas, empregando o espectrofotômetro UV-VIS.

Os resultados encontrados após a utilização da CLAE, foram coerentes com os valores referentes às análises de espectrofotometria de varredura.

5.8.4.1. RB 220

Os resultados obtidos após crescimento da linhagens VN-3, VN-31 e VN-39 em meio contendo corante RB 220, estão apresentados na Figura 36. No comprimento de onda de 350 nm, depois do tratamento microaeróbio com a linhagem VN-3, o pico referente ao corante (tempo de retenção de 13,5min), desapareceu. Os picos iniciais do cromatograma do controle, referente aos componentes do meio, sofreram mudanças, sendo que houve um aumento da maioria dos picos, depois da incubação microaeróbia, indicando a produção de metabólitos a partir da degradação do meio e do corante. Quando ocorreu agitação desta amostra, por mais sete dias, a maioria dos picos diminuíram, indicando que a produção de metabólitos produzidos na fase microaeróbia podem ter sido degradados sob condições aeróbias por esta bactéria. O comportamento observado para a linhagem VN-31 foi o mesmo da linhagem VN-3, apresentando ótima degradação do corante.

O pico referente ao RB 220 desapareceu após cultivo com a linhagem VN-39 sob condições microaeróbias e foi observado um aumento nos picos iniciais do cromatograma. Quando a amostra foi agitada, apresentou redução nos picos iniciais produzidos na incubação microaeróbia (Figura 36).

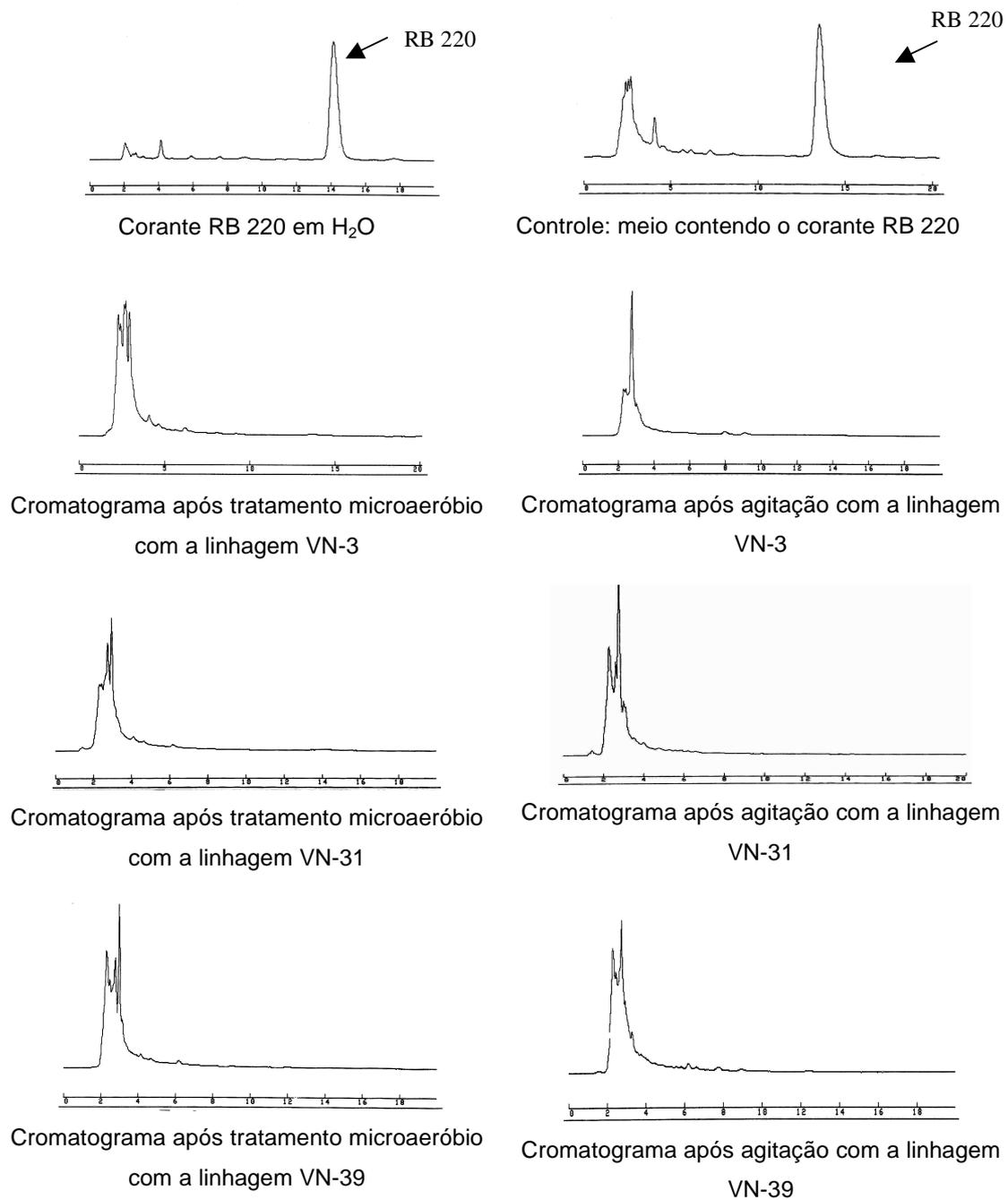


Figura 36. Cromatogramas obtidos a partir da degradação do corante RB 220 no 7º dia de incubação microaeróbia e após o 7º dia de agitação com as linhagens VN-3, 31 e 39 no λ de 350 nm

A fim de monitorar o aparecimento e permanência de novos compostos produzidos pelo processo de biodegradação do corante azul RB 220, um outro comprimento de onda foi utilizado. Moutaouakkil et al. (2003), utilizaram comprimento de onda de 254 nm para detectar produtos de degradação do azocorante Metil Red, formados por linhagens de *Enterobacter agglomerans* isolada de lodo contaminado com corante. Chang e Lin (2000), estudaram os produtos de degradação do corante têxtil Reactive Red 22 e usaram CLAE com um detector UV-VIS no comprimento de onda de 254 nm. Kirby, 1999 detectou por CLAE, a 254 nm, um metabólito sem cor não identificado, no 6º dia de incubação estática, produzido pela degradação do corante Remazol Black B por *P. tremellosa*.

O comprimento de onda utilizado neste estudo foi o de 254 nm. Este comprimento de onda é utilizado pela maioria dos pesquisadores que estudam a degradação de corantes, pois esta faixa é a região de absorbância no detector UV, de várias amins aromáticas (PINHEIRO; TOURAUD; THOMAS, 2004).

A linhagem VN-3 apresentou sob condições microaeróbias a formação de picos a 254 nm, que diminuíram quando a amostra foi agitada. As linhagens VN-31 e 39 foram as que mais reduziram os picos formados sob condições microaeróbias, quando as amostras foram agitadas (Figura 37).

As análises realizadas por CLAE durante a fase microaeróbia seguidas de agitação, mostram a evolução dos metabólitos, que podem ter sido produzidos pelos componentes do meio, ou pela degradação do corante. As mudanças podem ser explicadas pela utilização do meio de cultivo, ou pelas modificações estruturais das moléculas dos corantes devido à redução da ligação azo, podendo ter produzido metabólitos, como as amins aromáticas. Os picos de metabólitos detectados, não foram identificados, pois nenhum padrão foi empregado.

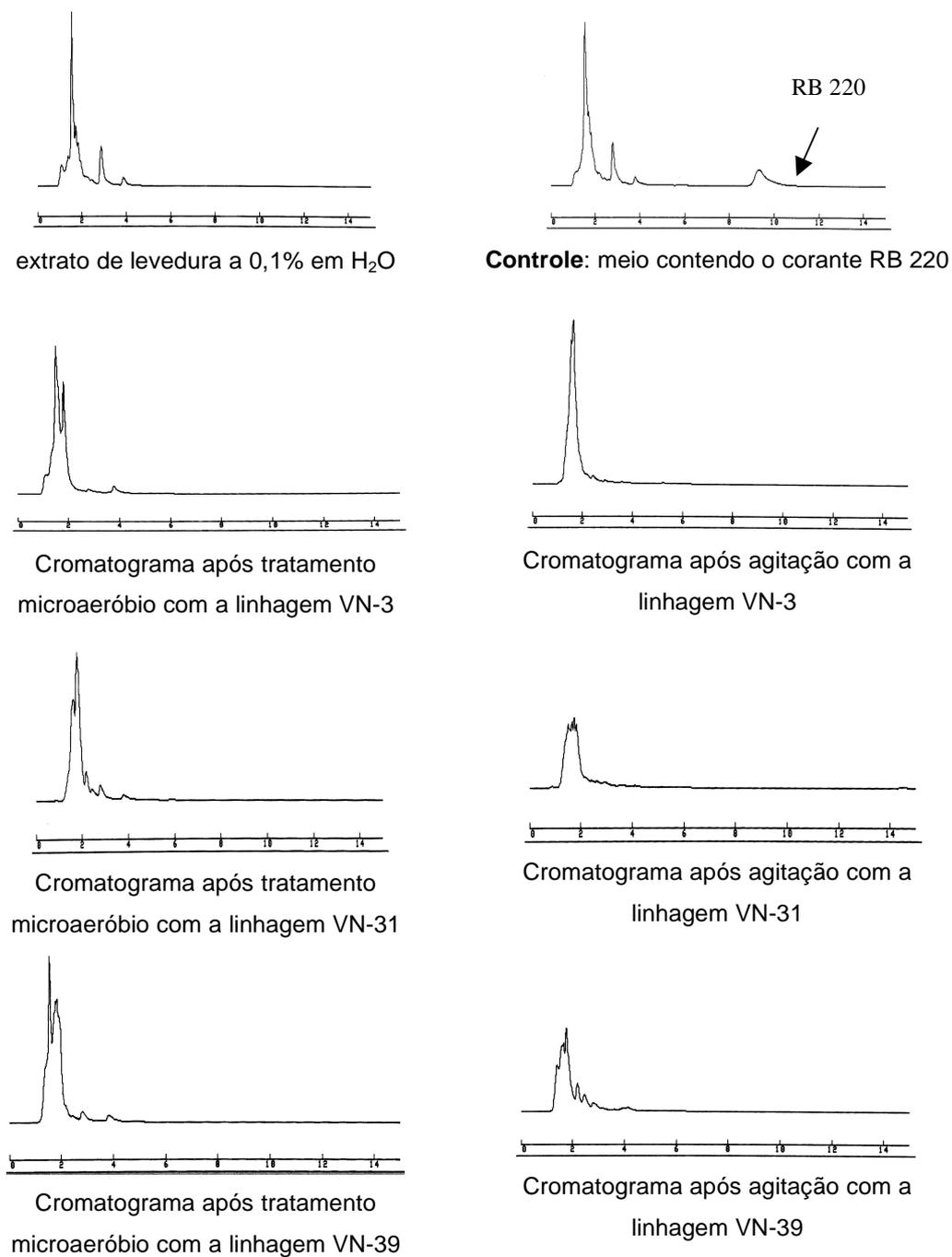
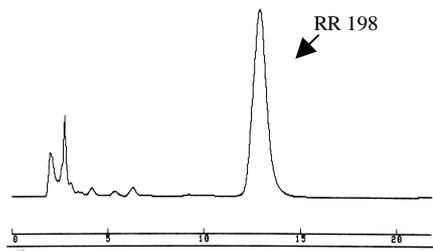


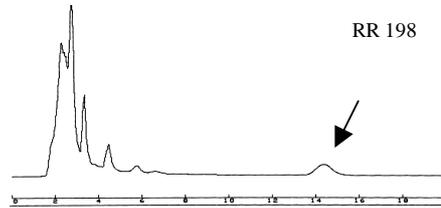
Figura 37. Cromatogramas obtidos a partir da degradação do corante RB 220 no 7º dia de incubação microaeróbia e após o 7º dia de agitação com as linhagens VN-3, 31 e 39 no λ de 254 nm

5.8.4.2 RR 198

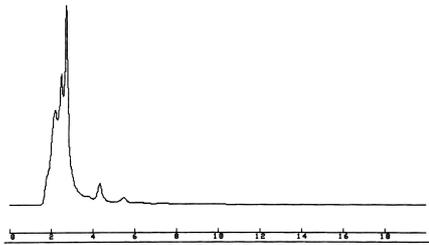
De acordo com a Figura 38 pode se verificar o comportamento das três linhagens selecionadas na degradação do corante RR 198. Realizou-se um estudo em vários comprimentos de onda para separação deste corante, sendo escolhido o comprimento de 272 nm para realização dos experimentos. Os resultados obtidos em CLAE após crescimento da linhagem VN-3 sob condições microaeróbias mostrou que o pico referente ao corante (tempo de retenção de 14,3 min) desapareceu, mostrando uma degradação total do pico referente ao corante. O perfil do cromatograma para o corante RR 198 mostrou que houve modificações, quando a amostra foi agitada, reduzindo a concentração da maioria dos picos. O comportamento observado para a linhagem VN-31 e 39 (Figura 38) com relação à degradação do corante foi idêntica à linhagem VN-3. A incubação microaeróbia para estas duas linhagens mostrou um comportamento parecido quanto à produção de metabólitos. Quando houve agitação destas amostras a linhagem VN-39 apresentou uma maior capacidade de diminuir os picos formados na incubação microaeróbia, onde podem estar incluídas as amins aromáticas.



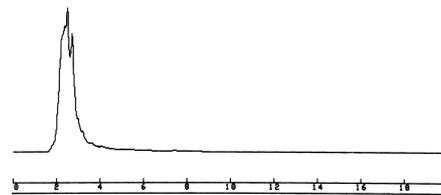
Corante vermelho RR 198 em H₂O



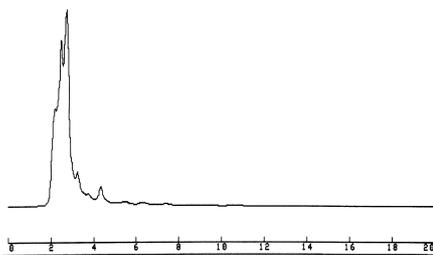
Controle: meio contendo o corante RR 198



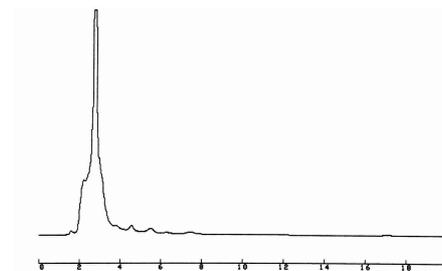
Cromatograma após tratamento microaeróbio com a linhagem VN-3



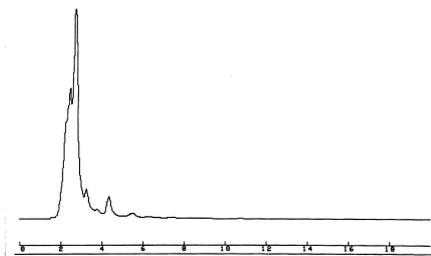
Cromatograma após agitação com a linhagem VN-3



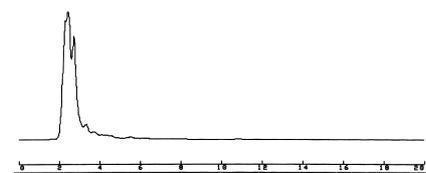
Cromatograma após tratamento microaeróbio com a linhagem VN-31



Cromatograma após agitação com a linhagem VN-31



Cromatograma após tratamento microaeróbio com a linhagem VN-39



Cromatograma após agitação com a linhagem VN-39

Figura 38. Cromatogramas obtidos a partir da degradação do corante RR 198 no 7º dia de incubação microaeróbia e após o 7º dia de agitação com as linhagens VN-3, 31 e 39 no λ de 272 nm

Chang e Lin (2000), em seus experimentos de descoloração com *Pseudomonas luteola*, constataram através de análise em CLAE, que o corante Reactive Red 22, no início da incubação estática, apresentou um pico A, com um tempo de retenção de 9 minutos. No decorrer do experimento, a intensidade do pico A diminuiu, acompanhado com um aumento na intensidade de dois outros picos, que chamou de B e C, com tempo de retenção de 6 e 5 minutos respectivamente. Como conclusão do seu trabalho, sugeriu que a linhagem de *P. luteola* causou a clivagem da ligação azo do corante, que sofreu decomposição para formar aminas aromáticas. Através da continuidade de seu estudos, confirmou-se que o pico B teve o mesmo tempo de retenção de 6 minutos de um padrão referente a uma amina aromática sulfonada.

Baseando-se no trabalho de Nuttapun et al. (2004), o aumento no número de picos ou da absorbância destes, presentes nos meios contendo os corantes RB 220 e RR 198 em relação ao controle, pode ter ocorrido como resultado da redução das ligações azo pelas bactérias, produzindo metabólitos de descoloração. A diminuição no tamanho dos picos ou de sua absorbância, quando as amostras foram tratadas aerobicamente pelas linhagens, pode ter sido um indício, que estes metabólitos de degradação tenham sido utilizados pelas bactérias como fonte de energia.

Exemplos das amostras incubadas com as linhagens selecionadas para este estudo, com a intenção de descolorir/degradar os corantes RB 220 e RR 198, podem ser observados nas figuras 39 e 40.

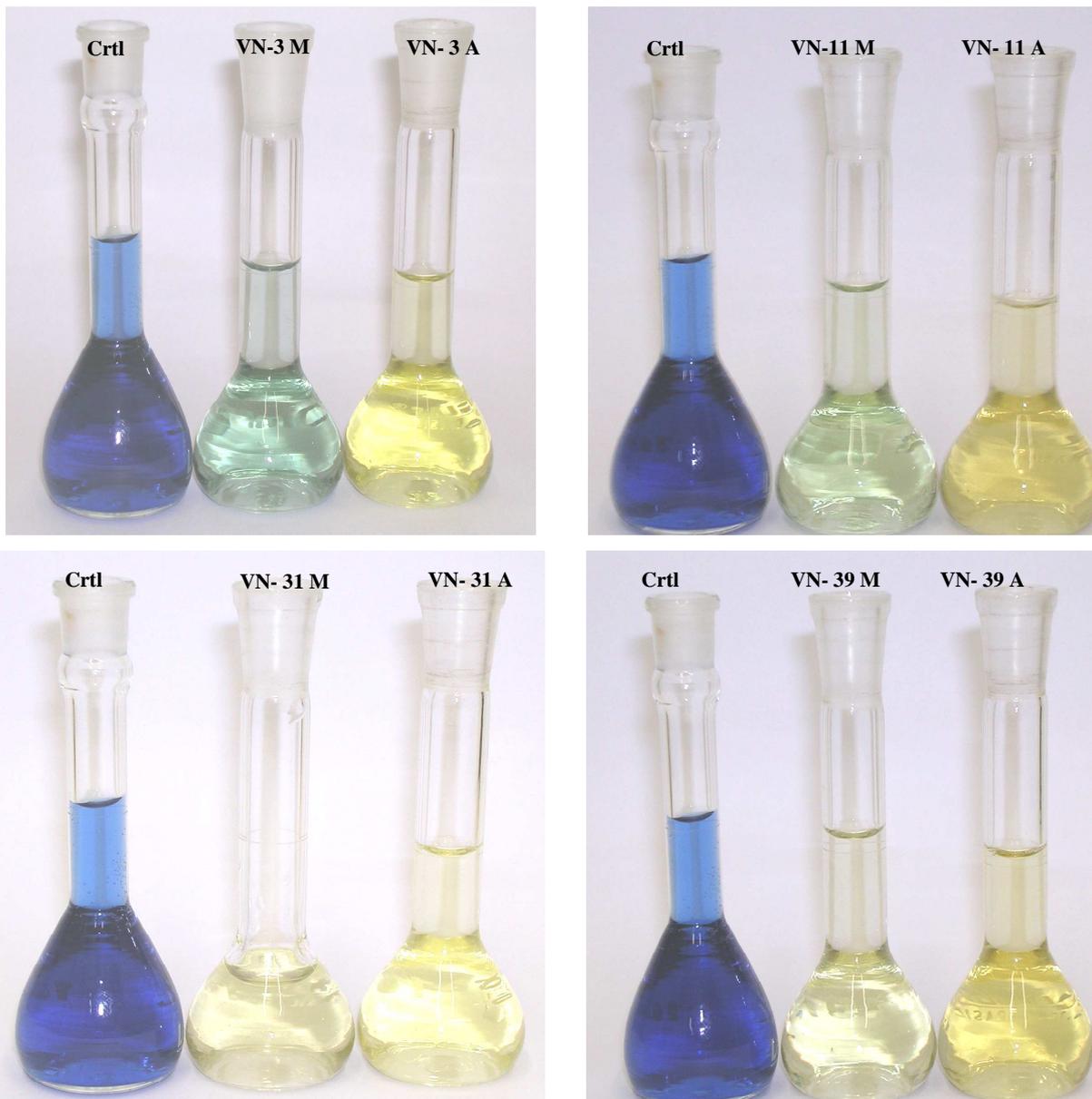


Figura 39. Sobrenadante do meio após crescimento com as linhagens bacterianas que descoloriram o corante RB 220, visualizadas em condições microaeróbias (M) e após agitação (A) em relação ao controle (Ctrl).

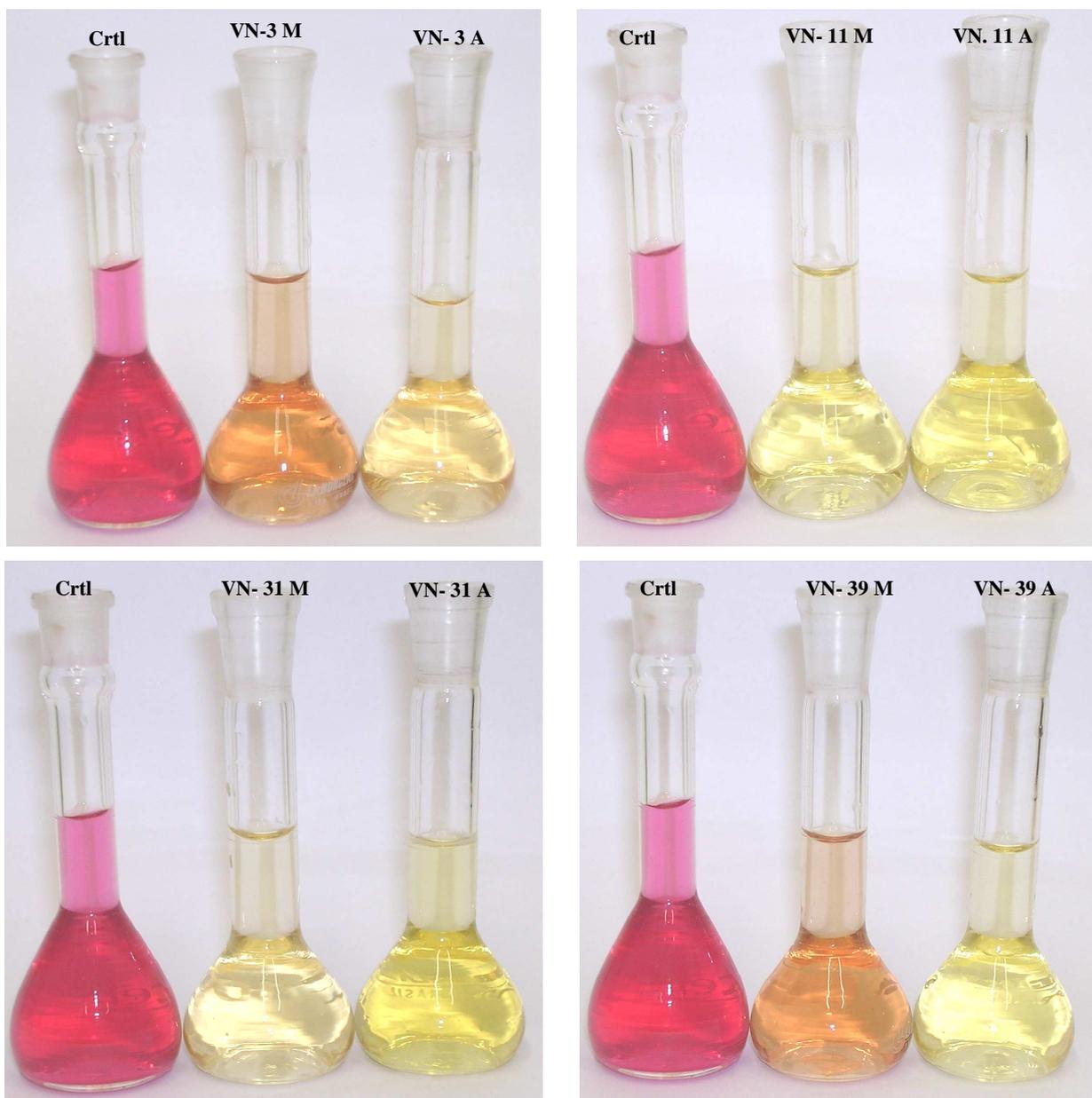


Figura 40. Sobrenadante do meio após crescimento com as linhagens bacterianas que descoloriram o corante RB 198 visualizadas em condições microaeróbias (M) e após agitação (A) em relação ao controle (Ctrl)

5.9. Identificação das linhagens selecionadas

O estudo de um isolado favorável para o desenvolvimento de um bioprocessamento de descoloração eficiente é muito importante. Para este fim as linhagens selecionadas com maior capacidade de descoloração e redução da DQO foram identificadas através de microscopia óptica e testes bioquímicos. De acordo com a Tabela 7, pode-se observar os resultados obtidos nos testes utilizados para identificação.

Tabela 13. Resultados dos testes de identificação bioquímica e fisiológica das linhagens VN-3, 11, 31, 39 e 46.

Características	Linhagens				
	VN-3	VN-11	VN-31	VN-39	VN-46
Morfologia	bastonete	Cocos	bastonete	Cocos	bastonetes
Coloração Gram	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
KOH	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Coloração esporo	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Motilidade	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
Crescimento aeróbico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Crescimento anaeróbico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Redução de Nitrato	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Catalase	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Citocromo oxidase	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
Citrato	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Produção indol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Hidrólise da gelatina	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
Hidrólise da esculina	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Oxidação/fermentação	(-)/(-)	(+)/(+)	(+)/(+)	(-)/(-)	(-)/(-)
Produção de gás	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Vermelho de metila	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
Voges Proskauer	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
*TSI	V/V/H ₂ S	A/A	A/A/Gás	V/A	V/V
Acido a partir de:					
Manose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Manitol	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Ramnose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Arabinose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Sacarose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Glicose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Xilose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
Galactose	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)

* TSI: Triple Sugar Iron.

A/A: base ácida (amarelo) e ápice alcalino (amarelo) - metabolização dos açúcares liberam produtos ácidos.

Gás: Produção de gás: Ácido fórmico através da enzima formiase forma $\text{CO}_2 + \text{H}_2$.

Produção de H_2S :- Tiosulfato de sódio é a fonte de S. - Metabolização de fontes de S que combinam-se com íons Ferro-sulfeto de Ferro produzindo um precipitado preto insolúvel.

V/V: base alcalina (vermelha) e ápice alcalino (vermelho) - Não ocorre utilização dos carboidratos, mas sim dos compostos nitrogenados.

V/A: ápice alcalino: vermelho (metabolização aeróbica da glicose e compostos nitrogenados).

Base ácida: amarela (metabolização anaeróbica da glicose com produção de ácidos).

De acordo com os resultados obtidos nos testes morfológicos e bioquímicos, a linhagem VN-3 pode ser caracterizada como sendo *Bacillus* sp, a linhagem VN-11 *Trichococcus* sp. e a linhagem VN-31, *Enterobacter* sp de acordo com o manual Berger's.

O gênero *Bacillus* apresenta a característica de produzir esporos. Abrigam um grande número de espécies com características bastante diferentes. Podem ser encontrados em solo, água, material fecal e diversos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2001). Vários são os trabalhos que demonstram que estes microrganismos podem atuar na degradação de corantes. *Bacillus subtilis* foi relatado por (ZIZI; LYBERATUS, 1996) sendo capaz de degradar o corante P-Aminoazobenzeno (PABA), na presença de glicose e nitrato, sob condições anóxicas, produzindo anilina como metabólito de degradação. *Trichococcus* sp, foi descrito inicialmente por produzir cadeias de cocos, sendo responsável pela formação de bulking filamentoso em estações de tratamento de lodos ativados. O bulking é responsável por produzir um lodo volumoso. Algumas espécies de *Trichococcus* sp podem apresentar formas não filamentosas em certos meios. Moutaouakkil et al, 2003 isolou uma espécie de *Enterobacter agglomerans* de um lodo contaminado com corante, produtora de azoredutase, a qual foi capaz de descolorir o azocorante tóxico Vermelho de Metila sob condições aeróbias.

6. CONCLUSÕES

- Dos 62 microrganismos isolados do efluente da indústria têxtil foram pré selecionadas 17 linhagens bacterianas que apresentaram a capacidade de crescer em meio de sais minerais e os azocorantes RR 198 e RB 220 como única fonte de carbono;
- Das 17 linhagens pré-selecionadas, três bactérias denominadas VN-12, 29 e 39 apresentaram maior capacidade em descolorir os corantes sob condições aeróbias. Ao contrário do esperado a descoloração ocorreu através do mecanismo de adsorção celular em pH ácido;
- Das 17 linhagens pré-selecionadas, cinco bactérias denominadas VN-3, 11, 31, 39 e 46 apresentaram grande capacidade em degradar os azocorantes estudados sob condições microaeróbias, variando a degradação conforme a linhagem;
- Todas as linhagens bacterianas selecionadas em condições aeróbias e microaeróbias necessitaram de uma fonte extra de carbono para promoverem a descoloração por adsorção e a degradação dos meios de cultivo contendo azocorantes. Neste caso o substrato utilizado foi 0,5 % de glicose. A linhagem VN-11 degradou o corante RR 198 com somente 0,1 % de glicose;
- As linhagens apresentaram ótima capacidade de redução na DQO sob condições aeróbias quando comparadas a condições microaeróbias, isto pode ter ocorrido devido ao fato das linhagens em condições aeróbias utilizarem primeiro a glicose e extrato de levedura presentes no meio e não os corantes, já que as bactérias não apresentaram degradação dos corantes nesta condição;

- Quando comparadas às condições de agitação e microaerobiose verificou-se que a DQO apresentou altas porcentagens de redução em condições aeróbias, porém não houve degradação dos corantes. Sob condição de microaerobiose as linhagens foram capazes de degradar os corantes, porém valores baixos de redução na DQO foram obtidos. Na condição em que realizou-se agitação após crescimento em microaerobiose (7 dias em microaerobiose seguidos de 7 dias de agitação) observou-se degradação dos corantes e redução na DQO para todas as linhagens, mostrando ser esta condição a mais favorável para degradação do meio de cultivo contendo azocorantes;

- Os microrganismos mais eficientes na degradação dos azocorantes RB 220 e RR 198 foram identificados como *Bacillus* sp (VN-3), *Trichococcus* sp (VN-11) e *Enterobacter* sp (VN-31);

- Concluiu-se que as linhagens isoladas têm um grande potencial para degradar os azocorantes deste estudo em condições microaeróbias, reduzindo também a DQO em condições aeróbias, podendo ser aplicadas futuramente em processos de biorremediação de efluentes têxteis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADULLA, E.; ROBRA, K. H; GUBITZ, G. M; SILVA, L. M; CAVACO-PAULO, A. **Text. Res. J.** v. 70, p. 409, 2000.
- ABNT-Associação Brasileira de Normas Técnicas. Águas: determinação da demanda química de oxigênio- método de refluxo aberto - método de refluxo fechado - titulométrico e refluxo fechado – Colorimétrico. NBR 10357, 1988.
- ALINKER. R. Organic Colorants-interpretation of mammalian, geno and ecotoxicity data in terms of potencial risks in: **Toxic Hazard Assessment of Chemicals**. Ed Richardson M. L., The Royal Society of Chemistry-London, p.166-187, 1986.
- ASPLAND, J. R. Textile dyeing and coloration. **Research Triangle Park**, NC: American Association of Textile Chemists and Colorists,1997.
- ASTM-American society for testing and materials-standard practice for determing resistence of synthetic polymeric materials to fungi. G. 21-90, 1990.
- BAUGHMAN, G. L; WEBER, E. J. Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. **Environ. Sci. Technol.** v. 28 p. 267-276, 1994.
- BELOTE. G. J. Utilização de Basidiomicetos lignilolíticos na degradação de corantes industriais e no tratamento do efluente de uma indústria de alimentos. 74 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos)-UNICAMP, Campinas, 2000.
- BENIGNI. R., PASSARINI, L. Carcinogenicity of the aromatic amines: from structure-activity relationships to mechanisms of action and risk assessment. **Mutation Research.** v. 511, p. 191-206, 2002.
- BLUM, H. **Preparação aquosa de ácido fólico estabilizado**. US. n. 9 931 442,6 dec.1988, 5 jun.1990. Uspto patent full-text and image database in: <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph> , Acesso em: 12/09/2002.
- BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. **Manual de Tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: CETESB, 1993.
- BRAS. R.; FERRA, I. A.; PINHEIRO, H. M.; GONÇALVES, I. C. Batch tests for assessing decolourization of azo dyes by methanogenic and mixed culture. **Journal of Environmental Microbiology.** v. 67 (7), p. 3226-3235, 2001.

BRITO, I. R. C. Efluentes de refinaria de petróleo: seleção de bactérias autóctones com potencial de biodegradação e redução de toxicidade aguda. 166p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1996.

BORSOI, Z. Tratamento de esgoto: tecnologias acessíveis. **Informe infra-estrutura**, n.16, 1997.

CARLIELL, C. M.; BARCLAY, S. J.; BUCKLEY, C. A. Treatment of exhausted reactive dye bath effluent using anaerobic digestion: laboratory and full scale trials. **Water S A**. v. 22, p. 225-233, 1996.

CARLIELL, C. M.; BARCLAY, S. J.; NAIDOO, N.; BUCKLEY, C. A.; MULHOLLAND, D. A.; SENIOR, E. Microbial decolorization of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water S A**. n. 21, p. 61-69, 1995.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), Diretoria de Desenvolvimento e Transferência de Tecnologia, Setor de treinamento. **Tratamento de águas residuárias de indústrias têxteis**, Setembro, 2000.

CIÊNCIA HOJE. **O descarte dos corantes têxteis**. v. 29, p. 61-64, 2001.

CHAO, W. L.; LEE, S. L. Decoloration of azo dyes by three white-rot fungi: influence of carbon source. **World J. Microbiol. Biotchnol.** v. 10, p. 556-559, 1994.

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

CHANG, J. S.; LIN, W. C. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. **Biotechnology Progress**. v. 16, p. 979-985, 2000.

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

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

CHUNG, K. T.; CERNIGLIABE, C. E. Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. Mutation Research/Review. In: **Genetic Toxicology**. v. 277, p. 201-220, 1992.

CLARKE, E. A e STEINLE, D. **Journal. Soc. Dyes Colour.** v. 25, p. 5 , 1995.

COLLIER, S. W.; STORM, J. E.; BRONAUGH, R. L. Reduction of azo dyes during in vitro percutaneous absorption. **Toxicology and Applied Pharmacology.** n.118, p. 73-79, 1993.

DELEE, W.; O'NEILL, C .; HAWKES, R, F.; PINHEIRO, M, H. Anaerobic treatment of textile effluents: a Review. **Journal Chem. Technol. Biotechnol.** n.73, p. 323-335, 1998.

DILLON, D.; COMBES, R.; BRONAUGH, R. L. Activation by caecal reduction of the azo dyes D&C Red nº9 to a bacterial mutagen. **Mutagenesis.** n. 9, p. 295-299, 1994.

DONLON, B.; RAZO-FLORES, E.; LUIJTEN, M.; LETTINGA, G.; FIELD, J. Detoxification and partial mineralization of the azo dye mordant orange 1 in a continuous up flow anaerobic sludge-blanket reactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** n. 47, p. 83-90,1997.

DYSTAR. Fichas de dados de seguranças segundo as diretivas da UE. Azul Brilhante Remazol BB gran 133. p. 1-5, 2002.

DYSTAR. Fichas de dados de seguranças segundo as diretivas da UE. Remazol Rot RB 133%. p. 1-5, 2002.

ENVIRONMENTAL PROTETION AGENCY (EPA) - Referência Bibliográfica de documentos eletrônicos, [http:// www.epa.gov](http://www.epa.gov). Acesso em 12/08/2004.

FRANCO, M. G. D. B.; LANDGRAF. M. **Microbiologia de Alimentos.** 1ª Ed. Atheneu, 2001.

GINGELL, R.; WALKER, R. Mechanism of azo reduction by *Streptococcus faecalis*. II. The role of soluble flavins. **Xenobiotica.** n. 1(3), p. 231-239, 1971.

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

GLASAUIER. S.; LANGLEY. S.; BEVERIDGE, J. T. Sorption of Fe to the surface of *Shewanella putrefaciens*: Cell-Bound Fine-Grained minerals are not always formed. **Applied and Environmental Microbiology.** p. 5544-5550, 2001.

GLAUS, M. A.; HEIJMAN, R. P.; SCHWARZENBACH AND J. ZEYER. Reduction of nitroaromatic compounds mediated by *Streptomyces* sp. exudates. **Appl. Environ. Microbiol.** n. 58, p. 1945–1951, 1992.

HALASZ, A.; LASZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton, **CRC Press**. p. 312, 1991.

INFORME INFRA-ESTRUTURA – Área de Projeto de Infra e Estrutura. **Tratamento de Esgoto: Tecnologias Acessíveis**, n.16, 1997.

JOHN, G. H.; NOEL, R. K.; PETER, H. A.; JAMES, T. S.; STANLEY, T. W. **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. Williams & Wilkins (ed), Baltimore, Maryland., 9ª ed, 1994.

KNAPP, J. S.; NEWBY, P.; The microbiological decolorization of an industrial effluent containing a diazo-linked chromopher. **Water Res.** n. 29, p. 1807-1809, 1995.

KIMBALL, D. A. Citrus oils, aromas, an essences. In: **Citrus Processing Quality Control and Technology**. New York: CHAPMAN & HALL, cap. 6, p. 73-101, 1991.

KIRBY, N . Bioremediation of têxtil industry wastewater by white rot fungi. DPhil Thesis, University of Ulster, Coleraine, UK, 1999.

KUNZ, A.; ZAMORA, P. Novas tendências no tratamento de efluente têxteis. **Química Nova**. v. 25, n.1 , p. 78-82, 2002.

KURBUS.T.; SLOKAR, M. T.; LE MARECHAL, M. A.The study of the effects of the variables on H₂O₂/UV decoloration of vinylsulphone dye: part II. **Dyes and Pigments**. n. 54, p. 67-78, 2002.

LEGISLAÇÃO ESTADUAL. São Paulo, artigo 21. **Resolução Conama**, nr. 20 de 18/06/86.

LEMMER, H.; LIND, G.; METZNER, G.; NITSCHKE, L.; SCHADE, M. Vitamin addition in biological wastewater treatment. **Wat. Sci. Tech.** n. 4-5, p. 395-398, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. Sarvier Editora de Livros Médicos, 2º edição, 1995.

LEWIS, D. M. Coloration in the next century. **Rev.Prog.Color**. v. 29, p. 23-8,1999.

LUANGDILOK. W.; PANSWAD. T. Effect of chemical structures of reactive dyes on color removal an anaerobic-aerobic process. **Water Sci. Technol.** v. 42 (3-4), p. 377-382, 2000.

MACHUCA, A.; AOYAMA, H.; DURAN, N.; **Bichem. Biophys. Res. Com.** v. 20, p. 256, 1999.

MAC FADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification fo medical bacteria**. Baltimore: Williams & Williams 2.ed, 1980.

MARMION, D.M. **Handbook of U.S: Colorants Foods, Drugs and Cosmetics, and Medical Devices**. New York, Jonh Wiley & Sons, 3. ed, 1991.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO DA INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC) - Referência Bibliográfica de documentos eletrônicos, <http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/inicial.com/> , Acesso em: 07/05/2004.

MORETTI. E. P. Curvas de Crescimento. Disponível em: http://members.aol.com/microrganismos/curvas_de_crescimento.htm. Acesso em: 13/08/02.

MOUTAOUAKKIL, A.; ZEROUAL, Y.; DZAYRI, Z. F.; TALBI, M.; LEE, K.; BLAGHEN, M. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. **Archivies of Biochemistry and Biophysics**. n. 413, p.139-146, 2003.

MUSTAFA, I.; SPONZA, T. D. Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. **Process Biochemistry**. n. 38, p. 1183-1192, 2003.

NEOTEX (CONSULTORIA ENERGÉTICA E AMBIENTAL) **Tratamento de águas Residuárias de Indústrias Têxteis**. Apostila do curso apresentado na UFMG, p. 7, 1998.

NIGAM, P.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and dyes reactive. **Process Biochemistry**. v. 31, n. 5, p. 435-442, 1996.

NUTTAPUN.S.; KANCHANA. J.; SOMSAK. D.; MARIE-LINE. D.; PIERRE. S. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a seqüencial anaerobic-aerobic system. **Chemical Engineering Journal**, 2004.

O'NEILL, C.; HAWKES, F. R.; HAWKES ,D. L.; ESTEVES, S AND WILCOX, S. J. Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic tretment system operating on simulated textile effluent. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**v. 53 (2), p. 249-254, 2000b.

OSES. R.; RODRIGUEZ. J.; TASUM. K.; FREER. J.; BAEZA, J. Proc. 7th Intern. Conf. Biotechnol. **Pulp-paper Ind.** p 277, 1998.

ORCO Organic Dyestuffs Corporation – Referência Bibliográfica de documentos eletrônicos, [http:// www.organicdye.com/](http://www.organicdye.com/) . Acesso em: 13/02/2004.

PADMAVATHY, S.; SANDHYA, S.; SWAMINATHAN, Y.; SUBRAHMANYAM, V.; CHAKRABARTI, T.; KAUL, N. S. Aerobic decolorization of reactive azo dyes in presence of various co-substrates. **Chem. Biochemical. Eng. Q.** v. 17 (2), p. 147-151, 2003.

PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dyestuffs: Part II behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. **Chemosphere.** v. 15 (4), p. 479-471, 1986.

PANSWAD, T.; TECHOVANICH, A. Comparison of dye wastewater treatment by normal anoxic + anaerobic/aerobic SBR activated sludge process. **Presentd at 1 st IWA Congress**, Paris, 2000.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFOR, R.C. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Progr.** v. 11, p. 368-379, 1995.

PAVARINA, E.C. Fungos microaeróbios na bioconversão de material lignocelulosico. 161p. Dissertação (Doutor em Ciência de Alimentos)- UNICAMP, Campinas, 2002.

PELLIZARI, V. H. Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorinados-PCBs. 67 p. Dissertação (Doutorado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

PERES, S. P.; ABRAHÃO, J. A. Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis. Uma primeira abordagem. **Tecnologia e Meio Ambiente.** Calquim. p. 31-35, 1995.

PIELESZ, A. The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. **Journal of Molecular Structure.** v. 511-512, p. 337-344, 1999.

PINHEIRO, M, H.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: a review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewater. **Dyes and Pigments.** n. 61, p. 121-139, 2004.

PODGORNIK, H.; GRGIC, I.; PERDIH, A.; Decolorization rate of dyes using lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. **Chemosphere**. n. 38, p. 1353-1359, 1999.

PORTER, J. J. Membrane filtration techniques used for recovery of dyes, chemicals and energy. **Textile Chemist and Colorist**. v. 22, n. 6, p. 22-25, 1990.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Metodologia para determinação de corantes artificiais em alimentos por cromatografia líquida de alta eficiência. 22 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-UNICAMP, Campinas, 1998.

RAFII, F., W. FRANKLIN, AND C. E. CERNIGLIA. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 56, p. 2146–2151, 1990.

RAGHAVACHARYA, C. Colour removal from industrial effluents-a comparative review of available technologies. **Chem. Eng. World**. v. 32, p.53-54, 1997.

RESOLUÇÃO CONAMA. Nº 020, de 18 de junho de 1986.

RIEGER, P. G.; MEIER, H. M.; GERLE, M.; VOGT, U.; GROTH, T.; KNACKMUSS, H. J. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. **Journal of Biotechnology**. v. 94, p. 101-23, 2002.

ROBINSON, T .; MC MULLAN. G.; MARCHAN. R.; NIGAM. P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource Technology**. v. 77, p. 247-255, 2001.

RUSS. R.; RAU. J.; STOLZ. A. The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66 (4), p. 1429-1434, 2000.

SABBIONI.G.; RICHETER. E. Aromatic aminas, nitroarenes, and heterocyclic aromatic amines in :Marquardt, S. G.; Schafer, R.; McClellan, F. Welsch (Eds.) **Toxicology, Academic Press**, San Diego. p. 729-741,1990

SALEM, V. Corantes na indústria têxtil. Uma abordagem ecológica. **Química Têxtil**. v. 28, p. 8, 1995.

SANI, R, K.; BANERJEE, U, C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kuthia* sp. **Enzyme Microbiol. Technol.** n. 24, p. 433-437, 1999.

SLOKAR, W. M.; LE MARECHAL. A. M. Methods of decoloration of textile wastewater. **Dyes and Pigments**. v. 37, p. 335-356,1997.

SHEN, J.; ZHAO, Y. Treatment of wastewater from dye plants by biological actived carbon process. **Huajing Wuran Yu Fangzhi**. v.13, n.5, p. 2-6, 1991.

SOUTHERN, T.G. Technical Solutions to the colour problem: a critical review. In: Cooper. P, editor. **Colour in dyehouse effluent**. Bradford: Society of Dyers and Colourists. p. 75, 1995.

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

STRICKLAND, A. F.; PERKINS, W. S. Decoloration of contínuos dyeing wastewater by ozonation. **Textile Chemist and Colorist**. v.27 (5) , p. 11-15,1995.

SWAMY, J.; RAMSAY, J. A. The evaluation of white rot fungi in the decolorization of textile dyes. **Enzyme Microb. Technol**, n. 24, p.130-137, 1999.

TAYLOR, J. A. Recent developments in reactive dyes. **Rev. Prog. Color**. v. 30, p. 93 - 107, 2000.

TEXTILIA NET, 2004 - Referência Bibliográfica de documentos eletrônicos, <http://www.textilianet.com/> Acesso em: 10/05/2004.

TUNUSSI, L. J.; SOBRINHO, A. P. Remoção da cor e nitrificação de efluentes de tinturaria têxtil através de processos biológicos anaeróbio-aeróbio. **Água Latinoamérica**. XXVIII Congresso da Associação Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental (AIDIS), novembro/dezembro. p. 1-7, 2003.

UNEP (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME),The textile industry and environment, **Technical Report**. n,16, p. 120, 1994.

VONCINA, B. D; LE MARECHAL, M. A. Reactive dye decolorization using combined ultrasound/H₂O₂. **Dyes and Pigments**. v. 59, p.173-179, 2003.

XU, Y.; LEBRUM, R. E. Treatment of textile dye plant effluent by nanofiltration membrane. **Separ.Sci.Technol**. v. 34, p. 2501-2519, 1999.

YU, J; CHEN, H; JIM AND YUE P. L. Distribution and chang of microbial activity in combined UASB and AFB reactors for wastewater treatment. **Bioproc. Eng**. v. 22, p. 315-322, 2000.

YOUNG, H. L.; SPYROS, G. Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions. **Water Research**, v. 38, p. 1838 -1852, 2004.

ZAOYAN. W.; KE. S.; GUAEGLIANG. S.; FAN, J. D.; HUANIAN. M. Anaerobic-Aerobic treatment of a dye wastewater by combination of RBC with activated sludge. **Water. Sci. Technol.** v. 26 (9-11), p. 2093-2096, 1992.

ZGHAL, Z. X.; LEVIN, R. E.; PINKHAN.; SHETTY, K. Determination of sunset yellow FCF and Ponceau 4R in sweets by high performance liquid chromatography. **Science des Aliments**. v .15, p. 491-496, 1995.

ZIZI, U.; LYBERATUS. G. Azo dye biodegradation under anoxic conditions. **Water Science and Technology**. v. 34 (5-6), p. 495-500, 1996.

ZOLLINGER, H. Syntheses , properties and applications of organic dyes and pigments. **Color Chemistry**, VCH Publishers, Inc., 2 Ed., New York ,1991.

APÊNDICE

Tabela 1. Distribuição dos microrganismos isolados nos diferentes pontos de amostragem, evidenciando T°C, pH, data e local da coleta.

microrganismos	Data da coleta	T°C de coleta	pH de coleta	morfologia	Coloração de Gram	Local de coleta
VN-1	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-2	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-3	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-4	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-5	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-6	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-7	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-8	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-9	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-10	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-11	25/2/2003	40°	7	cocos	G+	Ponto 2
VN-12	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-13	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-14	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-15	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-16	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-17	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-18	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-19	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-20	25/2/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-21	25/2/2003	40°	7	levedura		Ponto 1
VN-22	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 1
VN-23	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 4

VN-24	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-25	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-26	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-27	2/4/2003	30°	7	cocos	G+	Ponto 4
VN-28	2/4/2003	30°	7	bastonete	G-	Ponto 4
VN-29	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-30	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-31	2/4/2003	30°	7	bastonete	G -	Ponto 4
VN-32	18/2/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-33	11/3/2003	30°	9	bastonete	G+	Ponto 4
VN-34	11/3/2003	30°	9	bastonete	G+	Ponto 4
VN-35	11/3/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-36	11/3/2003	30°	7	cocos	G+	Ponto 2
VN-37	11/3/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-38	2/4/2003	30°	7	cocos	G+	Ponto 3
VN-39	2/4/2003	30°	7	cocos	G+	Ponto 3
VN-40	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-41	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-42	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-43	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 4
VN-44	2/4/2003	30°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-45	2/4/2003	60°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-46	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 1
VN-47	2/4/2003	60°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-48	2/4/2003	30°	7	cocos	G-	Ponto 3
VN-49	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-50	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2
VN-51	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 2

VN-52	18/2/2003	40°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-53	2/4/2003	60°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-54	18/2/2003	40°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-55	2/4/2003	60°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-56	18/2/2003	40°	9	bastonete	G+	Ponto 3
VN-57	2/4/2003	40°	7	bastonete	G-	Ponto 3
VN-58	2/4/2003	60°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-59	2/4/2003	60°	9	bastonete	G+	Ponto 1
VN-60	2/4/2003	60°	7	bastonete	G+	Ponto 1
VN-61	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
VN-62	2/4/2003	40°	7	bastonete	G+	Ponto 3
