

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

LUCAS PIRES GUARNIER

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE
PAPEL E CELULOSE COM POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DE AZO CORANTES

Dourados

2017

LUCAS PIRES GUARNIER

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE
PAPEL E CELULOSE COM POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DE AZO CORANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de
Biotecnologia, da UNIVERSIDADE FEDERAL DA
GRANDE DOURADOS, como requisito parcial para a
Obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Profa. Dra. MARICY RAQUEL LINDENBAH BONFÁ

Dourados

2017

LUCAS PIRES GUARNIER

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS EM EFLUENTES DE INDÚSTRIAS DE
PAPEL E CELULOSE COM POTENCIAL DE DESCOLORAÇÃO DE AZO CORANTES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso
de Biotecnologia, da UNIVERSIDADE FEDERAL DA
GRANDE DOURADOS, como requisito parcial para a
Obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em _____ de março de 2017

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá – Universidade Federal da Grande
Dourados

Profa. Dra. Danielle Marques Vilela – Universidade Federal da Grande Dourados

Me. Fabiana Gomes da Silva Dantas – Universidade Federal da Grande Dourados

Dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e a minha namorada, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse e concluísse mais essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

No caminho rumo ao sucesso, aquele que caminha sozinho, nunca chega ao seu destino. No decorrer da minha caminhada, anjos, soldados, pessoas estiveram ao meu lado, me incentivando, me dando forças, sempre me apoiando rumo a minha vitória.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por sempre iluminar o meu caminho, pelas portas e janelas que foram abertas durante toda a minha caminhada, não só acadêmica, mas por toda a minha vida.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu chegasse aonde cheguei, que sempre estiveram do meu lado, não só neste momento, mas por toda minha vida, sempre me fornecendo compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a minha mãe, por todo o apoio, pelo conforto, pelo colo nas horas mais difíceis, por ser aquela a responsável pelo meu caráter, pela minha educação, pelo meu sucesso e por cada vitória que já obtive.

A meu pai, que sempre acreditou em mim, e me ensinou a ser um ser humano íntegro, honesto, humilde e esforçado, me ensinou a correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir, a olhar sempre para frente sempre sendo meu exemplo de vida.

Agradeço a meu irmão, pelo apoio constante e pela parceria.

Agradeço a minha namorada Aniely Oliveira, pela paciência, pela compreensão, por estar comigo durante todo o processo, sempre me apoiando, me incentivando, sendo meu maior apoio nas horas mais difíceis, e por compartilhar dos melhores momentos.

Agradeço a minha orientadora Maricy Bonfá, que foi essencial nestes anos de graduação, para meu amadurecimento, pelo incentivo durante toda a orientação, que com muita paciência corrigiu inúmeros relatórios e projetos, e por ser uma excelente professora e profissional.

Aos meus amigos ou irmãos pela amizade, paciência, companheirismo e zueiras pesadas durante esses quase 4 anos, em especial Rafael Correia, Thalles Kraus, Ramir Bavaresco e Anderson Souza, jamais chegaria tão longe psicologicamente sem esses humanos.

Agradeço em especial aos meus amigos Maria Fernanda Campanari, Caio Achilles e

Amanda Roberta, por terem sido importantes e essenciais para o desenvolvimento desse trabalho, me ajudando sempre que precisei.

Aos amigos que sempre me confortaram nas horas mais difíceis, com palavras de conforto e afeto, e em todos momentos torceram pelo meu sucesso, em especial Tamaeh Monteiro, Otavio Marques, Alex Oliveira e Bianca Boni.

Também a minha sogra, minha cunhada e meus amigos Maria Lorenza, Jaqueline Marques por terem comparecido a minha defesa.

Aos meus amigos de Presidente Prudente, que sempre torceram por mim, me incentivaram e me apoiaram, em todos os momentos, em especial Vinicius, Mariana, Erick e Amanda.

Agradeço a banca presente na defesa, por terem aceito o convite, e contribuírem de certa forma para minha formação e meu crescimento.

Aos professores Liliam e Rodrigo que com toda a paciência do mundo, tiraram algumas horas de um dia de trabalho para me auxiliar nas análises estatísticas e de bioinformática de bom grado.

A todos os meus professores, que durante esses 3 anos e meio, contribuíram com seu conhecimento, paciência e dedicação para a formação de novos profissionais.

Enfim agradeço de toda forma a todos aqueles que de certa forma contribuíram para que eu chegasse onde cheguei, para que eu obtivesse minhas vitórias e minhas conquistas, aos meus demais familiares e amigos.

“Quando tudo parecer dar errado em sua vida, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele”

(Henry Ford)

“Faça. Ou não faça. Tentativa não há! ”

(Mestre Yoda)

RESUMO

Com o apogeu da industrialização, efluentes produzidos por grandes indústrias, contendo resíduos tóxicos em sua composição, são comumente despejados em locais irregulares, causando contaminação. Muitos compostos presentes nesses efluentes, são tóxicos e carcinogênicos. Um bom exemplo são os corantes sintéticos, como os azo corantes, mais abundante corante sintético produzido, com utilização em grande escala nas indústrias têxteis, farmacêutica, alimentícia e papel e celulose. O efluente da indústria de papel e celulose apresenta corantes sintéticos residuais, além de muitos compostos lignolíticos, que apresentam estrutura molecular semelhante à dos corantes sintéticos, dessa forma o presente estudo teve como objetivo a bioprospecção de bactérias de efluente de indústria de papel e celulose (Eldorado, localizada em Três Lagoas-MS), que apresentassem potencial de descolorir e reduzir os azo corantes verde janus B (VJ-B) e alaranjado de metila (AM), de uso laboratorial, dado a semelhança estrutural entre eles. Para isso utilizando meio seletivo ATZ-R contendo o corante como única fonte de carbono, bactérias foram isoladas e purificadas, a partir do efluente industrial. Um total de 8 bactérias foram isoladas para estudo (4 em cada um dos 2 corantes), todas classificadas como bastonetes Gram-negativas, oxidase positiva. Os isolados foram submetidos a um ensaio de descoloração em condições de microaerofilia pelo tempo de 144 horas, para avaliar a capacidade de descolorir os corantes. Para o corante alaranjado de metila foi utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio para averiguar a influência que esta causa do processo de descoloração. As amostras tiveram a OD medida (624 ou 625 m VJ e 460 nm AM) a cada 24 horas (de 0 a 144 h). No tempo inicial e final do ensaio, foi realizado o teste de demanda química de oxigênio (DQO), a fim de verificar o consumo de oxigênio pelas bactérias para realização do processo de biodescoloração. As amostras de VJ-B tiveram a redução comprovada pela mudança na coloração, transformando-se de azul para um roxo púrpura, os isolados J2 e J3 demonstraram uma melhor redução em menos tempo, com 91,21% e 91,79% respectivamente, no entanto, a redução da DQO não superou 15%. Para o corante AM, os isolados apresentaram bom desempenho, com remoção visível da cor alaranjada, o extrato de levedura se mostrou realmente eficaz para aumentar a capacidade das bactérias de descolorir o corante, reduzindo o tempo de descoloração, os isolados L1 e L2, demonstraram ótima capacidade, no conjunto de descoloração e redução da DQO. No entanto, quanto às condições, quando utilizou-se extrato de levedura a descoloração aumentou em até 20%, enquanto que para a redução da DQO não houve diferença estatística, reforçando a teoria de

que descoloração e redução de DQO são eventos independentes. Os 2 isolados que apresentaram os melhores resultados para cada corante tiveram o gene RNAr 16S sequenciado e identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, bem descrito na literatura quanto a capacidade de descoloração, porém ainda sem descrição quanto a descoloração do corante VJ-B. Dessa forma, os resultados do presente trabalho foram bastante promissores, já que as bactérias isoladas apresentaram a capacidade de reduzir os corantes estudados em condições de microaerofilia.

Palavras-chave: biodescoloração, corantes sintéticos, *Pseudomonas*

ABSTRACT

At the height of industrialization, effluents produced by large industries, containing toxic waste in their composition, are commonly dumped in irregular locations, causing contamination. Many compounds present in these effluents are toxic and carcinogenic. A good example are synthetic dyes, such as azo dyes, most abundant synthetic dye produced, used in large scale in the textile, pharmaceutical, food and pulp and paper industries. The effluent from the pulp and paper industry presents residual synthetic dyes, in addition to many lignolytic compounds, which have a molecular structure similar to that of synthetic dyes, so the present study had the objective of bioprospecting effluent bacteria from the pulp and paper industry (Eldorado, located in Três Lagoas-MS), which had the potential to discolor and reduce the azo dyes janus B (VJ-B) and methyl orange (AM), for laboratory use, given the structural similarity between them. For this purpose using the ATZ-R selective medium containing the dye as the only source of carbon, bacteria were isolated and purified from the industrial effluent. A total of 8 bacteria were isolated for study (4 in each of the 2 dyes), all classified as gram-negative rods, oxidase positive. The isolates were subjected to a discoloration test under microaerophilic conditions for 144 hours to evaluate the ability to the dyes discoloration. For the orange methyl dye, yeast extract was used as a source of nitrogen to ascertain the influence that this causes of the discoloration process. Samples had measured OD (624 or 625 m VJ and 460 nm AM) every 24 hours (0 to 144 h). At the initial and final time of the test, the chemical oxygen demand test (COD) was performed to verify the oxygen consumption by the bacteria to perform the biodiscoloration process. Samples of VJ-B had the reduction shown by the change in coloration, turning from blue to purple purple, isolates J2 and J3 demonstrated a better reduction in less time, with 91.21% and 91.79%, respectively. However, the COD reduction did not exceed 15%. For the AM dye, the isolates presented good performance, with visible removal of the orange color, the yeast extract showed to be effective to increase the bacteria's ability to discolor the dye, reducing the time of discoloration, the isolates L1 and L2, demonstrated good capacity, in the discoloration and reduction of COD. However, when using yeast extract, discoloration increased by up to 20%, whereas for COD reduction there was no statistical difference, reinforcing the theory that discoloration and reduction of COD are independent events. The two isolates that presented the best results for each dye had the RNAr 16S gene sequenced and identified as belonging to the genus *Pseudomonas*, well described in the literature on the ability of discoloration, but not yet described as discoloration of VJ-B dye. Thus, the results of the

present work were very promising, since the isolated bacteria showed the ability to reduce the dyes studied under microaerophilic conditions.

Keywords: biodiscoloration, synthetic dyes, *Pseudomonas*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Efluente de indústria têxtil, com resíduos de corantes descartado em corpo aquático25
- Figura 2.** Degradação completa de um azo corante em condições anaeróbias e aeróbias.....37
- Figura 3.** Estrutura molecular do azo corante verde janus B (A) e alaranjado de metila (B)..42
- Figura 4.** Ensaio de descoloração do corante VJ-B, em T1, 48 horas após o início do experimento, pelos isolados J2, ilustrando a redução do azo corante VJ-B para Leuco VJ-B I pelo isolado J2, indicado pela cor violeta.54
- Figura 5.** Ensaio de descoloração do azo corante verde janus B, em T1, 48 horas após o início do experimento, ilustrando a redução do azo corantes VJ-B para Leuco VJ-B I pelo isolados J454
- Figura 6. (A)** Ensaio de descoloração do azo corante verde janus B, ilustrando a redução do corante VJ-B para Leuco VJ-B I em uma das repetições do isolado J1, no tempo de 48 horas (T1).(B), ilustrando a Redução do corante VJ-B para Leuco VJ-B I em todas as repetições do grupo J1, Ensaio de descoloração do azo corante verde janus B no tempo final de 144 horas (T5).55
- Figura 7.** Porcentagem de descoloração do corante VJ-B no período de 144 horas, pelos isolados identificados como J1 (●) sendo esta a que apresentou o menor desempenho descolorindo 78,71% do corante. J2 (■) com descoloração de 91,21%. O isolado J3* (▲) descol descoloriu 91,79% e o isolado J4 (▼) descoloriu 86,75%.....57
- Figura 8.** Comparação das porcentagens de descoloração corante alaranjado de metila entre os isolados, em dois tratamentos diferentes, com e sem extrato de levedura. No tratamento sem extrato de levedura, L1 (●), L2 (■), L3 (▲) e L4 (▼), descoloriram respectivamente 45.93%, 50.83%, 47.03% e 42.39%. Já os mesmos isolados LE1 (◆), LE2 (●), LE3 (■) e LE4 (▲) na presença de extrato de levedura, descoloriram 64.05%, 88.97%, 87.72% e 68.03% respectivamente. Em afirmação os controles abióticos CL (▼) e CE (◆) não apresentaram descoloração.60
- Figura 9.** Descoloração do corante AM, pelo isolado L2 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.62

Figura 10. Descoloração do corante AM, pelo isolado L3 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.	62
Figura 11. Descoloração do corante AM, pelo isolado L1 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.	63
Figura 12. Descoloração do corante AM, pelo isolado L4 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.	63
Figura 13. Redução de DQO, realizado pelos isolados no tempo final de 144 horas do ensaio de descoloração, em (a) apresentado uma comparação entre a concentração inicial (■) e final (▨) de O ₂ nas amostras. Em (b) dado em porcentagem de redução, sendo o isolado J1 que apresentou a menor porcentagem de redução com 6,99%, seguidos do isolados J3, J2 e J4 com respectivos 9,38%, 15,53% e 18,61%. Letras minúsculas iguais não se diferem estatisticamente quanto ao tratamento (isolado)	65
Figura 14. Redução de DQO, realizada pelos isolados no tempo final de 144 horas do ensaio de descoloração do corante AM, em (a) e (b) apresentado uma comparação entre a concentração de O ₂ inicial (■) e final (▨), sendo o primeiro representando o tratamento sem extrato de levedura. Em (c) e (d) os dados são apresentados em porcentagem de redução, sendo o primeiro para o tratamento sem o extrato, onde L2 apresentou redução de 45.14% da DQO, seguidos dos isolados L1, L4 e L3, com redução de 43,74%, 29,96% e 27,63% respectivamente. No segundo, contendo extrato de levedura, o isolado L1 apresentou melhor desempenho, reduzindo 44,21%, seguido pelos isolados L2, L3 e L4, que reduziram respectivamente 40,78%, 31,01% e 27,97%. Letras maiúsculas iguais não se diferem estatisticamente quando as condições; letras minúsculas iguais não se diferem quanto ao tratamento (isolado).	67
Figura 15. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A árvore ideal com a soma do comprimento da ramificação = 0.08224968 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais as taxas associadas se agruparam no teste de bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parametros (KIMURA,1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11	

sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 631 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016). 70

Figura 16. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A árvore ideal com a soma do comprimento da ramificação = 0.04347957 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais as taxas associadas se agruparam no teste de bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parâmetros (KIMURA,1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 658 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016). 71

Figura 17. A história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança baseado no modelo Kimura 2 parâmetros (KIMURA,1980). A árvore com maior probabilidade de log (-3095.2193) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais as taxas associadas se agrupam é mostrada ao lado dos ramos. A (s) árvore (s) inicial (is) para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pairwise estimadas usando a abordagem de Máxima Veracidade Composta (MCL) e selecionando a topologia com valor de verossimilhança superior. Utilizou-se uma distribuição Gamma discreta para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre sítios (5 categorias (+ G, parâmetro = 0,0500)). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramo medidos no número de substituições por local. A análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos. Houve um total de 1531 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016). 72

Figura 18. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A árvore ideal com a soma do comprimento da ramificação = 0.09346798 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais as taxas associadas se agruparam no teste de bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parâmetros (KIMURA,1980) e estão nas

unidades do número de substituições de bases por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 1450 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016).73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VJ-B	Verde janus B
AM	Alaranjado de metila
DQO	Demanda Química de Oxigênio
OD	Densidade Óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
Rpm	Rotações por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de corantes pela fixação ao substrato	27
Tabela 2. Classificação de corantes pelo grupo cromóforo	28
Tabela 3. Parâmetros seguidos para realização da curva de calibragem para concentração em mg. L ⁻¹	49
Tabela 4. Identificação morfo-tintorial dos isolados, para os dois corantes.....	52
Tabela 5. Descoloração do corante Alaranjado de metila sem extrato de levedura, medida em absorvância ao longo do tempo de 144 horas	57
Tabela 6. Descoloração do corante Alaranjado de metila sem extrato de levedura, medida em absorvância ao longo do tempo de 144 horas.....	59
Tabela 7. Descoloração do corante Alaranjado de metila com extrato de levedura, medida em absorvância ao longo do tempo de 144 horas.....	59
Tabela 8. % de descoloração, no tempo final de 144 horas do corante AM	61
Tabela 9. Relação entre a redução de DQO e descoloração do corante VJ-B.....	66
Tabela 10. Relação entre redução de DQO e descoloração do corante AM, sob dois tratamentos	68
Tabela 11. Resultados do melhor retorno, obtidos através do alinhamento local pelo Blastn do NCBI, para os isolados que tiveram o gene 16S rRNA sequenciado.....	69
Tabela 12. Resultados dos melhores retornos, obtidos através do alinhamento local realizado pelo banco de dados RDP-database, para os isolados que tiveram o gene 16S rRNA sequenciado	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. HIPÓTESE	23
3. OBJETIVOS GERAIS	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. REVISÃO DE LITERATURA	24
5.1 CORANTES SINTÉTICOS	24
5.1.1 Azo corantes	29
5.2 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES.....	30
5.2.1 Processos Biológicos	31
5.3 BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES	32
5.3.1 Biodegradação por leveduras	33
5.3.2 Biodegradação por fungos filamentosos.....	33
5.3.3 Biodegradação por algas.....	35
5.3.4 Biodegradação por bactérias.....	36
5.4 TOXICIDADE DOS CORANTES.....	39
5.5 EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE.....	41
6. METODOLOGIA	42
6.1 CORANTES AVALIADOS	42
6.2 MEIO DE CULTIVO	43
6.3 COLETA DE AMOSTRAS DE EFLUENTE PARA BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS	43
6.4 BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS.....	43
6.5 PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS.....	44
6.6 TESTES MORFO-TINTORIAIS	44
6.6.1 Teste de Gram.....	44

6.6.2	Teste de KOH.....	45
6.6.3	Teste de Catalase.....	45
6.6.4	Teste de Oxidase.....	45
6.7	PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS EM COLEÇÃO.....	46
6.7.1	Tubo inclinado.....	46
6.8	ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES.....	46
6.8.1	Cálculo de porcentagem de descoloração.....	47
6.9	ANÁLISE DE DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO.....	47
6.9.1	Soluções.....	48
6.9.2	Ensaio de demanda química de oxigênio.....	48
6.9.3	Curva de calibração (mg. L ⁻¹ /absorbância).....	49
6.9.4	Cálculo da porcentagem de redução.....	49
6.10	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENE RNAm 16S.....	50
6.10.1	Análises de bioinformática.....	50
6.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
7.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
7.1	IDENTIFICAÇÃO MORFO-TINTORIAL.....	52
7.2	DESCOLORAÇÃO.....	53
7.2.1	Verde de Janus.....	53
7.2.2	Alaranjado de Metila.....	58
7.2	DQO.....	64
7.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MELHORES ISOLADOS PARA AMBOS OS CORANTES.....	68
8.	CONCLUSÃO.....	75
9.	Referências.....	76

1. INTRODUÇÃO

A industrialização é de vital importância para a economia mundial pois serve como importante veículo de desenvolvimento econômico. No entanto, há diversos problemas ambientais associados à produção industrial, como a quantidade de poluentes resultantes de resíduos da produção presentes nos efluentes dessas indústrias, que muitas vezes são despejados de forma irregular na natureza, sobre tudo em corpos hídricos. Dentre os compostos poluentes presentes nesses efluentes, dá-se destaque para os corantes sintéticos, que podem ser prejudiciais ao ambiente abiótico e biótico (SARATALE et al. 2009).

Os corantes sintéticos, são utilizados em uma grande variedade de indústrias, com destaque para as indústrias têxtil, alimentícia e de papel e celulose (COUTO, 2009; CHEQUER, 2011). Em sua grande maioria, são prejudiciais para o meio ambiente e para os seres humanos; muitos possuem características carcinogênicas e mutagênicas, quando em exposição a longo prazo; no ambiente aquático, a cor dos corantes impede a passagem de luz do sol, impedindo que algas e microalgas realizem a fotossíntese, diminuindo significativamente a quantidade de oxigênio presente na água, dessa forma prejudicando a fauna e flora aquática local (PANDEY et al., 2007).

Os corantes pertencentes ao grupo azo, são corantes altamente tóxicos e carcinogênicos, e recebem destaque de utilização em indústrias têxteis, além de muito utilizados em outras indústrias e procedimentos laboratoriais (PASZCZYNSKI et al, 1995). São caracterizados pelo grupo cromóforo azo ($-N=N-$) responsáveis pela coloração, e são caracterizados de acordo com o número de ligações azo que possuem, sendo monoazos, diazos ou triazos (AYED, 2011). Dado a sua estrutura molecular, e toxicidade para o ambiente, tem sido alvo de muitos estudos envolvendo a biorremediação de locais contaminados com este composto, utilizando métodos diferentes. Os métodos físico-químicos têm sido bem explorados como meio de remediação, envolvendo processos como a adsorção desses compostos, no entanto esses processos não eliminam o composto do ambiente, apenas o remove temporariamente além de ser uma metodologia que na maioria das vezes é de alto custo (PASZCZYNSKI et al, 1995).

Os métodos biológicos, apresentam vantagens em relação aos métodos químicos e físico-químicos, utilizando micro-organismos que apresentem a capacidade de eliminar esses

compostos do ambiente, seja por biodegradação ou até bioissorção, embora este último não seja tão interessante em termo de biorremediação por bactérias e fungos. Apresenta uma metodologia mais barata e que não prejudicará ainda mais o ambiente (MÉNDEZ-PAZ et al., 2005; Ali, 2010).

Algumas bactérias têm a capacidade de produzir enzimas que quebram essas moléculas complexas em moléculas menores, permitindo que elas utilizem esses compostos como fontes de carbono e/ou nitrogênio, dada a essa capacidade, estas têm sido muito utilizadas em estudos envolvendo a biodegradação desses e outros compostos xenobióticos para retirada deles do ambiente. A biodegradação de azo corantes é um processo mais complexo que envolve duas etapas, a redução sob condições anaeróbicas e oxidação sob condições aeróbicas (PANDEY et al, 2007; ALI, 2010). O processo de oxidação em condições aeróbicas é de suma importância para a degradação final das aminas aromáticas formadas pelo processo de redução dos compostos, isso porque essas últimas podem se apresentar ainda mais tóxicas do que a molécula inicial do corante (FRANCISCON, 2010).

Os efluentes de indústrias de papel e celulose apresentam muitos resíduos lignolíticos advindos do tratamento que ocorre na madeira para retirada da celulose (THOMPSON et al., 2001). Os troncos das árvores são ricos em lignina, que apresentam estrutura molecular semelhante à dos corantes sintéticos. Dado a presença desses compostos nesses efluentes, é possível que bactérias encontradas nesse habitat possuam uma capacidade natural de utilizar esses compostos como fonte de energia, podendo dessa forma utilizar outros compostos, cuja molécula seja parecida, também como fonte de carbono e nitrogênio.

Dessa forma o presente trabalho tem como objetivo principal testar a capacidade de bactérias bioprospectadas de efluente de indústria de papel e celulose, de descolorir moléculas de corantes sintéticos utilizados em laboratórios, dada a semelhança estrutural entre elas e moléculas de lignina.

2. HIPÓTESE

Os efluentes de indústrias de papel e celulose são ricos em lignina, que nada mais é do que um composto aromático, resultante do tratamento da madeira, com estrutura molecular muito semelhante à dos corantes sintéticos, dessa forma é possível que se possa bioprospectar micro-organismos que apresentem grande capacidade de biodegradar e descolorir esses corantes sintéticos, dado a semelhança entre as estruturas desses compostos aromáticos, além do fato de ocorrer com frequência o descarte de alguns corantes sintéticos nos efluentes dessas indústrias o que reforçaria a teoria de que micro-organismos com potencial de degradação destes compostos estaria presente neste tipo de efluente.

3. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo geral, a bioprospecção de bactérias de um efluente de indústria de papel e celulose, que apresentem potencial de biodegradação e descoloração dos azo corantes, verde de janus e alaranjado de metila, dado a semelhança na estrutura molecular desses compostos com os compostos presentes no efluente.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Bioprospectar de bactérias com potencial de biodegradar e descolorir os azo corantes, verde de janus e alaranjado de metila;
- Identificar os isolados que apresentarem melhores resultados por sequenciamento do gene RNAr 16S;
- Avaliar a porcentagem de descoloração e redução de DQO em ambos os corantes;
- Comparar a descoloração do alaranjado de metila utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio;
- Comparar a descoloração utilizando um consórcio de bactérias para cada corante.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 CORANTES SINTÉTICOS

Os corantes podem ser definidos como substâncias que na presença de determinado substrato, conferem cor, aderindo à superfície através de processos de adsorção física, retenção mecânica, formação de ligação covalente e etc., as principais características desejáveis em um corante vão desde a estabilidade na presença de luz até a capacidade de alto grau de fixação e resistência a lavagens (KIRK, 1987; BAFANA et al., 2011; PORTELA VASCONCELOS et al., 2013).

Até a metade do século 19, os corantes eram obtidos de fontes naturais, sendo a maioria extratos vegetais ou produto animal. Em decorrência do limitado número de cores, e fontes naturais, os químicos passaram a produzir corantes sintéticos com novas cores, embora o “primeiro” corante sintético tenha sido sintetizado por Woulfe em 1771, através de ácido pícrico pela ação de ácido nítrico em Índigo tingindo em tons amarelos, o primeiro corante sintético industrial só foi sintetizado no ano de 1856 por Willian Henry Perkin (BAFANA et al., 2011; CHEQUER, 2011).

Os corantes sintéticos na sua maioria podem ser utilizados em uma vasta área, tendo como o objetivo principal de corar, podem ser usados em indústrias cuja diretrizes sejam distintas, como a indústria alimentícia, utilizado como corante de alimentos, na indústria têxtil, farmacêutica, dentre outras (COUTO, 2009; CHEQUER, 2011; AYED, 2011; PAN et al., 2011).

O maior problema na utilização desses corantes se encontra no seu descarte inadequado no ambiente através de efluentes de grandes indústrias, com destaque para a indústria têxtil, que é uma das maiores produtoras de efluentes poluídos, principalmente de resíduos de corantes, especificamente, azo corantes (CRIPPS et al. 1990; SARATALE et al. 2009), esta gera em torno de 40 a 65 L de resíduos por Kg de roupas produzidas (MANU; CHAUDHARI, 2002). Uma grande parte dos corantes utilizados em indústrias e laboratórios podem apresentar certa toxicidade, e uma das maiores dificuldades quanto a sua remediação está no fato destes serem recalcitrantes, dessa forma possuindo resistência a atividades biológicas, luz, calor e oxidação (CRIPPS et al., 1990; MANU; CHAUDHARI, 2002; PARSHETTI, 2010; AYED, 2011).

Nem todos os corantes se ligam ao item colorido, durante o processo de manufatura, dependendo da classe do corante, sua perda em efluentes pode variar de 2% para corantes

básicos e até 50% para corantes reativos, levando a contaminação do ambiente (O'NEILL et al, 1999). Pelo fato da coloração proporcionada pelo corante, os efluentes contaminados são facilmente identificados a olho nu, como pode ser observado na Figura 1, até mesmo em concentrações abaixo de 1 mg.L^{-1} , sendo os corantes, os primeiros contaminantes a serem identificados em um efluente contaminado, já que funciona como indicador direto de água poluída, dessa forma o efluente contaminado, quando depositado no ambiente, traz sérias consequências para a fauna e flora local (KILIÇ et al, 2007; PANDEY et al., 2007; ANNUAR et al., 2009).

O depósito de resíduos de corantes em rios por exemplo, traz desequilíbrio a fauna e a flora aquática, isso porque este obstrui a passagem de luz solar, afetando de forma negativa o processo de fotossíntese, dessa forma diminuindo drasticamente a fonte de alimentos de outros seres aquáticos. Os efluentes contaminados, além de prejudicar a absorção de luz pelo corpo aquático, é caracterizado pela grande demanda química de oxigênio ($800 - 1600 \text{ mg.L}^{-1}$), que diminui a disponibilidade de oxigênio presente na água, prejudicando a permanência de vida aquática, além disso possui coloração altamente visível entre 3000 a 4500 unidade ADMI, pH alcalino entre 9-11, e sólidos totais variando de 6000 a 7000 mg.L^{-1} (MANU; CHAUDHARI, 2002; ALI, 2010).



Figura 1. Efluente de indústria têxtil, com resíduos de corantes descartado em corpo aquático

Fonte: Jornal Vitruvis

Disponível em: <http://www.vitruvius.com.br/media/images/magazines/grid_9/d59bb7_01edit.jpg>
Acesso em nov. 2016.

Por possuírem compostos com características tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas em sua estrutura, como benzidinas e outros compostos aromáticos, que pode afetar não só a fauna e flora local, como também seres humanos, uma maior conscientização tem sido gerada, a respeito do despejo desenfreado e sem tratamento, de efluentes contaminados em afluentes de rios. Nas duas últimas décadas, a comunidade científica de todo o mundo, principalmente da China e Índia têm voltado sua atenção para os problemas causados por esse tipo de poluição e, aumentado a busca por meios eficazes, baratos e sustentáveis de remediação (ALI, 2010). A busca de corantes naturais para substituir os atuais corantes tem recebido destaque, já que estes se apresentam inofensivos ao ambiente e a seres humanos (SINGH et al., 2005; FRANCISCON, 2010)

Para a remediação de efluentes contaminados com corantes, diversas vias podem ser utilizadas, dentre elas métodos físico-químicos, como adsorção, oxidação química, precipitação, coagulação, filtração, eletrólise e fotodegradação; e a degradação biológica e microbiológica, que apesar da resistência natural dos corantes a esse tipo de remediação, esse método se apresenta como uma alternativa barata e sustentável de despoluição do ambiente (ALI, 2010). A biodegradação além do baixo custo e da facilidade, apresenta várias vantagens sobre os métodos físico-químico, que podem encontrar diversos obstáculos, como o alto custo e outros fatores como a versatilidade limitada, interferência de outros constituintes do efluente e o manuseio dos resíduos gerados (VAN DER ZEE, 2005).

5.1 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DOS CORANTES;

Os corantes sintéticos baseiam-se principalmente na anilina, possuem como matéria prima compostos que, como o benzeno, derivam da destilação seca ou destrutiva do carbono, ou seja, possuem como fonte original o alcatrão de carvão, daí o nome de alcatrão de carvão ou alcatrão de hulha (FRANCISCON, 2010; BAFANA et al., 2011).

Existe uma grande variedade de tipos de corantes utilizados para a coloração em uma abrangente área industrial, que são classificados tipicamente de duas maneiras, sendo uma delas de acordo com o grupo cromóforo encontrado na molécula do corante, e o método pelo qual o corante é fixado ao substrato pelo grupo funcional, responsável por proporcionar a característica de cor ao composto, este segundo método pode ser observado na Tabela 1 (GARFIELD, 2002; FRANCISCON, 2010; BAFANA et al., 2011; PORTELA VASCONCELOS et al. 2013).

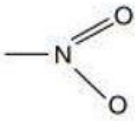
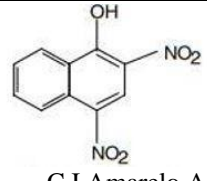
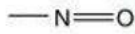
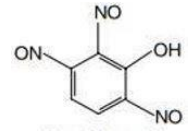
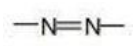
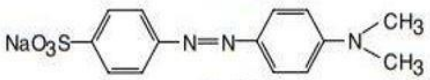
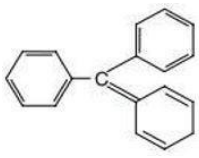
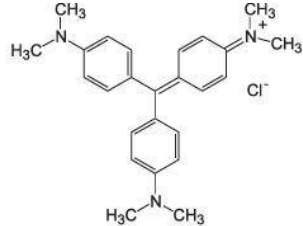
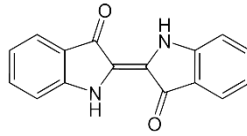
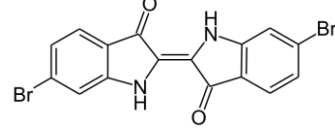
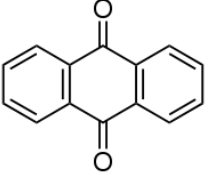
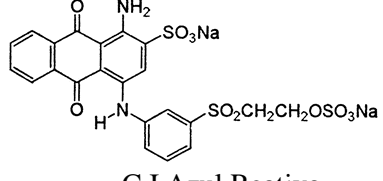
Tabela 1. Classificação de corantes pela fixação ao substrato

CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A UTILIZAÇÃO POR SUBSTRATO	
Classe	Principais campos de aplicação
Branqueadores ópticos	Detergentes, fibras naturais, fibras artificiais, fibras sintéticas, óleos, plásticos, sabões, tintas e papel
Corantes	
À culba sulfurados	Fibras naturais e artificiais
À tina	Fibras naturais
Ácidos	Alimentos, couros, fibras naturais, fibras sintéticas, lã e papel
Ao enxofre	Fibras naturais
Azoicos	Fibras naturais, fibras sintéticas, cosméticos e alimentos
Básicos	Couro, fibras sintéticas, lã, madeira e papel
Diretos	Couro, fibras naturais, fibras artificiais e papel
Dispersos	Fibras artificiais e fibras sintéticas
Mordentes	Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e fibras sintéticas
Reativos	Couro, fibras naturais, artificiais e papel
Solventes	Ceras, cosméticos, gasolina, madeira, plásticos, solventes orgânicos, tintas de escrever e vernizes
Pigmentos Orgânicos	Tintas gráficas, tintas de escrever e vernizes, estamperia têxtil e plásticos
Pigmentos Inorgânicos	Tintas gráficas, estamperia têxtil e plásticos

Fonte: ABIQUIM Associação Brasileira da Indústria Química

O grupo cromóforo é o principal composto responsável pela absorção de energia eletromagnética em uma molécula de corante e varia para cada corante, com um sistema de elétrons delocalizados por uma dupla ligação conjugada, dessa forma proporcionando a cor do corante desde que a molécula absorva a luz dentro da faixa de onda de espectro visível (400–800 nm), corantes classificados de acordo com o grupo cromóforo podem ser observados na tabela 2 (ALI, 2010; FRANCISCON, 2010; BAFANA et al, 2011).

Tabela 2. Classificação de corantes pelo grupo cromóforo

Classe	Cromóforo	Exemplo
Nitro Corantes		 C.I Amarelo Acido 24
Corantes Nitrosos		 Verde Rápido
Azo corantes		 alaranjado de metila
Corantes Trifenilmetano		 Cristal Violeta
Corantes Índigo		 Púrpura Tíria
Corantes Antraquinona		 C.I Azul Reativo

Fonte: Adaptado de Ali, 2010

Em muitos casos os corantes podem apresentar grupos auxocromos, que podem doar ou receber elétrons, deslocando o comprimento de onda de absorção natural do grupo cromóforo,

intensificando a cor e promovendo a solubilidade e fixação do corante ao substrato (GOMES et al., 2009; FRANCISCON, 2010). Esses grupos frequentemente possuem heteroátomos como nitrogênio, oxigênio ou enxofre. Os grupos mais importantes de auxocromos são, NH_2 , NR_2 , NHR , COOH , SO_3H , OH e OCH_3 (DE LAS MARÍAS, 1976).

Pelo fato dos corantes serem compostos muito complexos, e não possuem uma estrutura química estável e fixa, existe uma dificuldade em traduzir estes, para uma fórmula química fixa, muitas vezes são originados de misturas com outros compostos, dessa forma não possuindo uma nomenclatura sistêmica utilizando comumente seu nome comercial (FRANCISCON, 2010). No entanto, dada essa falta de padronização na nomenclatura dos corantes, um corante pode ter mais de um nome comercial, para evitar esta dificuldade utiliza-se o *Colour Index* (CI), que nada mais é do que um compilamento com os nomes dos corantes desenvolvida pela *Society of Dyers and Colourists* em 1924, no qual cada um recebe um número de CI individual, caso o corante tenha sua estrutura química conhecida, a classificação também é feita de acordo com a aplicação de cada corante catalogado, para que empresas possam utilizar do CI, elas necessitam de um registro gratuito na “*Society of Dyers and Colourists*” (BAFANA et al., 2011).

As principais classes de corantes são os Azo, que compreendem a maioria dos corantes existentes, as Antraquinonas, Triazinas, Ftaleína e Trifenilmetano, como o cristal violeta, corante comumente utilizado em procedimentos laboratoriais de microbiologia, como a coloração de Gram (FORGACS, 2004; GOMES et al., 2009; FRANCISCON, 2010).

5.1.1 Azo corantes

Os azo corantes recebem destaque para seu uso em indústrias têxteis, principalmente para corar algodão, e constituem cerca de 60 a 70% do total de corantes produzidos no mundo todo. Conhecidos por sua variação, mais de 3000 diferentes azo corantes foram produzidos nos anos 90, hoje apresentam cerca de 60% de um total de 10.000 corantes comerciais aproximadamente (CHEQUER, 2011; AYED, 2011). São conhecidos pelo seu alto grau de fixação de fibra em comparação a outros corantes sintéticos, apresentando até 85% de fixação (CHEQUER, 2011).

São utilizados, não só na indústria têxtil, como também em processos laboratoriais, muito utilizado como corantes de organelas celulares, são produzidos pela diazotização de

aminas aromáticas e utilizado, com uma estimativa de que 10 a 15% dos resíduos são descartados no ambiente (CHEQUER et al, 2011). Estes apresentam um ou mais grupos azo (-N=N-) em associação com anéis aromáticos e auxocromos (NIU et al.,2012). Podem se distribuir em categorias de acordo com o número de grupos azo presentes na molécula, sendo monoazos, diazos e triazos, que possuem seis aplicações básicas, sendo elas: ácido, base, direta, dispersa, azoica e pigmentos (AYED, 2011).

A maioria desses corantes, não são degradados pelos métodos convencionais de tratamento de efluentes. Estudo conduzidos por Shaul e colaboradores (1991), avaliaram 18 azo corantes, demonstrando que 11 deles passavam inalterados através do sistema de lodo ativado, 4 deles foram adsorvidos pelo lodo e apenas 3 foram biodegradados por atividade microbiana, que em condições anaeróbias, encontradas em sedimentos dos rios e em locais poluídos com alta demanda bioquímica de oxigênio (DBO), os azo corantes são degradados por bactérias que liberam aminas aromáticas, com características mutagênicas e potencialmente carcinogênicas no processo de biodegradação (PASZCZYNSKI et al, 1995).

5.2 DESCOLORAÇÃO DE CORANTES

O depósito de resíduos de corantes sintéticos, em efluentes podem trazer ao ambiente consequências gravíssimas, pois a poluição de corpos aquáticos com estes compostos pode causar além de poluição visual, consequências prejudiciais a vida aquática, principalmente no processo de fotossíntese, dessa forma tem se buscado muito vias para reversão desta situação, como tecnologias viáveis para a biorremediação desses ambientes (ALI, 2010).

A descoloração do composto ocorre quando o grupo cromóforo deste é quebrado, no caso de azo corantes, quando a ligação azo de um ou mais grupos azo são clivadas, dessa forma perdendo parcialmente ou completamente a característica de cor, e é uma etapa prévia à degradação do composto. O processo de descoloração pode ser realizado através de métodos classificados em químicos, físicos e biológicos (DEIVE et al., 2010).

Os processos físicos e químicos, são os mais comumente utilizados para tratamento de efluentes contaminados com resíduos de corantes, no entanto apresentam muitas desvantagens em relação aos processos biológicos, como o alto custo e baixa eficiência, que tornam estes processos inviáveis, a presença de outros compostos no efluente também prejudicam a

eficiência das técnicas (ULSON, 2010; PARSHETTI et al., 2010; BASHA et al., 2011).

Os métodos físicos de descoloração, baseiam-se em procedimentos de separação e transição de fases, como processos de adsorção/coagulação dos corantes, filtração, decantação, floculação, além de separação molecular que envolve membranas seletivas (BARRETO, 2001; FRANCISCON, 2010).

Os processos químicos baseiam-se principalmente na reação oxidativa pelo cloro, peróxido de hidrogênio ou ozônio, englobando técnicas de decomposição da molécula através de eletrólises, ozonização, oxidação avançada e outros processos (SARATALE, 2009; DEIVE et al., 2010; ULSON et al., 2010; FRANCISCON, 2010). São técnicas relativamente caras, se comparadas com as físicas ou biológicas, e apesar do corante acabar por removido, este gera uma grande quantidade de lodo residual concentrado, além de o uso excessivo desses procedimentos químicos, acabar gerando uma poluição secundária, em decorrência da utilização de reagentes químicos (BAFANA et al., 2010).

5.2.1 Processos Biológicos

Os processos biológicos, se apresentam como uma alternativa biotecnológica de baixo custo, sustentável, com melhor eficiência e ao contrário dos métodos físico-químicos que não eliminam o problema, estes são capazes de retirar de forma definitiva o corante do efluente ou transformá-los em subprodutos menos tóxicos, mineralizando-os. Porém, apesar das vantagens podem ser processos bem complexos. A descoloração por processos biológicos, especificamente microbianos, pode ocorrer de duas maneiras, sendo elas por bioadsorção ou biodegradação (ZHOU; ZIMMERMANN, 1993; MÉNDEZ-PAZ et al., 2005; ALI, 2010).

A bioadsorção (adsorção em material biológico) do corante nada mais é do que a aderência do composto às células, estejam elas ainda vivas ou mortas, nesse caso não ocorre nenhuma quebra ou modificação na estrutura original do composto, ele permanece intacto. Em contrapartida no processo de biodegradação, ocorre a fragmentação total ou parcial da molécula do composto, no caso o corante, pelas células microbianas. Quando ocorre uma degradação parcial, o resultado pode ser um composto novo, que pode ou não ser menos tóxico que o poluente original, e quando ocorre a degradação total, também chamada de mineralização total do composto, o xenobiótico é convertido em CO₂, H₂O e um sal de origem inorgânica

(AISLABIE, 2010; ALI, 2010). No caso dos corantes, a descoloração é o primeiro sinal que a molécula está sendo degradada, já que este ocorre quando a ligação dupla conjugada do grupo cromóforo é clivada pelo micro-organismo, fazendo com que a molécula perca a capacidade de absorver energia eletromagnética (KAUSHIK; MALIK, 2009; ALI, 2010).

Embora possa ocorrer de forma natural, a biossorção bacteriana não seria uma opção viável para a remediação de grandes efluentes contaminados, isso porque o poluente não é eliminado do meio, apenas é incorporado a matriz do adsorvente (biomassa microbiana), o que pode trazer problemas posteriormente devido a necessidade de eliminar grandes volumes de biomassa, que biossorveram moléculas de corantes, a menos que se possa reutilizar o corante biossorvido, nesse caso a utilização de técnicas de biossorção por fungos ou microalgas seria uma solução (FU, 2001; KUHAD et al., 2004; ALI, 2010).

A descoloração de corantes, pode ocorrer sob diferentes condições, tais como condições anaeróbias (metanogênicas), anóxicas e aeróbias, realizada por diferentes grupos tróficos de bactérias (PANDEY et al., 2007).

5.3 BIODEGRADAÇÃO DE CORANTES

A biodegradação é definida como uma desagregação biologicamente mediada de compostos químicos, sendo um processo dependente de energia, e no caso, envolve a decomposição da molécula do corante, em subprodutos, através da ação de enzimas. A aplicação de processos biológicos para remoção de poluentes recalcitrantes na natureza é denominada biorremediação (GIANFREDA et al., 2004; RAMALHO et al., 2005; FRANCISCON, 2010; ALI, 2010).

Muitos micro-organismos têm sido utilizados para descolorir e degradar corantes, desde bactérias até fungos filamentosos e leveduras, sendo relatados estudos nos quais estes apresentaram capacidade de degradar diferentes tipos de corantes. Um grupo de micro-organismos pode apresentar vantagens sobre o outro, a eficiência da degradação e descoloração do corante, depende da adaptabilidade e atividade do grupo, ou do micro-organismo selecionado (CHEN et al., 2003). Portanto o desenvolvimento de uma biotecnologia eficiente para a biodegradação do corante, em efluentes contaminados, requer a utilização de um isolado adequado, e sua utilização em condições favoráveis à sua capacidade de degradação (NOVOTNY et al., 2004; ALI, 2010).

5.3.1 Biodegradação por leveduras

Há poucos artigos na literatura que relatam a degradação de corantes por leveduras (KUHAD et al. 2004; JADHAV et al. 2008), alguns trabalhos envolvem a levedura *Candida zeylanoides* isoladas de solos contaminados com corantes (RAMALHO et al., 2002); outros envolvem a caracterização de atividade enzimática na degradação de azo corantes *Issatchenkia occidentalis* (RAMALHO et al., 2004) e *Saccharomyces cerevisiae* (RAMALHO et al., 2005); há trabalhos que ressaltam a presença de enzimas capazes de degradar os corantes, como peroxidases e lacases em cepas de *Pichia pastoris* (LU et al., 2009). Estudos realizados por Ngo (2016), isolaram leveduras do gênero *Candida*, de folhas e cascas de frutas, com potencial de descoloração de corantes como o Direct Pink B e Direct Fast Orange S, que foram descoloridos por estirpes de *Candida guilliermondii*, com variações de temperatura, pH e concentração de cada corante.

Ainda segundo o mesmo autor, o potencial de descolorir cada corante, é influenciado pelos fatores já citados, com temperatura variando de 25°C a 45°C, pH de 4 a 9, e concentrações a média de 50µg.mL⁻¹, concentrações acima demonstraram uma redução na remoção da cor. A mesma levedura pode descolorir 2 ou mais corantes em diferentes condições. Apesar das poucas informações, se comparado com bactérias e fungos filamentosos, as leveduras apresentam algumas vantagens já que, apresentam crescimento celular rápido como bactérias, são facilmente cultiváveis e capazes de resistir a ambientes desfavoráveis com facilidade (YU; WEN, 2005).

5.3.2 Biodegradação por fungos filamentosos

A classe de fungos filamentosos que mais se destaca na literatura, quanto a degradação de compostos como corantes sintéticos, são os fungos de podridão branca pertencentes à classe dos basidiomicetos (COUTO, 2009). Uma espécie em particular, *Phanerochaete chrysosporium*, se destaca pelo complexo enzimático capaz de degradar lignina e outros compostos aromáticos através da produção de várias oxidoreduções, e também mineralizar vários compostos químicos como os corantes em condições aeróbias (NOZAKI et al., 2008; ALI, 2010; BAFANA et al., 2010).

O fato de conseguir mineralizar vários compostos poluentes além de seu substrato natural, os diferencia de bactérias que além de possuírem uma especificidade quanto a seu substrato, podem encontrar certas dificuldades de manipulação ou metabolização de certos compostos (REDDY, 1995; FORSS; WELANDER 2009; ALI, 2010).

A capacidade destes fungos, também conhecidos como lignolíticos para oxidar uma grande variedade de compostos poluentes, incluindo os corantes sintéticos, se dá pela presença de um complexo enzimático extracelular não específico e não estereoseletivo, consistindo em peroxidases de lignina (LiP), peroxidases de manganês (MnP) e lacases (ENAYATZAMIR et al., 2009, COUTO, 2009). A capacidade de produção dessas enzimas lignolíticas tem gerado novas perspectivas para a criação de processos biotecnológicos e atraiu uma certa atenção da comunidade científica para a utilização deste tipo de fungo e suas enzimas.

Os fungos da podridão branca são os micro-organismos corantes/descorantes mais estudados, já que esses são muito importantes para o ciclo global do carbono dado a sua capacidade de mineralizar lignina de material vegetal lenhoso polimérico complexo (KUHAD et al., 2004). Os micro-organismos que degradam madeira podem ser bons candidatos para biodegradação de corantes sintéticos, dada a semelhança da molécula da lignina com a molécula dos corantes (FORSS; WELANDER, 2009). Além dessa classe de fungos, espécies lignolíticas como *Aspergillus niger* e os pertencentes à classe *basidiomycetes*, também são alvo de estudos para a degradação e descoloração de corantes sintéticos, dado a sua capacidade de produzir o mesmo complexo de enzimas extracelulares.

A degradação de anéis aromáticos, quando realizada por fungos, ocorre no metabolismo secundário, quando nutrientes como carbono, nitrogênio e enxofre se tornam limitantes (KIRK; FARREL, 1987). A estrutura química dos corantes e grupos laterais podem influenciar a degradação pelos fungos, sendo que esta dificuldade pode ser ainda maior quando consideramos a variabilidade na composição dos efluentes contendo corantes (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Culturas de células imobilizadas tendem a ter mais atividade e ser mais resilientes a perturbações como variações no pH ou a exposição a concentrações químicas tóxicas, se comparado com culturas em suspensão.

5.3.3 Biodegradação por algas

Tal como as leveduras, a quantidade de informações sobre a atividade biológica de algas para degradar corantes sintéticos ou outros compostos xenobióticos é muito escassa (ALI, 2010). Existem muitos estudos envolvendo a utilização de algas e microalgas na biossorção de metais pesados como o cromo, cobalto e cobre, o que poderia ser bem explorado, já que estes podem ser muitas vezes encontrados em efluentes contaminados por corantes, sendo utilizados para estabilizar a cor de corantes (KILIÇ et al., 2007; DEIVE, 2010).

Por mais escasso que sejam os estudos sobre a descoloração de corantes sintéticos, eles existem, e muitos são focados em espécies já identificadas e utilizadas em outros estudos. As algas são organismos fotossintetizantes, que se distribuem em quase todas as partes do mundo. Estudos envolvendo as espécies *Chlorella pyrenoido*, *Chlorella vulgaris* e *Oscillatoria tenuis*, demonstraram a capacidade dessas espécies em biodegradar e descolorir mais de 30 compostos azo, onde estas foram reduzidas a amins aromáticas mais simples (YAN; PAN, 2004).

Um estudo conduzido por Daneshvar et al. (2007), mostrou a grande capacidade da espécie de microalga *Cosmarium* sp. de degradar e descolorir o trifenilmetano corante verde de malaquita, descrevendo uma série de fatores que influenciam no processo, o que pode ser aplicado a outros ensaios envolvendo descoloração de corantes sintéticos por algas, como a temperatura, pH, a concentração do corante e a concentração de algas (XIE, 2016). Neste caso as algas apresentaram uma melhor atividade em temperaturas de 5 a 45°C onde a taxa de descoloração foi diretamente proporcional ao aumento de temperatura, e pH 9 como valor ótimo de descoloração.

Um das vantagens da utilização de microalgas para o tratamento de efluentes poluídos com resíduos de corantes sintéticos, é descrita por Xie et al. (2016) por sua capacidade de adaptabilidade em ambientes hostis. Outra vantagem da utilização é o reaproveitamento da biomassa para produção de biocombustíveis como o biodiesel ou bio óleo (XIE, 2016). Dessa forma a utilização de microalgas para a biorremediação de efluentes contaminados com corantes, possui um forte potencial de trabalhos futuros, e uma grande área a ser explorada.

5.3.4 Biodegradação por bactérias

Se comparado com fungos filamentosos, a atividade de descoloração e degradação do corante pelas bactérias, é muito mais rápido, apesar da redução bacteriana não ser específica, este processo se mostra mais ambientalmente correto e com custo bem mais abaixo do que os processos físico-químicos (FRANCISCON, 2010; ALI, 2010). A degradação de azo corantes e outros tipos por diferentes grupos tróficos de bactérias, pode ocorrer em condições anaeróbias (metanogênicas) e aeróbias (PANDEY et al, 2007), embora sabe-se que a degradação de corantes por bactérias seja mais efetiva em condições anaeróbias, há estudos conduzidos com diferentes cepas como *Xenophylus azovorans* KF46F, linhagem *Bacillus*, *Kerstersia* sp. linhagem VKY1 e *Staphylococcus* sp., que demonstraram resultados satisfatórios em condições aeróbias (DOS SANTOS et al., 2007; VIJAYKUMAR et al., 2007; HSUEH, 2008; LIN; LEU, 2008).

A descoloração e degradação bacteriana, está associada ao complexo de enzimático de várias enzimas oxidativas (lacases) e redutivas (NADH-DCIP redutase e azoredutase) (PARSHETTI et al., 2010). Para que a degradação do composto ocorra de forma completa, é necessário que este passe por processos de redução (anaeróbia) que irá reduzir os compostos a aminas aromáticas, e em seguida por processos de oxidação (aeróbia) para degradação das aminas aromáticas, que apresentam características mutagênicas e carcinogênicas para mamíferos, vindo a ser a principal desvantagem da utilização de bactérias para a biodegradação anaeróbia de corantes, especificamente azo corantes (figura 2) (PINHEIRO et al., 2004; KUHAD et al., 2004; VAN DER ZEE, 2005; DAWKAR et al. 2009; ALI, 2010; FRANCISCON, 2010).

Nos últimos tempos, uma atenção maior tem sido dado a estudos envolvendo micro-organismos extremófilos, dentre estes os termófilos tem se destacado como alvos de grande interesse industrial e biotecnológico, dado a sua capacidade de aguentar ambientes hostis, e tem sido alvo para estudos para degradação de corantes sintéticos, dado a vantagens que estes proporcionam, o que diminuiria os custos de resfriamento, diminuiria possibilidade de contaminação, aumentaria a solubilidade dos compostos e diminuiria a viscosidade (ROBINSON et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2004; ALI, 2010; DEIVE et al., 2010).

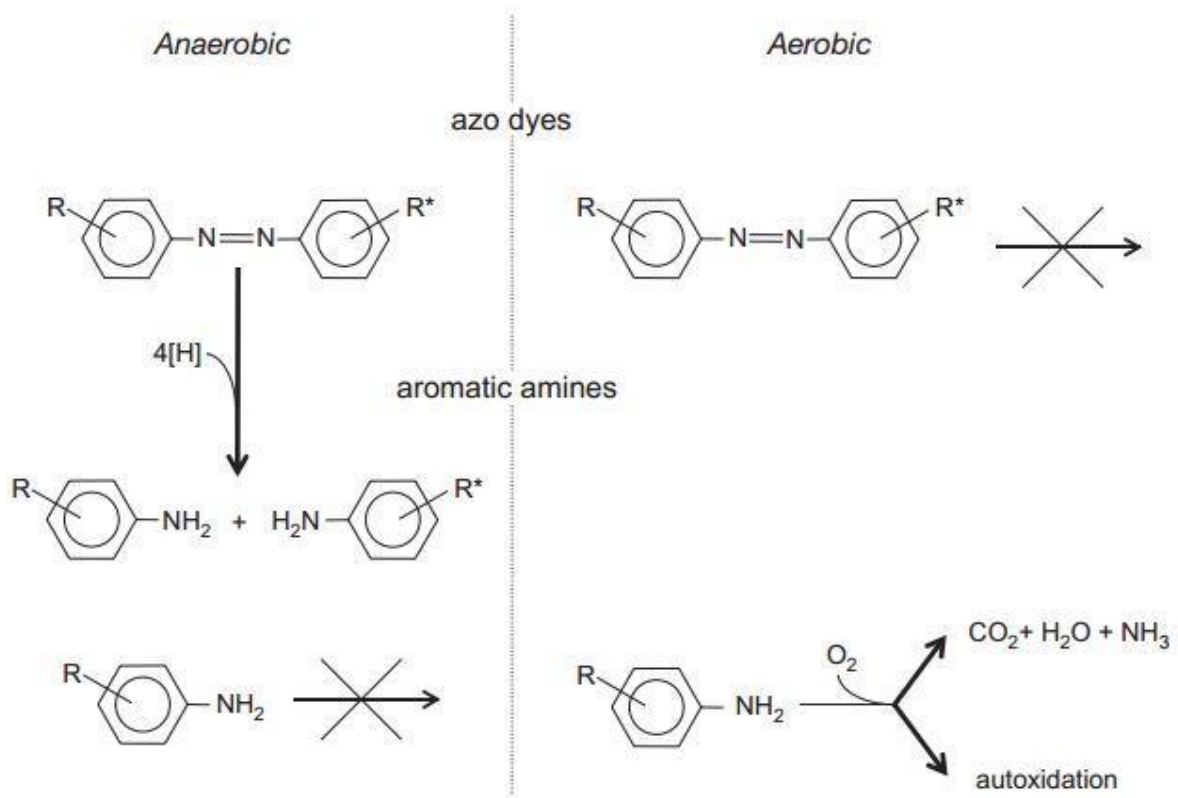


Figura 2. Degradação completa de um azo corante em condições anaeróbias e aeróbias

Fonte: van der Zee, 2005

5.3.4.1 Biodegradação em condições anaeróbias

Segundo vários estudos, a degradação de corantes sintéticos, ocorre com mais eficácia em condições com ausência de oxigênio (anaeróbias) nestas condições as bactérias podem reduzir os azo corantes através da produção de redutases específicas, denominadas NAD-DCIP azoredutases que na ausência de O₂ vão catalisar a clivagem da ligação azo, no caso de azo corantes (FORGACS et al., 2004; BAFANA et al., 2010; FRANCISCON, 2010).

Na presença de oxigênio, as azoredutases tem sua atividade interferida, impedindo a degradação do composto de forma eficiente. Estas enzimas foram isoladas de várias bactérias, como *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dentre outros. A ação de azoredutases também fora identificada em organismos eucariotos, como leveduras, humanos, ratos e coelhos (BAFANA et al, 2008).

A metanogênese (anaerobiose) de compostos orgânicos complexos, requer a participação de muitos grupos tróficos de bactérias, incluindo as acidogênicas, acetogênicas e

metanogênicas. Nestas condições a degradação do corante, requer uma fonte de energia (carbono), como glucose, amido, acetato, etanol e outros mais complexos, como soro de leite e a tapioca (CHINWETKITVANICH et al., 2000, WILLETTS et al., 2000, TALARPOSHTI et al., 2001; VAN DER ZEE, 2005). Em condições anaeróbias a taxa de redução de DQO tem sido de 60-70% (ZAOYAN et al., 1992).

5.3.4.2 Biodegradação em condições aeróbias

Embora a redução de azo corantes seja mais eficiente utilizando bactérias em condições de anaerobiose, para que o composto seja completamente mineralizado, liberando CO₂, H₂O e sais inorgânicos, é necessário também passar pelo processo de degradação em condições aeróbias. Isso porque na ausência de oxigênio, o composto não é totalmente degradado, mas sim reduzido a aminas aromáticas, que podem ser muito tóxicas, com características mutagênicas e carcinogênicas. Dessa forma, é necessário que ocorra o processo de degradação aeróbio, para que as moléculas sejam totalmente mineralizadas (ALI, 2010).

Apesar da ineficiência do processo de redução por bactérias em condições aeróbias, existem casos, onde este pode ocorrer. Nessas circunstâncias, as bactérias precisam passar por uma fase longa de adaptação em um meio contendo um composto azo simples e uma fonte de carbono orgânico, já que elas não têm a capacidade de utilizar o corante como substrato de crescimento, dessa forma a bactéria poderá produzir uma azoredutase específica para estes compostos que poderão clivar o grupo azo na presença de oxigênio em condições controladas, apesar do evento não ocorrer normalmente, já que a presença de oxigênio inibe a ação das azoredutases, uma vez que a respiração aeróbia pode dominar o uso de carreadores de elétrons (NADH, FADH), impedindo estes de serem entregues a ligação azo, resultando em uma descoloração ineficiente (STOLZ, 2001; FRANCISCON, 2010).

Em 2004 Adedayo e colaboradores isolaram e identificaram quatro novos isolados, utilizando o azo corante vermelho de metila, como única fonte de carbono, nestas os produtos de amina não foram identificados após os ensaios de degradação, indicando uma completa degradação do composto pelas bactérias.

5.4 TOXICIDADE DOS CORANTES

Os efeitos tóxicos dos corantes, como características mutagênicas e carcinogênicas, podem estar relacionados diretamente com o corante ou com seus metabólitos como acrilaminas e radicais livres (WEISBURGER, 1997; BAFANA et al., 2011). Para humanos o critério utilizado para averiguar o grau de toxicidade é a capacidade de clivagem redutiva, ou seja, a formação de amina aromáticas quando em contato com o suor, saliva ou sucos gástricos (PIELESZ et al., 2002; CHEQUER et al., 2011).

Há diversas maneiras pelas quais os corantes podem reagir com a microbiota presente nos seres humanos e outros mamíferos. Como são comumente utilizados em indústrias têxteis e alimentícias, dessa forma a microbiota intestinal e cutânea, é capaz de metabolizar uma pequena parte dos corantes presentes nos tecido e alimentos, liberando dessa forma aminas aromáticas como produto do metabolismo, no intestino a microbiota trabalha junto com enzimas como CYP450, que juntas irão ativar o corante (redução azo e nitro) liberando as aminas (DE ARAGÃO UMBUZEIRO et al., 2005; DE LIMA et al., 2007; CHEQUER et al., 2011). Estudos conduzidos por Stingley e colaboradores (2010), apontam que a maioria das bactérias presentes na pele poderiam reduzir corantes como o vermelho de metila e o Orange II, a aminas aromáticas, outros estudos apontam que bactérias presentes no cólon humano, reduzem corantes como o Sudan Red (BAFANA et al., 2011).

Estudos verificaram que vários corantes, causam dermatite de contato em ensaios de linfonodos locais (AHUJA et al., 2010). Dessa forma, os azo corantes podem ser absorvidos por contato dérmico, tendo ocorrido por eventos ocupacionais ou mesmo por uso de cosméticos, utilizando tais compostos em sua composição (KUČEROVÁ et al., 1987), ou mesmo integrados ao organismo via oral, em casos de contaminação de lençóis freáticos ou rios de abastecimento (RAJAGURU et al., 1999; CHEQUER, 2011) ou alimentos contaminados, já que estudos comprovaram que em muitos casos, o corante pode migrar da embalagem para o alimento (KOLADO; BALCERZAK, 2008). A absorção das aminas pode ocorrer nos pulmões, trato gastrointestinal ou pele, e são excretados na urina, um estudo constatou benzidina na urina de trabalhadores expostos ao corante Direct Black 38 (DEWAN et al., 1988).

As aminas aromáticas, produto da degradação de corantes sintéticos, como os do grupo azo, são tóxicas e podem apresentar efeitos agudos ou crônicos dependendo da quantidade (BAFANA et al., 2011), além de características mutagênicas e carcinogênicas (PINHEIRO et al., 2004; CHEQUER, 2011; AMARAL, 2015), exemplos de aminas são as bifenilaminas como

as benzidinas e 4-bifenilamina, que quando presentes no ambiente, apresentam uma ameaça para a saúde humana e para o ecossistema em geral (CHUNG et al., 2000). Análises via oral, do grau de toxicidade dos corantes, no entanto, demonstraram que apenas uma reduzida quantidade de corantes apresentou efeitos tóxicos agudos, medido através de 50% da dose letal (LD₅₀) que é de 250-2000 mg/kg de peso corporal, encontrados principalmente em azo corantes (CLARKE, 1980; FRANCISCON, 2010).

Esses compostos aromáticos e seus efeitos, variam para cada corante, nem sempre dois ou mais azo corantes, terão o mesmo produto de degradação. As aminas resultantes do corante Acid Violet 7 por exemplo, podem induzir aberrações cromossômicas, peroxidação lipídica, e efeito inibitório de acetilcolinesterase na injeção intraperitoneal em ratos; o azo corante Disperse Red 1 provoca um aumento na frequência de micronúcleos nos linfócitos humanos e nas células HepG2 dependendo da dose (CHECKER et al., 2009).

Um levantamento de produtos têxteis no Japão, apontou um nível acima do permitido em tecidos, de aminas aromáticas, incluindo benzidinas (KAWAKAMI et al., 2010). Da mesma forma um estudo no Brasil mostrou atividade mutagênica em água tratada, que foi atribuída a contaminação de um efluente de uma indústria de processamento de azo corantes (DE LIMA et al., 2007). Portanto, é necessários estudos para conhecer a real toxicidade de um corante e seus produtos metabólicos, uma vez que o tratamento de efluentes de indústrias não removem completamente compostos mutagênicos, conseqüentemente podem ser encontrados em água tratada (NAM; RENGANATHAN, 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

Os efluentes contaminados com corantes sintéticos são normalmente depositados em corpos d'água, dessa forma a toxicidade dos corantes foi primeiramente e principalmente estudada contra organismos aquáticos, verificando que principalmente os corantes azóicos, se apresentavam muito tóxicos para vários organismos aquáticos, incluindo, algas, peixes e crustáceos, tais como a *Daphnia*, crustáceo muito utilizado para teste em vivo de toxicidade de compostos xenobióticos poluentes (BAFANA et al., 2011). Os azo corantes demonstraram diminuir a viabilidade de reprodução, a taxa de filtração e o consumo de O₂ no cladocerano, *Moina macrocopa* (WONG et al., 2006).

Além destes efeitos, a presença em quantidade considerável de corantes em efluentes depositados em corpos d'água, prejudica a fotossíntese de algas e outros vegetais, estes também acabam atuando como inibidores de DQO e atividades respiratórias microbiana, o que implica em uma série de malefícios, já que pode inibir alguns processos microbianos, como tratamento de águas residuais e ciclos bioquímicos naturais (CHUNG, 1993).

5.5 EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

Todos os dias, as indústrias de papel e celulose descartam mais de 62 milhões de metros cúbicos de efluente, correspondendo ao consumo doméstico de água de aproximadamente 200 milhões de pessoas (PERALTA-ZAMORA, 1996). A madeira é uma das principais matérias-primas utilizadas em indústrias de papel e celulose, sendo esta composta de celulose, carboidratos, e lignina que atua como substância adesiva para fibras de celulose. A indústria quebra a madeira e separa a celulose de materiais não celulósicos, a matéria prima é então dissolvida quimicamente até formar uma polpa. A polpa é então seca em uma máquina para produzir folhas de papel, em meio a esses processos pode ocorrer a utilização de corantes, conservantes ou materiais de revestimento para fornecer a qualidade desejada (THOMPSON et al., 2001).

Em meio a utilização de tantas substâncias químicas, o efluente se torna contaminado, não só por compostos xenobióticos como os corantes e conservantes, como também pelos resíduos resultantes da separação da celulose presente na madeira. Dessa forma, causando impacto térmicos, formação de escamas, problemas com a coloração e danos na estética do ambiente (POKHREL; VIRARAGHAVAN, 2004).

Existem diferenças entre os efluentes de produção de papel, e de celulose (BILLINGS, 1971), dado a diversidade de processos e reagentes químicos utilizados em cada um. A maior diferença está na composição das águas residuais, a derivada da polpa, derivada da extração de celulose de madeira, contém substâncias derivadas da matéria prima, que são extraídas durante os processos de polpação e branqueamento, outra diferença está na coloração final dos efluentes, pois o efluente de polpa tende a possuir certa descoloração, dada a lignina dissolvida (THOMPSON et al., 2001).

Dado a presença de lignina nesses efluentes, pode-se afirmar que exista nesses ecossistemas micro-organismos que apresentem um potencial de metabolizar esse composto e a utilizar como fonte de energia para crescer, dessa forma, degradando o composto. Como a estrutura molecular da lignina é semelhante à de muitos compostos xenobióticos como os corantes sintéticos, muitos estudos têm sido realizados com micro-organismos capazes de degradar a lignina, e sua capacidade de degradar outros compostos poluentes, com ênfase em fungos filamentosos e bactérias (CRIPPS et al., 1990).

6. METODOLOGIA

6.1 CORANTES AVALIADOS

Foram utilizados dois azo corantes, de amplo uso em laboratório, sendo eles o azo corante verde de janus e alaranjado de metila. O verde de janus, é um azo corante monoazo, muito utilizado em histologia para corar mitocôndrias supravitalmente, sendo um corante difícil de ser degradado, é formado por uma porção de dietilsafranina e dimetilaniolina (LAZAROW; COOPERSTEIN, 1952). Enquanto que o alaranjado de metila é um azo corante utilizado como indicador de pH, muito usado em titulações de ácidos, dado a sua capacidade de alteração de cor em meio ácido, a estrutura molecular de ambos os corantes, verde janus e alaranjado de metila podem ser observadas na **Figura 3** respectivamente. Para ambos os corantes, a metodologia de preparo foi a mesma, seguindo a concentração de $180000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, na solução mãe, foram pesados então 0,18 g de cada um dos corantes e diluídos em 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Após dissolução, as soluções foram filtradas em micro filtros de membrana, estéreis de $0,45 \mu\text{m}$ e $0,22 \mu\text{m}$, em cabine de segurança biológica nesta ordem. Ao final as amostras foram armazenadas em recipiente de vidro âmbar estéril, sendo mantidas a temperaturas de 4°C em geladeira convencional.

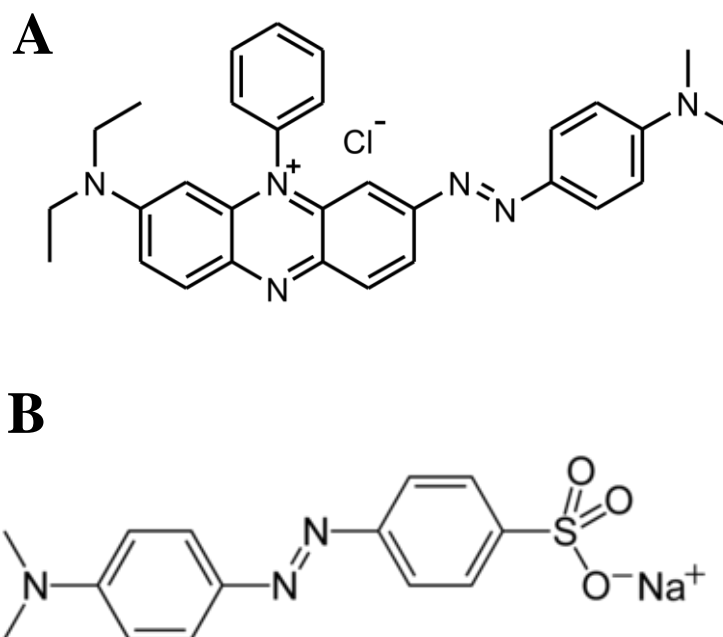


Figura 3. Estrutura molecular do azo corante verde janus B (A) e alaranjado de metila (B)

6.2 MEIO DE CULTIVO

Foi utilizado para o cultivo e isolamento dos micro-organismos utilizados no presente experimento, o meio ATZ-R descrito por Fernandes et al. (2014), e adaptado para o isolamento, respeitando-se seguintes concentrações: 67 mL. L⁻¹ de KH₂PO₄ a 1 mol. L⁻¹ (pH 6.8), 2 g. L⁻¹ de citrato de sódio, 5 mL. L⁻¹ de solução de sal R (200×), 0.2 mL. L⁻¹ de CaCl₂, 5mL. L⁻¹ de NH₃NO₄ e 1% de extrato de levedura sendo os dois últimos utilizados como fonte de nitrogênio. O meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20 minutos, o pH da solução ajustou-se automaticamente para 6,5 devido a adição da solução de Sal R na proporção de 1 mL a cada 200 mL de meio, contendo MgSO₄.7H₂O (80 g. L⁻¹); FeSO₄.7H₂O (2g. L⁻¹) e HCl (4 mL. L⁻¹) previamente esterilizados a 121°C por 20 minutos, sendo utilizado 1,5% de ágar bacteriológico para meio sólido. O corante foi utilizado como única fonte de carbono no meio, adicionando 1 mL da solução previamente preparada (**Item 6.1**) a cada 100 mL de meio ATZ-R com concentração final de 18 µg.mL⁻¹, a fim de avaliar a capacidade das bactérias isoladas de utilizar o composto como fonte de carbono. O extrato de levedura somente foi adicionado aos meios quando foi realizado experimento para comparação na descoloração dos corantes, utilizando meios com e sem extrato de levedura para o corante alaranjado de metila.

6.3 COLETA DE AMOSTRAS DE EFLUENTE PARA BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS

Foram coletadas amostras da saída da turbina do efluente da empresa de Papel e celulose Eldorado (Três Lagoas-MS), rica em lignina, as amostras foram levadas até o laboratório de Metagenômica no prédio multidisciplinar da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foram armazenadas em recipientes de plástico, em geladeira convencional a 4°C. Para a bioprospecção dos organismos, as amostras foram incubadas em agitador orbital tipo shaker, a 130 rpm, 30°C, pelo período de 120 minutos.

6.4 BIOPROSPECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Após o tratamento de duas horas das amostras, foi realizado diluição seriada até 10⁻⁵, sendo então inoculados 100 µL em placas de Petri contendo meio ATZ-R e solução de corante

em duplicata das diluições de 10^{-3} a 10^{-5} para cada um dos corantes, e incubadas em BOD a 30°C pelo período de 72 h, para avaliação de crescimento bacteriano.

6.5 PURIFICAÇÃO DE ISOLADOS

Após o período de 72 horas de crescimento bacteriano, foram selecionadas visualmente colônias morfológicamente diferentes, a fim de se obter isolados diferentes. Desta seleção foi realizada a purificação pela técnica de esgotamento em placas de Petri contendo o meio seletivo mais solução de corantes, para obtenção de colônias puras. O procedimento foi realizado repetidas vezes, até a comprovação da pureza das colônias, utilizando a técnica de Gram.

6.6 TESTES MORFO-TINTORIAIS

6.6.1 Teste de Gram

O teste de coloração de Gram foi realizado para determinar a morfologia dos isolados e o tipo de parede celular da bactéria para isso foram utilizadas duas lâminas por placas analisadas. O procedimento usado para a coloração das bactérias nas lâminas, foi seguido de acordo com as instruções do fabricante (Laborclean) dos produtos utilizados, no qual foi feito um esfregaço das bactérias estudadas, em seguida foi coberta com cristal violeta e agiu deixada agir por aproximadamente 45 segundos, utilizando água destilada, foi lavada até tirar o excesso. Foi aplicado lugol à lâmina, e agiu por 1 minuto, foi lavado até retirar o excesso. Foi aplicado na lâmina, solução descorante (etanol e acetona) até que o excesso de corante fosse retirado, e foi lavado com água destilada. Por último foi aplicado sobre a lâmina, fucsina, que agiu por 30 segundos, em seguida foi lavado com água destilada até que o excesso fosse retirado, e lamina foi avaliada após secagem. A observação foi feita via microscópio óptico, utilizando a objetiva de 100x, para isso foi necessário a aplicação de uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço. As colônias que apresentavam coloração rosa ou avermelhada foram consideradas bactérias Gram-negativas, e as que apresentaram coloração roxa ou azulada, Gram-positivas.

6.6.2 Teste de KOH

Para confirmar o teste de Gram, muitas vezes inconclusivo, pode-se utilizar do teste de KOH. Dessa forma em uma lâmina de microscopia, foram adicionadas duas gotas de KOH (hidróxido de potássio) a 3%. Com o auxílio de uma alça de platina, foi coletada uma pequena amostra de uma colônia isolada da bactéria a ser testada e misturadas com a solução de KOH 3% na lâmina de microscopia, fazendo movimentos circulares por 30 segundos. Durante a mistura a alça deve ser erguida a cerca de 1 a 2 cm da superfície da lâmina, observando se há presença ou não de fios viscosos pendentes. Caso a bactéria analisada seja realmente Gram-negativa, o KOH irá romper sua parede celular expondo o DNA, que poderá ser visualizado como um visco, caso a bactéria tenha sido erroneamente classificada como Gram-negativa, o visco não será visualizado, já que trata-se de uma bactéria Gram-positiva, cuja parede celular não é rompida pelo KOH 3%.

6.6.3 Teste de Catalase

Com o auxílio de uma alça de platina, foi recolhido uma quantidade considerável da bactéria de interesse e feito um esfregaço em uma lâmina, em seguida foi adicionado uma gota de peróxido de hidrogênio 3% sobre as bactérias depositadas na lâmina. As amostras que apresentaram surgimento imediato de bolhas (a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso) foram consideradas como resultado positivo, as que não apresentaram nenhuma atividade como surgimento de bolhas ou efervescência são consideradas como resultado negativo. Este teste foi realizado apenas nas bactérias previamente identificadas como Gram-positivas.

6.6.4 Teste de Oxidase

Este teste foi realizado somente para os isolados que foram classificadas anteriormente como Gram-negativas. Para que ocorresse, foram utilizadas fitas para determinação de oxidase NEWPROV e os procedimentos foram seguidos de acordo com as indicações do fabricante. Com a utilização de uma alça de platina, foi feito um pequeno esfregaço de bactérias direto da

placa, no lugar indicado da fita. Foram considerados oxidase positiva aquelas que apresentaram uma mudança de cor para o roxo quase azulado na ponta da fita onde foi feito o esfregaço, e oxidase negativa para as que não apresentaram alterações.

6.7 PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS EM COLEÇÃO

6.7.1 Tubo inclinado

Os procedimentos de manutenção dos isolados foram realizados nos três experimentos conduzidos. Para a preservação dos isolados, foram realizados repiques contínuos em placas de Petri contendo o mesmo meio seletivo de isolamento (ATZ-R adaptado) adicionado dos azo corantes como única fonte de carbono, incubadas a 30°C por 48 horas e armazenados em tubos inclinados, também contendo meio seletivo. Após inoculação dos tubos, estes foram deixados na BOD a 30 °C no período também de 48 horas para crescimento, e armazenados em geladeira. Os tubos eram renovados uma vez por mês para manutenção e conservação dos isolados, por garantia os isolados também foram preservados em glicerol estéril (40%) e armazenados em freezer convencional a -20°C.

6.7.2 Glicerol

Por garantia os isolados também foram preservados em glicerol estéril (40%) e armazenados em freezer convencional a -20°C. Para isso, preparou-se o glicerol 40%, misturando 80 mL de glicerina em 120 mL de água, como solução estoque. Em seguida cultivou-se as bactérias em meio líquido rico, utilizando glicose como meio líquido e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, a fim de se obter um crescimento considerável no período de 24 horas. Após o período de crescimento, foi coletado 0,9 ml de meio líquido contendo os isolados e 0,9 do glicerol 40% e adicionados em tubos criogênicos, que foram armazenados em freezer convencional na temperatura de -20°C.

6.8 ENSAIOS DE DESCOLORAÇÃO DOS CORANTES

Para os ensaios de descoloração, foram preparados tubos de ensaios em triplicata para cada isolado, contendo 13 mL do meio de cultivo ATZ-R (previamente autoclavados por 20

minutos a 121°C) foi adicionada a solução de corante preparada na concentração descrita no **Item 6.2**, neste caso não foi utilizado extrato de levedura como fonte de nitrogênio, o extrato foi acrescentado em um ensaio separado para comparação, pois há estudos que indicam uma melhor eficiência na descoloração de corantes na presença de extrato de levedura. Os isolados foram estriados em placas de Petri contendo o meio utilizado e o corante correspondente e incubados em BOD a 30°C pelo período de 24 horas. Após crescimento foram coletadas amostras uniformes de colônias das placas, utilizando alça de platina, e inoculados nos tubos contendo o meio de cultivo mais a solução de corantes. Foi retirada uma alíquota de 2 mL para medição de absorvância no tempo 0, em espectrofotômetro. Os tubos foram devidamente fechados e incubados em BOD sem agitação em microaerofilia, a 30°C pelo período de 144 horas junto com os tubos de controle abióticos sob as mesmas condições de cultivo. Após 48 horas de incubação foi medida a densidade óptica a cada 24 horas das amostras e também dos controles, utilizando espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 625 e 624 nm para verde de janus e 460 nm para alaranjado de metila. Além das medições, fotos foram tiradas, a fim de se documentar de forma visual a descoloração dos corantes.

6.8.1 Cálculo de porcentagem de descoloração

Os valores de porcentagem de descoloração foram obtidos utilizando os valores de absorvância das amostras e dos controles, aplicados na seguinte equação:

$$\text{Descoloração} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} * 100$$

6.9 ANÁLISE DE DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO

A demanda química de oxigênio (DQO) é um importante indicativo de matéria orgânica, é baseado na concentração de Oxigênio (O₂) consumido para oxidar a matéria orgânica (VALENTE; PADILHA; SILVA, 1997). Basicamente, quanto maior a poluição efluente, maior será a demanda química de oxigênio que um micro-organismo utilizará para oxidar os compostos poluentes presentes. Dessa forma, as análises de DQO são muito utilizadas em ensaios de biorremediação efluentes poluídos, pois caso haja redução desta, supõe-se que a quantidade de compostos orgânicos poluentes esteja diminuindo.

6.9.1 Soluções

6.9.1.1 Solução de dicromato de potássio (solução digestora)

Preparou-se 500 mL de solução de dicromato de potássio, para isso foi pesado 29,419 g de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 1,0 N, para 100 mL de água destilada, completando para 500 mL para dissolução completa dos sal.

6.9.1.2 Solução de $AgSO_4 + H_2SO_4$ (solução catalítica)

Utilizando o dado de densidade do ácido fluorídrico, foi calculada a quantidade de Sulfato de prata (em gramas) utilizada para o preparo da solução, dessa forma, foram pesados 2,024g de $AgSO_4$ para 200 mL de H_2SO_4 .

6.9.2 Ensaio de demanda química de oxigênio

Para o seguinte ensaio, foram utilizados tubos de rosca, devidamente lavados e secos em estufa com 24 horas de antecedência ao experimento. Foi utilizado um tubo para cada amostra, incluindo os controles, para isso foram pesados em cada um dos tubos de 0.04 a 0.05 g de $HgSO_4$ (Sulfato de mercúrio); 2,5 mL da solução de ácido sulfúrico com sulfato de prata; 0,3 mL de água deionizada; 0,5 mL da solução de dicromato de potássio a 1,0 N; e adicionados na ordem descrita. Em seguida foi adicionado 2,0 mL da amostra, utilizando H_2O para o branco, as amostras foram adicionadas ao tubo com inclinação de 45° . Cada um dos tubos contendo as soluções de reações e as amostras foram colocadas em uma chapa metálica (reator) por 120 minutos pré-aquecido a $160^\circ C$. Os tubos foram retirados do reator e deixados para esfriar pelo período de 40 minutos. Após resfriamento as amostras foram transferidas para cubetas de quartzo e tiveram a DQO medidas utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm.

6.9.3 Curva de calibração (mg. L⁻¹/absorbância)

Como as amostras de DQO tiveram a concentração de oxigênio medida em absorbância, foi necessário a realização de uma curva de calibração para que a concentração de O₂ em mg.L⁻¹ fosse realmente encontrada. Para isso, preparou-se uma solução padrão com concentração de 1000 mg. L⁻¹ de biftalato de potássio, deste foram preparados diferentes padrões com diferentes concentrações para a realização da curva de calibração. Em diferentes tubos de ensaio foram adicionados volumes da solução e o restante de água destilada para completar 10 mL, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 3. Parâmetros seguidos para realização da curva de calibragem para concentração em mg. L⁻¹

Tubo	V ^{solução} (mL)	V ^{água} (mL)	DQO (mg/L O ₂)
1	2	8	200
2	4	6	400
3	5	5	500
4	6	4	600
5	8	2	800
6	10	0	1000

Para cada um dos tubos contendo soluções padrão com diferentes concentrações, foi realizado ensaios de redução de DQO, utilizando 2 mL de cada amostra, em uma reação com as soluções digestoras e catalíticas, os passos seguintes foram realizados de acordo com o item 6.9.2. Após obtenção dos valores em absorbância, plotou-se um gráfico, com concentração em mg. L⁻¹ pela absorbância. Utilizando uma linha de tendência, ajustou-se o R² para que ficasse o mais próximo possível de 1,0, chegando ao valor de 0,9981. Dessa forma utilizando a equação da reta, e os valores obtidos das amostras do ensaio, chegou-se a concentração de cada um, nos tempos iniciais e finais em mg.L⁻¹ de O₂.

6.9.4 Cálculo da porcentagem de redução

Os valores de porcentagem de redução da DQO foram determinados através da

comparação dos resultados, entre a DQO nas amostras antes do ensaio de descoloração (inicial) e após (final) utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ redução de DQO} = \frac{(DQO \text{ Inicial} - DQO \text{ Final})}{DQO \text{ inicial}} * 100$$

6.10 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO GENE RNAm 16S

Os dois isolados que apresentaram melhores resultados de descoloração e redução da DQO de cada corante, tiveram seu DNA extraído através do método descrito por Bonatto et al. (2014) no laboratório de Metagenômica, do bloco multidisciplinar da UFGD. O pellet bacteriano foi ressuscitado em 1000 µL de solução PBS e 2 µL de EDTA. Neste foi adicionado 60 µL de SDS 10%, e misturado com leve agitação e incubado a 60°C durante 10 min, resfriado à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 650 µL de fenol-clorofórmio (25:24), e agitado vigorosamente, centrifugado à 10.000 rpm durante 5 min, transferindo 500 µL da fase aquosa para outro tubo e realizado uma nova extração 500 µL fenol-clorofórmio, da fase aquosa foram retirados 500 µL e passado para um tubo novo e foi adicionado 10 µL de NaCl 5M e 300 µL de isopropanol. Foi novamente centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min e o precipitado de ácidos nucleicos lavados com etanol 70%.

O material genético extraído foi visualizado em gel de eletroforese 1% e quantificado utilizando o espectrofotômetro de espectro completo Nanodrop, utilizado para quantificação de ácidos nucleicos. Os processos seguintes de amplificação, sequenciamento pelo método de SANGER, foram realizados por Facility no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Genica da Universidade Estadual Paulista campus de Jaboticabal (LMSEQ). O gene 16s rRNA, foi amplificado por PCR utilizando 5 diferentes primers FD1, 362, 786, 1203, RD1 (BENSON et al. 1996; SZILAGYI-ZECCHIN et al. 2014; GOŁĘBIEWSKI et al. 2014)

6.10.1 Análises de bioinformática

As sequências do 16S rRNA obtidas a partir do sequenciamento dos isolados foram unidas, passaram por processos de tratamento, a fim de identificar e eliminar vetores, para isso

utilizou-se o programa VecScreen, após esse processo, alinhou-se as sequências que retornaram do sequenciamento de cada primer utilizando a ferramenta CAP e *assembly* em *contigs* usando o programa BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999). A identificação de gênero e espécie foram alcançadas através de comparações entre os *contigs* obtidos e as 10 sequências de 16S rRNA com as mais semelhantes encontradas no GenBank, utilizando o sistema de alinhamento local de nucleotídeos BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) da NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011), e analisadas com o software MEGA7 (KUMAR et al., 2016). A reconstrução filogenética foi realizada utilizando os algoritmos neighbor-joining (NJ) com valores de bootstrap calculados para 1000 corridas de réplicas (FANCISCON, 2010). A distância evolucionária foi baseada no modelo Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980).

6.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os ensaios de descoloração e redução de DQO, aplicou-se análises estatísticas a fim de averiguar, possíveis diferenças quanto a capacidade de descoloração e redução de DQO entre os isolados, e a influência do extrato de levedura para ambos os ensaios. Dessa forma utilizando o programa GraphPad PRISM versão 7.00 para Windows, Software GraphPad, La Jolla Califórnia EUA, (www.graphpad.com), aplicou-se o teste de regressão linear para o ensaio de descoloração para ambos os corantes, utilizando os dados de descoloração em absorbância em relação ao tempo, a fim de averiguar a relação linear entre essas duas variáveis. Para os dados em porcentagem aplicou-se o teste Tukey para averiguar possíveis diferenças entre os isolados quanto a capacidade de descoloração; o mesmo teste foi aplicado para o ensaio de redução de DQO utilizando os dados em porcentagem e concentração em mg. L⁻¹O₂.

A influência do extrato de levedura nos ensaios foi averiguada utilizando um teste de variância em fatorial, a fim de verificar se a presença do extrato de levedura influenciou de alguma maneira algum dos ensaios. Seguido de um teste de comparação de medias Tukey para que os resultados fossem mostrados de forma clara, comparando não só as condições, mas também cada isolado sob diferentes condições.

7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 IDENTIFICAÇÃO MORFO-TINTORIAL

Foram isolados no total de 8 micro-organismos, sendo 4 para cada corante utilizado no presente estudo. Como observado na tabela 4, todos os isolados do efluente de indústria de papel e celulose, para ambos os corantes, foram classificadas como Gram-negativas, sendo confirmadas pelo teste de KOH que apresentou resultado positivo para todos os isolados. Desta forma, foi realizado o teste de oxidase para todos os isolados, apresentando resultado positivo para todas. Muitos estudos têm descrito gêneros Gram-negativos, isolados de efluentes, como ótimos degradadores de azo corantes, com ênfase para espécies do gênero *Pseudomonas* e *Sphingomonas*, que têm apresentado grande capacidade de descolorir e degradar o azo corante vermelho de metila, segundo estudos feitos por Franciscon (2010) e Ayed (2011).

Tabela 4. Identificação morfo-tintorial dos isolados, para os dois corantes

Nomenclatura	Morfologia	Gram	Catalase	Oxidase	KOH
J1	Bastonete	-	NR	+	+
J2	Bastonete	-	NR	+	+
J3	Bastonete	-	NR	+	+
J4	Bastonete	-	NR	+	+
L1	Bastonete	-	NR	+	+
L2	Bastonete	-	NR	+	+
L3	Bastonete	-	NR	+	+
L4	Bastonete	-	NR	+	+

(-): negativo; (+): positivo; NR: não realizado

7.2 DESCOLORAÇÃO

7.2.1 Verde de Janus

O monoazo, verde janus B é um azo corante instável de cor azul, formado por uma molécula de dietilsafranina de cor avermelhada (corante natural) e uma molécula de dimetilanilina incolor (amina aromática), ligados por uma ligação azo. Quando exposto a agentes redutores, a ligação azo pode ser quebrada totalmente ou parcialmente, liberando a molécula de dietilsafranina. No caso do presente estudo, o corante verde janus B (VJ-B) foi exposto a bactérias, isoladas de efluente de indústria de papel e celulose, que sob condições de microaerofilia, atuaram como agente redutores, havendo uma alteração na coloração da amostra (azul para púrpura), mudando ligeiramente o comprimento de onda utilizado, em alguns isolados a partir do tempo T1 (48 horas), indicando a quebra parcial da ligação azo, pois as amostras adquiriam coloração roxa, indicando a formação de um composto denominado Leuco verde janus B I (Leuco VJ-B I), que segundo Lazarow e Cooperstein (1952), podem apresentar coloração roxa ou púrpura, dado a um possível efeito de ponderação exercida pela ligação da dietilsafranina e dimetilanilina. Dessa forma, este efeito de ponderação pode gerar uma ligeira mudança no espectro de absorção máximo em direção aos comprimentos de onda mais longos, 625 nm o comprimento de onda para o VJ-B e 624 nm para o Leuco VJ-B I. No caso dos isolados J2 e J4, após 48 horas da inoculação, este grupo cromóforo havia sido provavelmente parcialmente rompido, reduzindo a forma de Leuco VJ-B I de cor púrpura como observados nas **figuras 5 e 6**.

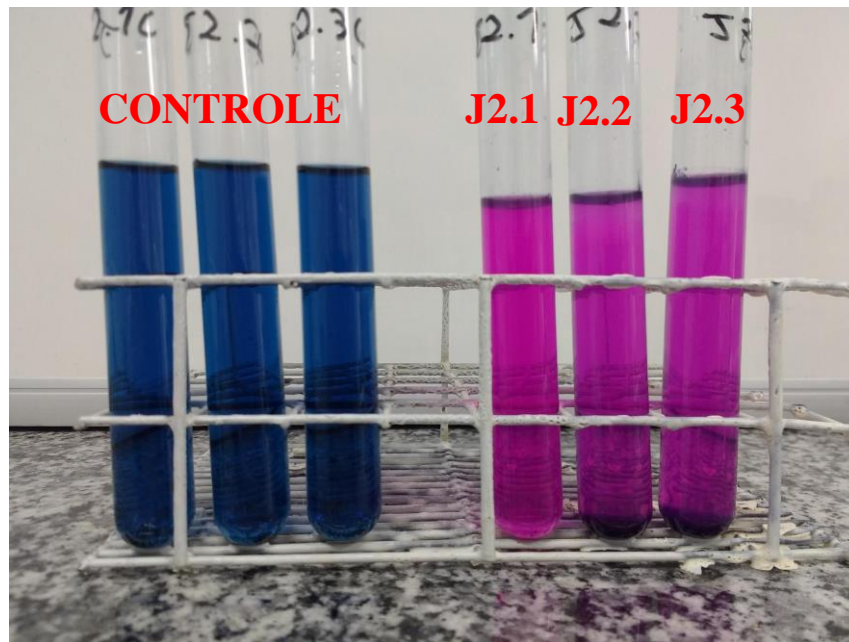


Figura 4. Ensaio de descoloração do corante VJ-B, em T1, 48 horas após o início do experimento, pelos isolados J2, ilustrando a redução do azo corante VJ-B para Leuco VJ-B I pelo isolado J2, indicado pela cor violeta.

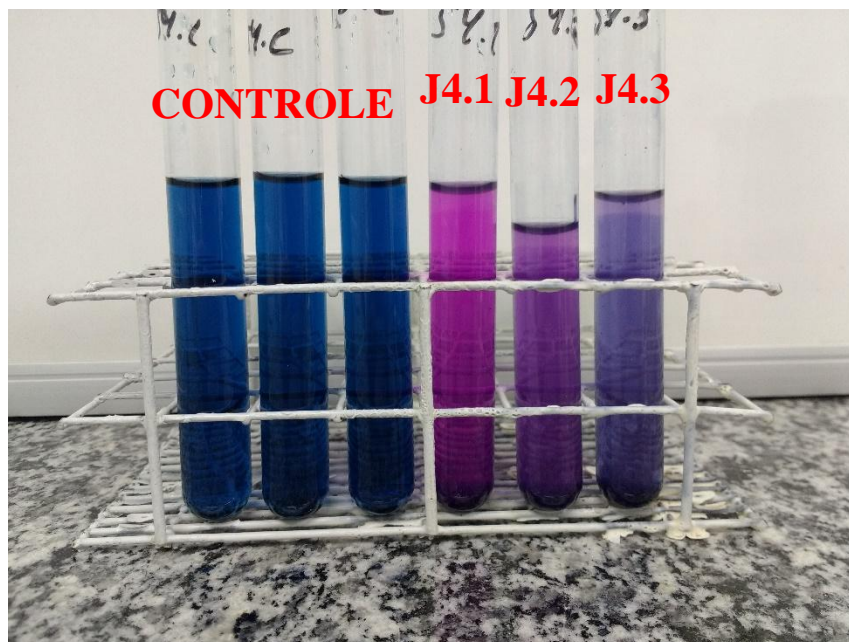


Figura 5. Ensaio de descoloração do azo corante verde janus B, em T1, 48 horas após o início do experimento, ilustrando a redução do azo corantes VJ-B para Leuco VJ-B I pelo isolados J4

O isolado J1, teve pequenas oscilações, na qual apresentou em apenas uma das repetições, a redução de JV-B para Leuco JV-B I (**Figura 7**), as outras duas repetições (J1.1 e J1.2) apresentaram leve mudança de coloração apenas no tempo final de 144 horas após o início

do experimento (**Figura 8**). O isolado J3, apresentou descoloração contínua do corante JV-B até 144 horas após o início do experimento, apresentando redução para Leuco JV-B I somente no tempo final, em apenas uma das repetições.

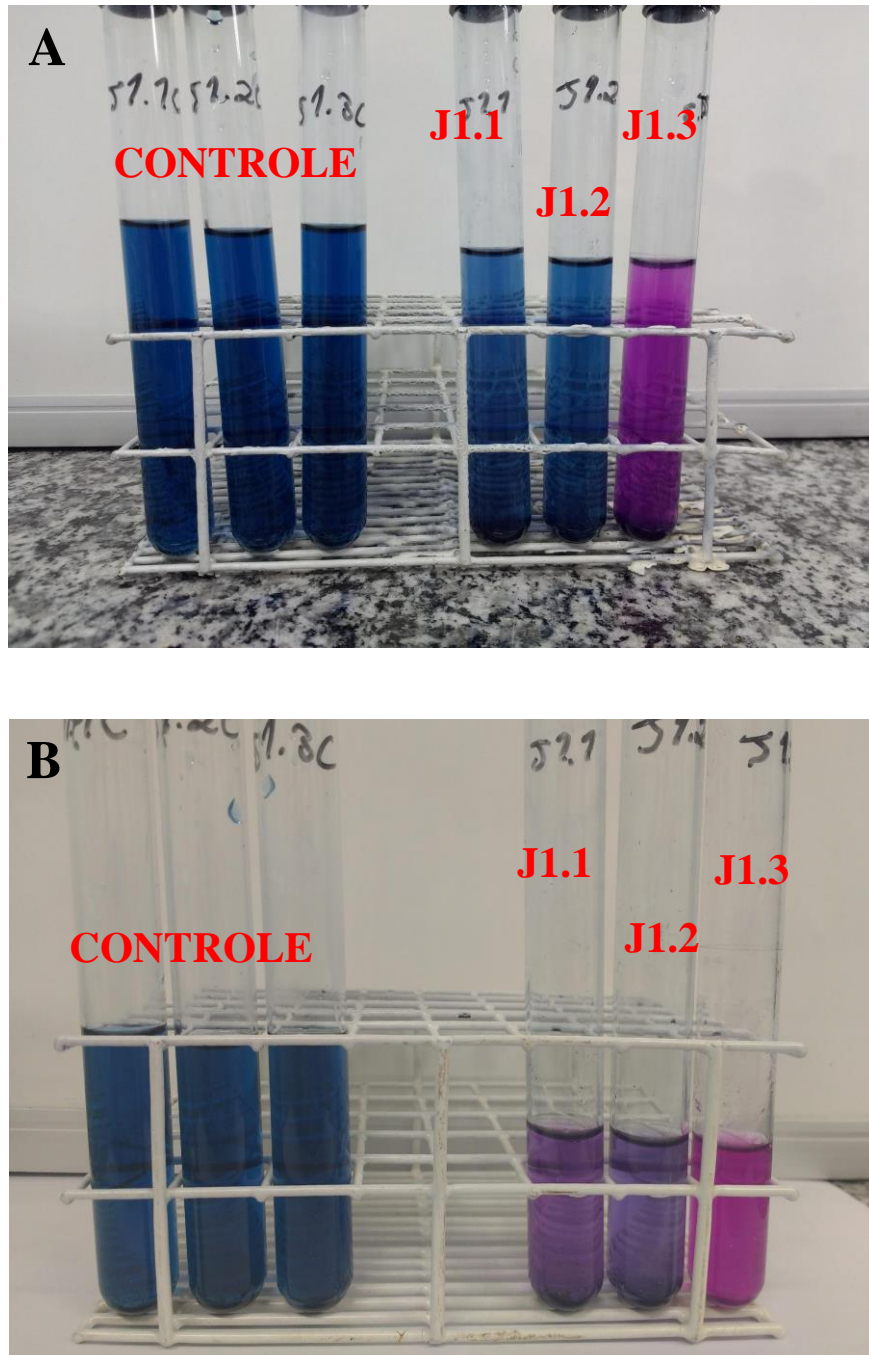


Figura 6. (A) Ensaio de descoloração do azo corante verde janus B, ilustrando a redução do corante VJ-B para Leuco VJ-B I em uma das repetições do isolado J1, no tempo de 48 horas (T1).(B), ilustrando a Redução do corante VJ-B para Leuco VJ-B I em todas as repetições do grupo J1, Ensaio de descoloração do azo corante verde janus B no tempo final de 144 horas (T5).

Poucos estudos envolvendo a biodegradação e descoloração do azo corantes VJ-B foram realizados, então fontes de comparação na literatura são escassas. Como um azo corante, sua degradação e descoloração se mostra mais eficaz em condições de microaerofilia, se comparado em condições de aerobiose (SEESURIYACHAN et al., 2010), pelo fator de oxidação apresentado pelo oxigênio, influenciando na ação das azoredutases (FRANCISCON, 2010). Nestas condições o azo corante é na maioria das vezes reduzido a amins aromáticas, o que deve acontecer antes de ser realmente degradado em condições aeróbicas, por isso para a fase inicial de degradação de azo corantes, ensaios em aerobiose são ineficientes (ALI, 2010; FRANCISCON, 2010).

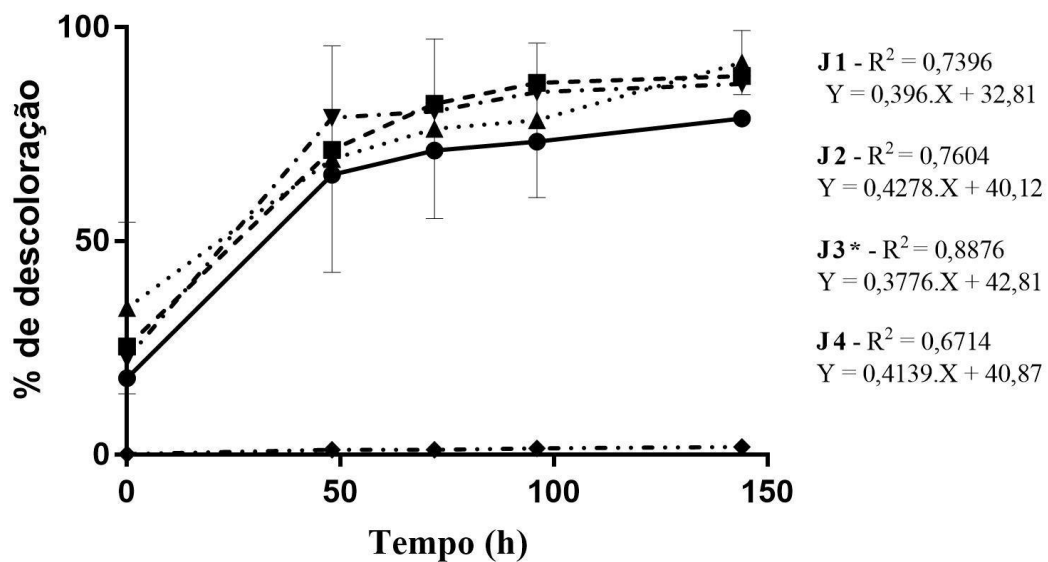
Os dados obtidos indicam que houve uma grande diminuição de cor na maioria das repetições para cada um dos isolados. Se comparado com o controle, houve uma diferença significativa entre as absorbâncias tiradas pelo período de 144 horas, indicando dessa forma que houve descoloração do corante pelas bactérias (**Tabela 4**). A cor púrpura adquirida comprova o processo de redução do corante por um agente redutor segundo Lazarow e Cooperstein (1952), como caso as bactérias testadas no presente trabalho.

A descoloração foi medida em absorbância, por espectrofotometria a 625 e 624 nm, e tiveram a porcentagem calculada seguindo a equação descrita na metodologia (**item 6.7.1**), no entanto, as medições tiveram uma ligeira intervenção, sendo necessária uma alteração no comprimento de onda utilizado, inicialmente a 625nm para o corante VJ-B e 624 para Leuco VJ-B 1, resultante da redução do corante. Pela alteração ser ligeiramente diferente, os resultados não foram afetados de forma significativa. Os quatro isolados, apresentaram grande capacidade de descolorir e reduzir o azo corantes verde janus, descolorindo pelo menos 78,71% (J1) no tempo final. Os isolados J2, J3 e J4, tiveram desempenho final melhor de 91,21%, 91,79 % e 86,75% respectivamente, de descoloração, passando pela fase de Leuco VJ-B I, sendo J3 o isolado que apresentou $R^2 = 0,8876$, tendo 88,76% da variância explicada pelo modelo de regressão linear utilizado (**Figura 9**). Na literatura, estudos envolvendo a descoloração de corantes, tem apresentado valores inferiores a estes para outros azo corantes, identificando um ótimo potencial de descoloração, pelos isolados isoladas.

Tabela 5. Descoloração do corante Alaranjado de metila sem extrato de levedura, medida em absorbância ao longo do tempo de 144 horas

Tempo	Isolados				
	Controle	J1	J2	J3	J4
0 horas	0,524 ± 0,008	0,430 ± 0,015	0,39 ± 0,017	0,343 ± 0,06	0,406 ± 0,002
48 horas	0,508 ± 0,004	0,156 ± 0,053	0,070 ± 0,004	0,156 ± 0,077	0,060 ± 0,002
72 horas	0,525 ± 0,001	0,132 ± 0,045	0,044 ± 0,006	0,124 ± 0,071	0,053 ± 0,005
96 horas	0,521 ± 0,002	0,119 ± 0,039	0,039 ± 0,002	0,095 ± 0,059	0,042 ± 0,002
144 horas	0,514 ± 0,002	0,069 ± 0,017	0,023 ± 0,003	0,042 ± 0,022	0,035 ± 0,002

Os valores obtidos são as médias de três repetições para cada isolado e para o controle DP (±; desvio padrão)



* desvio de zero significante; R^2 coeficiente de determinação

Figura 7. Porcentagem de descoloração do corante VJ-B no período de 144 horas, pelos isolados identificados como J1 (●) sendo esta a que apresentou o menor desempenho descolorindo 78,71% do corante. J2 (■) com descoloração de 91,21%. O isolado J3* (▲) descol descoloriu 91,79% e o isolado J4 (▼) descoloriu 86,75%.

No entanto, parte da descoloração obtida, pode ser efeito não só da capacidade da bactéria de reduzi-la, como também uma combinação com um processo de adsorção do corante pela biomassa de bactérias, processo que em seres vivos é denominado biossorção, este processo também foi observado em estudos envolvendo outros azo corantes, Manu (2002), delineou experimentos envolvendo a biodegradação e descoloração do azo corantes Laranja II

(*Orange II*), e afirmou em seus resultados, que a maior eficiência na remoção de cor no início do experimento, é atribuído ao processo de adsorção, o que pode ser usado como explicação o porquê a redução, na maioria dos casos, para o VJ-B ocorre no mais tardar a partir do 4º ou 5º dia. A ocorrência de adsorção, pode auxiliar na remoção da cor, porém não degrada o corante, pois a molécula inteira é simplesmente agregada a biomassa que adquire a coloração original do corante (SHAW et al, 2013), portanto, em termos de descoloração, a adsorção como um método físico-químico é eficiente, porém em termos de biorremediação, esta técnica não se mostra tão interessante, já que não remove o poluente do ambiente, esta hipótese é reforçada na literatura, em experimentos cuja evento tenha ocorrido de forma semelhante, segundo Portela Vasconcelos (2013). No entanto tanto a capacidade de redução quanto de adsorção, envolvem uma série de fatores, como a própria estrutura molecular do corante, temperatura e pH (FRANSCISCON, 2010).

7.2.2 Alaranjado de Metila

Houve uma descoloração considerável e visível do corante alaranjado de metila (AM) pelas bactérias isoladas, principalmente na presença de extrato de levedura. Para o corante VJ-B, não se adicionou extrato de levedura, pois esse alterava drasticamente a coloração do corante, dessa forma, interferindo nos resultados, pois necessitaria mudança no comprimento de onda utilizado. Na literatura é muito descrito o aumento da eficiência de descoloração na presença de extrato de levedura ou glicose. Franciscon (2010) delineou ensaios de descoloração de 4 azo corantes, e comparou a eficiência de descoloração deles por bactérias, com e sem extrato de levedura na composição do meio, os resultados foram semelhantes ao observado neste experimento, uno qual na presença de extrato de levedura a porcentagem de descoloração foi bem maior. Esta diferença pode ser observada na tabela 5 e 6, na qual é possível ver que realmente houve descoloração, ao comparar as amostras com o controle, principalmente a diferença entre os dois tratamentos, com e sem extrato de levedura.

Tabela 6. Descoloração do corante Alaranjado de metila sem extrato de levedura, medida em absorbância ao longo do tempo de 144 horas

Tempo (h)	Controle	Isolados			
		L1	L2	L3	L4
0	0,631 ± 0,012	0,641 ± 0,027	0,638 ± 0,016	0,627 ± 0,018	0,629 ± 0,015
48	0,642 ± 0,004	0,605 ± 0,006	0,587 ± 0,013	0,585 ± 0,016	0,589 ± 0,019
72	0,641 ± 0,005	0,540 ± 0,014	0,514 ± 0,021	0,531 ± 0,018	0,528 ± 0,014
96	0,636 ± 0,008	0,471 ± 0,021	0,451 ± 0,017	0,465 ± 0,011	0,491 ± 0,024
144	0,640 ± 0,014	0,346 ± 0,041	0,314 ± 0,032	0,339 ± 0,021	0,368 ± 0,018

Os valores obtidos são as médias de três repetições para cada isolado e para o controle DP (±; desvio padrão)

Tabela 7. Descoloração do corante Alaranjado de metila com extrato de levedura, medida em absorbância ao longo do tempo de 144 horas

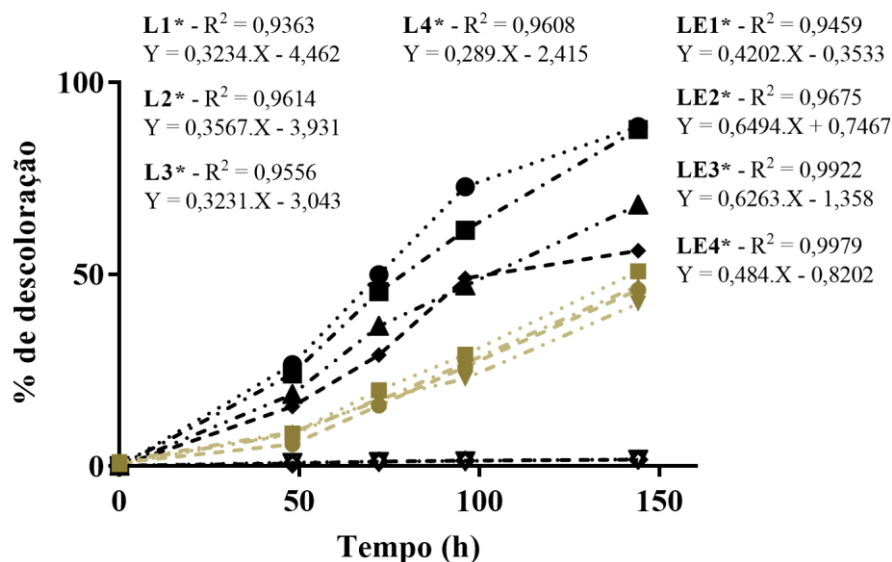
Tempo (h)	Controle	Isolados			
		LE1	LE2	LE3	LE4
0	0,539 ± 0,026	0,569 ± 0,007	0,574 ± 0,007	0,577 ± 0,024	0,599 ± 0,007
48	0,533 ± 0,005	0,451 ± 0,004	0,390 ± 0,006	0,406 ± 0,004	0,433 ± 0,001
72	0,535 ± 0,004	0,380 ± 0,009	0,264 ± 0,015	0,296 ± 0,013	0,342 ± 0,004
96	0,532 ± 0,004	0,315 ± 0,021	0,195 ± 0,011	0,208 ± 0,009	0,286 ± 0,007
144	0,535 ± 0,004	0,189 ± 0,009	0,061 ± 0,004	0,065 ± 0,007	0,169 ± 0,003

Os valores obtidos são as médias de três repetições para cada isolado e para o controle DP (±; desvio padrão)

Um estudo realizado por Parshetti (2010), utilizando *Kocuria rosea* para descolorir o azo corante AM, mostrou resultados positivos em concentrações, pH e temperatura semelhantes aos utilizados neste estudo, com descoloração de até 100% do corante, no presente estudo as bactérias utilizadas, apresentaram descoloração inferior ao estudo de Parshetti com descoloração máxima de 88.72% (LE2) na presença de extrato de levedura, no entanto, o autor em seu trabalho adicionou glicose ao ensaio para que a descoloração tivesse um melhor resultado ao contrário do presente estudo, dessa forma pode-se supor, que as bactérias isoladas possuem um grande potencial se comparadas a *Kocuria rosea*, já que estas tiveram um bom desempenho utilizando apenas o corante como fonte de carbono. No estudo Parshetti afirmou que a presença de extrato de levedura no ensaio de descoloração, fez com que aumentasse a porcentagem de descoloração do corante. Na figura 10 é possível observar a comparação quanto a porcentagem de descoloração entre os isolados em duas condições diferentes, ensaios contendo ou não, o extrato de levedura. Foi realizado uma regressão linear para avaliação da

variância obtida, neste caso todos obtiveram um desvio de zero significativo, com R^2 superior a 0,90 para todos os isolados.

Para os dados obtidos no presente trabalho, foi realizado uma análise ANOVA em fatorial, para averiguar se houve diferença estatística entre os isolados e as duas condições, a fim de se averiguar se a presença do extrato de levedura realmente influencia em algum dos processos, em seguida realizou-se um teste Tukey que comparou cada uma das amostras indicando que houve diferença estatística de porcentagem de descoloração nas duas condições e diferença estatística entre os isolados na presença de extrato de levedura (Tabela 7), comprovando estatisticamente que a presença de extrato de levedura no ensaio, influenciou significativamente o processo de descoloração do corante AM.



* desvio de zero significativo; R^2 coeficiente de determinação

Figura 8. Comparação das porcentagens de descoloração corante alaranjado de metila entre os isolados, em dois tratamentos diferentes, com e sem extrato de levedura. No tratamento sem extrato de levedura, L1 (●), L2 (■), L3 (▲) e L4 (▼), descoloriram respectivamente 45.93%, 50.83%, 47.03% e 42.39%. Já os mesmos isolados LE1 (◆), LE2 (●), LE3 (■) e LE4 (▲) na presença de extrato de levedura, descoloriram 64.05%, 88.97%, 87.72% e 68.03% respectivamente. Em afirmação os controles abióticos CL (▼) e CE (◆) não apresentaram descoloração.

Tabela 8. % de descoloração, no tempo final de 144 horas do corante AM

Isolado	% de descoloração	
	Sem EXL	Com EXL
L1	45,93Aa	64,05Ab
L2	50,83Ba	88,97Aa
L3	47,03Ba	87,72Aa
L4	42,39Ba	68,03Ab

% - Porcentagem; EXL – Extrato de levedura; médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si; médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si

Como observado, os isolados apresentaram uma grande capacidade de descoloração do alaranjado de metila, visto que esse monoazo na literatura é considerado um corante difícil de descolorir e degradar. No presente estudo, a única fonte de carbono utilizada foi o próprio corante, ao contrário de estudos que geralmente acrescenta-se glicose ou outro açúcar como fonte de carbono, o que aumenta a taxa de descoloração. Dessa forma, os resultados obtidos neste experimento com a utilização de extrato de levedura foram satisfatórios, a descoloração dos isolados L2 e L3 foi quase completa no tempo final de 144 horas com 88,97% e 68,03%, sendo visualmente observada nas figuras 11 e 12, os mesmos isolados apresentaram descoloração de 50,83% e 47,03% respectivamente sem a presença de extrato de levedura. Os isolados L1 e L4 apesar de também descoloração satisfatória 64,05% e 68,03% respectivamente, foram visivelmente inferiores as outras citadas (**Figuras 13 e 14**), as mesmas em um ensaio sem extrato de levedura apresentaram descoloração inferior de 45,93% e 42,39%, deixando nítido o diferencial que a presença do extrato de levedura causa no processo de descoloração. Do mesmo modo como foi realizado o ensaio de descoloração do corante VJ-B, este foi realizado em condição estática de microaerofilia, considerado na literatura como a melhor condição pelo qual os corantes são descoloridos biologicamente, dado a competição entre oxigênio e as azoredutases pelos carreadores de elétrons, dessa forma deve-se evitar condições de agitação que proporcione um aumento na concentração de oxigênio no meio (SHAH et al, 2013; YAN et al, 2004).

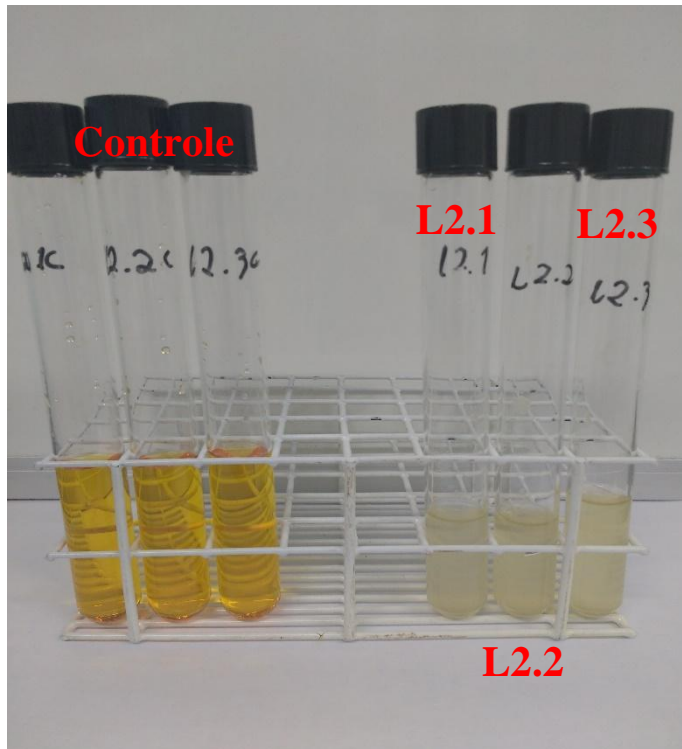


Figura 9. Descoloração do corante AM, pelo isolado L2 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.

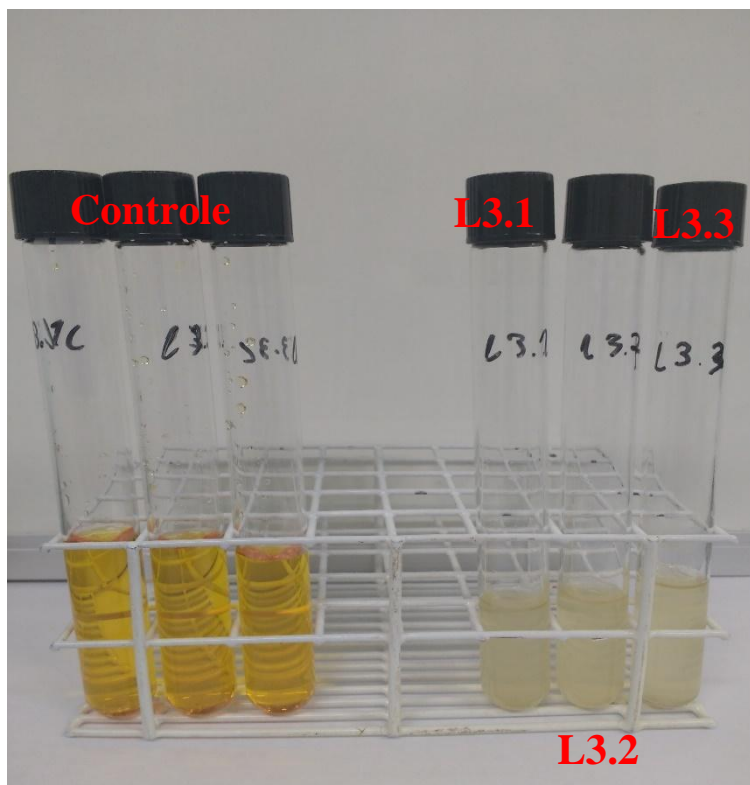


Figura 10. Descoloração do corante AM, pelo isolado L3 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.

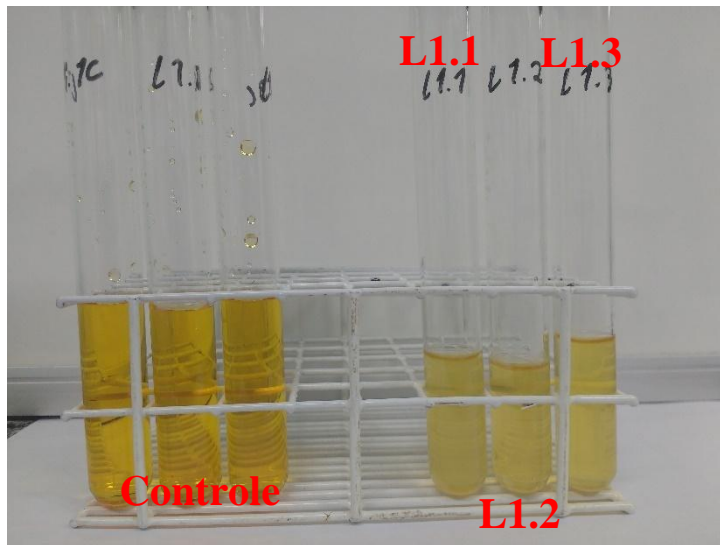


Figura 11. Descoloração do corante AM, pelo isolado L1 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.

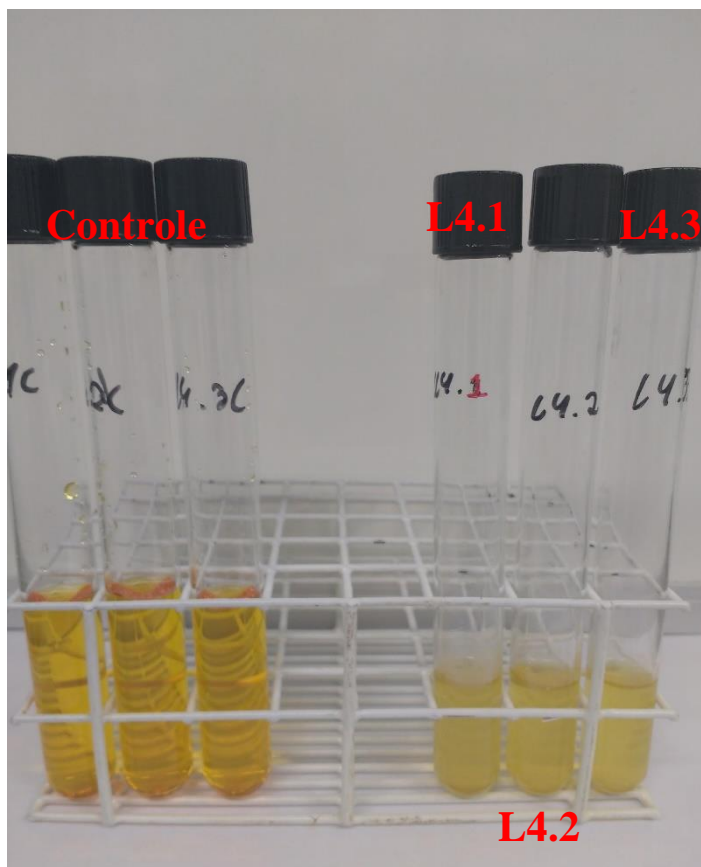


Figura 12. Descoloração do corante AM, pelo isolado L4 em comparação com as amostras controle, no tempo final de 144 horas após o início do ensaio, em condições de microaerofilia.

Como no ensaio com o corante VJ-B, parte da descoloração obtida com o corante AM, pode ser devido a capacidade das bactérias de adsorverem o corante em sua célula (SHAH, et al. 2013), no entanto, ao contrário do primeiro, este não apresentou biomassa da coloração do corante. Quando ocorre o processo de adsorção do corante pelas bactérias, estas adquirem a coloração original do corante, evento que não ocorreu neste caso, portanto é possível afirmar que ocorreu apenas uma pequena adsorção do corante pelas bactérias, já que não se pode descartar completamente a possibilidade de não ter ocorrido, dessa forma a maior parte da descoloração ocorreu por mecanismos de degradação no caso a redução do corante, provavelmente através das azoredutases produzidas pelas bactérias (não foi quantificada).

7.2 DQO

Apesar dos bons resultados quanto a descoloração do corante VJ-B pelos isolados, a redução de DQO não apresentou resultados tão satisfatórios, como pode ser observado na figura 15, não houve grande diminuição da concentração de O_2 nas amostras tratadas com micro-organismos, ou seja, pouco O_2 foi consumido pelas bactérias, indicando talvez que, o mecanismo de adsorção do corante tenha sido mais utilizado pelas bactérias do que o mecanismo de redução do composto, pois o primeiro não utiliza do metabolismo do micro-organismo para que ocorra a descoloração. Shah e colaboradores (2013) em seu experimento, descreveu um evento semelhante, ao ter um bom desempenho de descoloração do corante alaranjado de metila por bactérias do gênero *Pseudomonas* spp., porém apresentando uma redução de DQO baixa, afirmando que em condições de agitação essa redução foi mais alta.

Os isolados apresentaram redução de DQO desproporcional a descoloração do corante, com o isolado J1 reduzindo apenas 6,99% da demanda química de oxigênio, seguidos dos isolados J3, J2 e J4 reduzindo respectivos 9,38%, 15,53% e 18,61%. Os valores exatos da quantidade da concentração de O_2 reduzido em cada amostra pode ser observado na **tabela 9**, no qual é comparado às concentrações iniciais e finais, tal quanto a porcentagem de redução e descoloração do corante, o teste Tukey realizado não apresentou diferenças significativas entre os isolados quanto a redução de DQO.

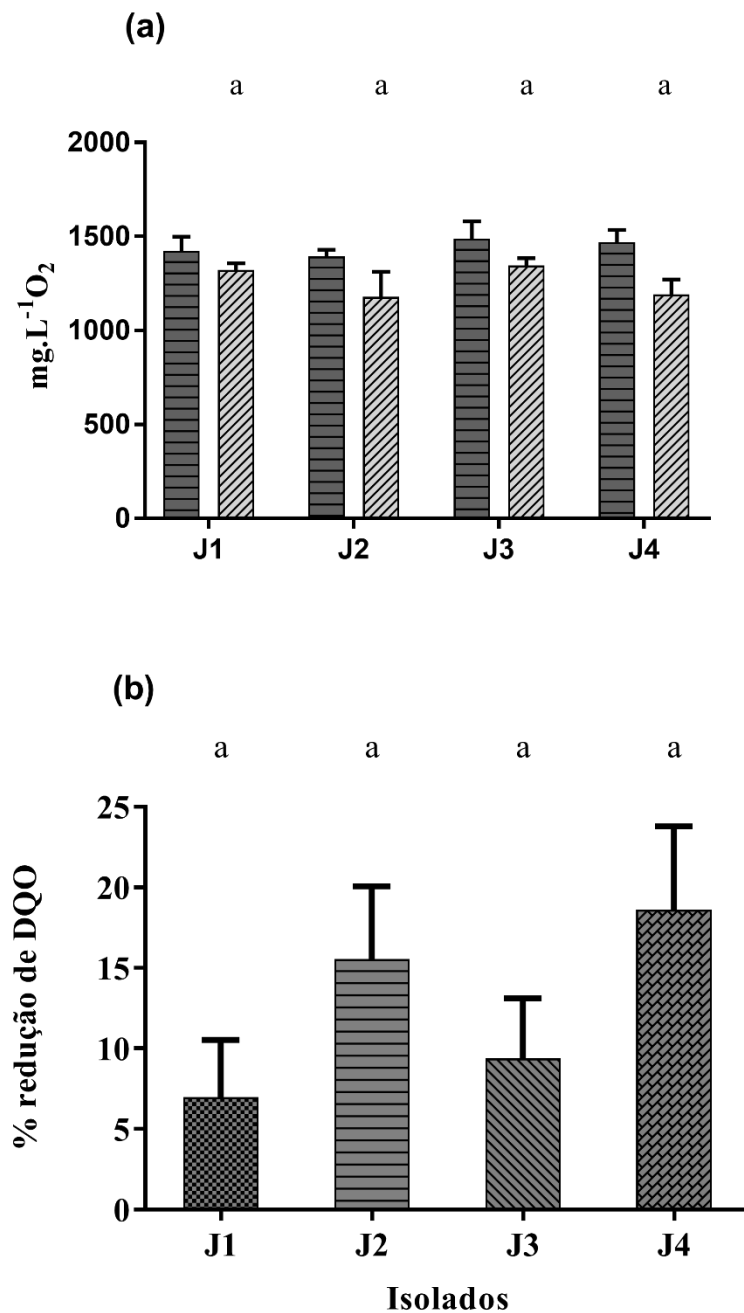


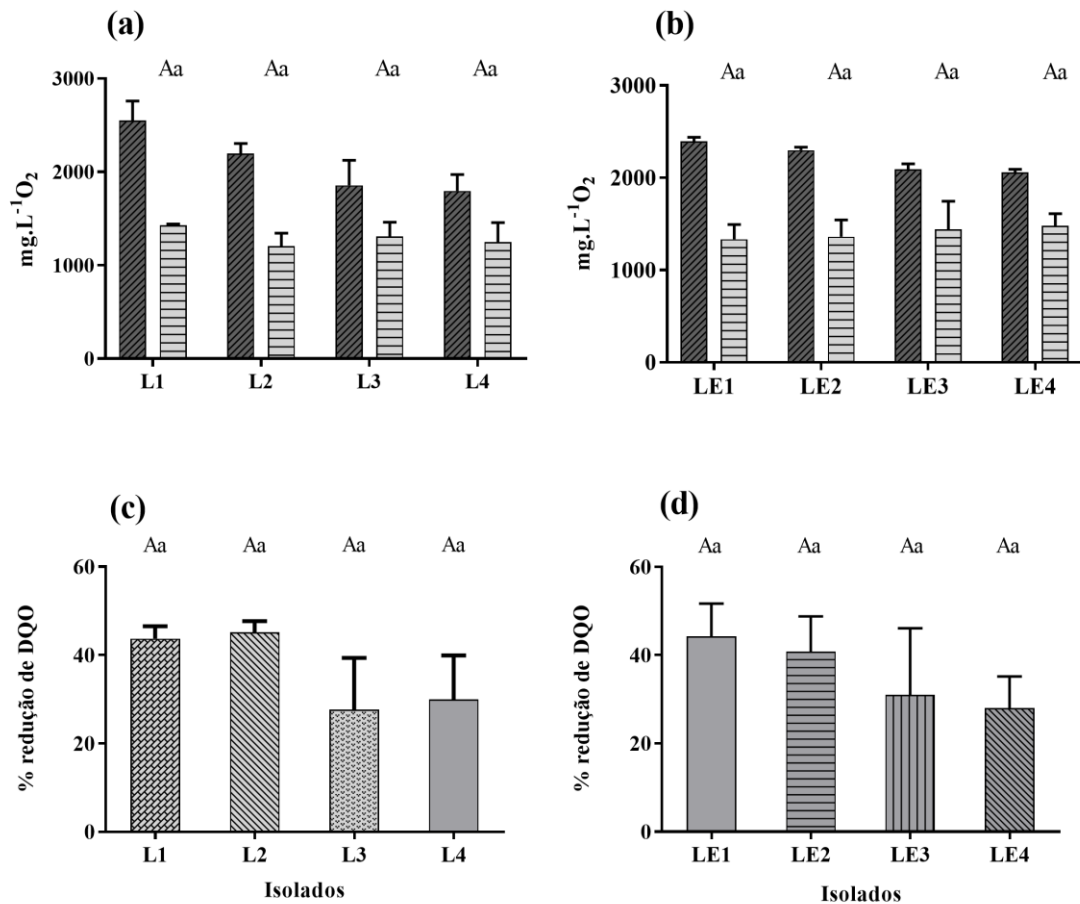
Figura 13. Redução de DQO, realizado pelos isolados no tempo final de 144 horas do ensaio de descoloração, em (a) apresentado uma comparação entre a concentração inicial (■) e final (▨) de O₂ nas amostras. Em (b) dado em porcentagem de redução, sendo o isolado J1 que apresentou a menor porcentagem de redução com 6,99%, seguidos do isolados J3, J2 e J4 com respectivos 9,38%, 15,53% e 18,61%. Letras minúsculas iguais não se diferem estatisticamente quanto ao tratamento (isolado)

Tabela 9. Relação entre a redução de DQO e descoloração do corante VJ-B

Isolados	DQO mg. L ⁻¹			% descoloração
	Inicial	Final	% redução	
J1	1424,83	1322,33	6,99a	78,71a
J2	1394	1179	15,53a	91,21a
J3	1489	1345,66	9,38a	91,79a
J4	1469,66	1192,33	18,61a	86,75a

Teste Tukey: letras minúsculas iguais não se diferem entre si estatisticamente.

Para o corante AM, a redução de DQO foi melhor que o do corante VJ-B, chegando a até 45,14% (isolado L2) de redução da DQO, reduzindo quase 1000 mg. L⁻¹ O₂, resultado superior a encontrados na literatura. Shah et al. (2013) delineou ensaios de descoloração do corante AM por cepas do gênero *Pseudomonas* spp., no qual o máximo obtido de redução de DQO em condição estática foi de 25%, com descoloração de 86%, dessa forma confirmando que a redução de DQO é um evento independente da descoloração. Neste caso a presença do extrato de levedura no ensaio não fez diferença, já que na redução para os dois tratamentos não houve grandes variações, para isso foi realizada análise de variância ANOVA por fatorial (G e A fixos), que demonstrou que com 100% de confiabilidade não houve diferença estatística entre os ensaios nas duas condições, portanto a presença do extrato não interfere no processo de remoção da DQO. No entanto, o mesmo teste afirmou que a presença do extrato gerou diferenças significativas para a descoloração do corante AM. Para o tratamento sem extrato de levedura, os isolados L1, L3 e L4 reduziram respectivamente 43,74%, 27,63% e 29,96%. A diferença nítida da concentração de O₂ no ensaio antes e após o experimento podem ser observadas na **Figura 16a e b**, sem e com extrato de levedura respectivamente. Na presença do extrato de levedura os valores redução permaneceram na mesma faixa, no entanto L1 que antes tinha apresentado a menor porcentagem de redução, neste tratamento demonstrou o melhor resultado 44,21%, seguido por L2, L3 e L4 que reduziram aproximadamente 40,78%, 31,01% e 27,97% da DQO (**Figura 16c e d**).



Teste Tukey:

Figura 14. Redução de DQO, realizada pelos isolados no tempo final de 144 horas do ensaio de descoloração do corante AM, em (a) e (b) apresentado uma comparação entre a concentração de O₂ inicial (▨) e final (▤), sendo o primeiro representando o tratamento sem extrato de levedura. Em (c) e (d) os dados são apresentados em porcentagem de redução, sendo o primeiro para o tratamento sem o extrato, onde L2 apresentou redução de 45,14% da DQO, seguidos dos isolados L1, L4 e L3, com redução de 43,74%, 29,96% e 27,63% respectivamente. No segundo, contendo extrato de levedura, o isolado L1 apresentou melhor desempenho, reduzindo 44,21%, seguido pelos isolados L2, L3 e L4, que reduziram respectivamente 40,78%, 31,01% e 27,97%. Letras maiúsculas iguais não se diferem estatisticamente quando as condições; letras minúsculas iguais não se diferem quanto ao tratamento (isolado).

Jain et al. (2012) afirmam em seu estudo que a descoloração não é proporcional ao crescimento bacteriano no ensaio, de forma adversa, a redução da DQO no meio é diretamente proporcional ao crescimento bacteriano, por isso que em um estudo realizado por Shah e colaboradores (2013) os ensaios sob agitação tiveram uma redução de DQO superior, com densidade celular maior que os ensaios sob condições estatísticas, embora a descoloração tenha sido inferior. No presente trabalho, os resultados apresentados para ambos os corantes foram

semelhantes, embora o ensaio sob agitação não tenha sido realizado, pode-se observar a diferença, entre os valores de O₂ dissolvido no meio antes e após o ensaio de descoloração sob condição estática, principalmente para o corante VJ. Na **tabela 10** foi estabelecido uma comparação entre a porcentagem de redução de DQO para as duas condições, e a porcentagem de descoloração do corante AM, também para as duas condições, para que a comparação fosse estatisticamente satisfatória, foi realizado o teste Tukey entre os isolados sob as duas condições, indicando que não houve diferença estatística para a redução de DQO, indicado pelas letras maiúsculas. Dessa forma, para a redução de DQO a presença do extrato de levedura foi indiferente, mesmo que nesta condição a descoloração tenha sido maior, sendo dessa forma dois eventos independentes.

Tabela 10. Relação entre redução de DQO e descoloração do corante AM, sob dois tratamentos

	% Redução DQO		% Descoloração	
	S. EX	C. EX	S. EX	C. EX
L1	43,73Aa	44,21Aa	45,93Aa	64,05Ab
L2	45,14Aa	40,78Aa	50,83Ba	88,97Aa
L3	27,63Aa	31,01Aa	47,03Ba	87,72Aa
L4	29,96Aa	27,97Aa	42,39Ba	68,03Ab

S. EX – Sem extrato de levedura; C. EX – Com extrato de levedura; Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si; Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si

7.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MELHORES ISOLADOS PARA AMBOS OS CORANTES

Para os isolados que apresentaram melhor desempenho para descolorir os corantes, e reduzir a DQO das amostras, foi feito o sequenciamento do gene 16S rRNA, para identificação quanto ao gênero, e espécie se possível, dado a qualidade do material genético extraído e amplificado por PCR. Foram construídas árvores filogenéticas (**Figuras 15 a 18**) nas quais é possível observar que todos os isolados sequenciados, sendo ele J2 e J3 para o corante VJ-B e L1 e L2 para o corante AM, foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, o que já era esperado a partir dos resultados dos testes bioquímicos, (**Tabela 4**), apesar desses resultados indicarem a possibilidade de uma gama de gêneros, o fato do gênero *Pseudomonas* ser encontrado com frequência na literatura, quanto ao seu potencial de descoloração de azo

corantes, supôs se que pertenciam a este gênero, o que foi confirmado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA . O isolado J3 teve um pareamento muito próximo a *Pseudomonas mendocina* com 96% de semelhança e 90% de cobertura identificado pelo alinhamento local do NCBI, dessa forma existe a chance que possivelmente este isolado possa pertencer a essa espécie, enquanto que no RDP data base, o resultado que retornou foi de *Pseudomonas aeruginosa*, com apenas 82% de semelhança. Os outros isolados não obtiveram um pareamento tão específico, apesar de existir semelhanças de até 98% no banco de dados do NCBI, como os isolados L1 e L2 que apresentaram essa semelhança para *Pseudomonas lutea* e *libanensis* (**Tabela 11**), porém não houve pareamento na árvore filogenética, portanto é possível observar apenas proximidades quanto ao *bootstrap*.

Tabela 11. Resultados do melhor retorno, obtidos através do alinhamento local pelo Blastn do NCBI, para os isolados que tiveram o gene 16S rRNA sequenciado

Isolado	NCBI				
	Espécie	Query (%)	e-value	Ident (%)	Max score
J2	<i>Pseudomonas putida</i>	99	0.0	97	1116
J3	<i>Pseudomonas medocina</i>	90	0.0	96	970
L1	<i>Pseudomonas lutea</i>	99	0.0	98	2549
L2	<i>Pseudomonas libanensis</i>	99	0.0	98	2543

Os resultados que retornaram para os dois alinhamentos locais, utilizando os dois bancos de dados, apresentaram resultados divergentes, a nível de espécie, concordando apenas em nível de gênero, como observado nas tabelas 11 e 12, nos quais obteve-se os melhores resultados que retornaram da análise, para cada banco de dados. Após possível identificação, as sequências foram depositadas no GenBank com *Accession number* KY794776; KY795958, KY795961 e KY795959, respectivamente para os isolados L1, L2, J2 e J3, com definição de *Pseudomonas sp.* strain L1-FCBA-UFGD para o isolado L1; *Pseudomonas sp.* strain L2-FCBA-UFGD para o isolado L2; *Pseudomonas putida* strain J2 para o isolado J2 e *Pseudomonas mendocina* strain J3 para o isolado J3. A definição dada após fazer o alinhamento múltiplo entre os melhores resultados do alinhamento local de cada banco de dados. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos pelo alinhamento múltiplo, adotou-se os resultados do NCBI para a construção das arvores filogenéticas e depósito das sequências no GenBank.

Tabela 12. Resultados dos melhores retornos, obtidos através do alinhamento local realizado pelo banco de dados RDP-database, para os isolados que tiveram o gene 16S rRNA sequenciado

Isolados	Espécie	RPD		
		<i>S_ab Score</i>	<i>Ident (%)</i>	<i>UCO</i>
J2	<i>Pseudomonas putida</i>	0,87	nc	1391
J3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,82	nc	1459
L1	<i>Pseudomonas sp.</i>	0,99	nc	1234
L2	<i>Pseudomonas sp.</i>	0,99	nc	1274

nc: não calculado; UCO: unique common oligomers

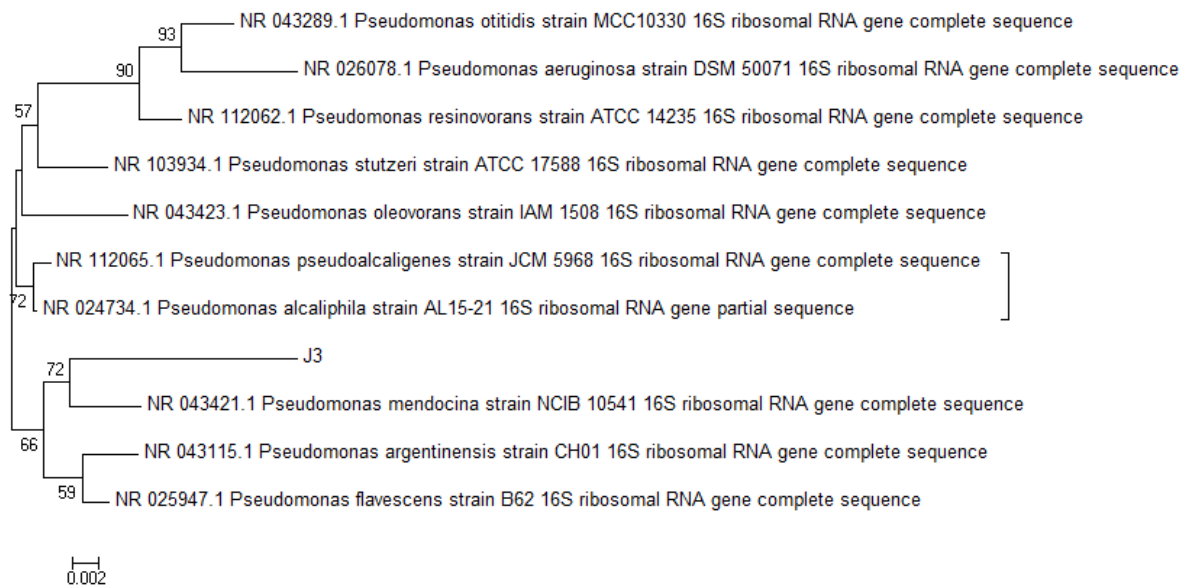


Figura 15. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A árvore ideal com a soma do comprimento da ramificação = 0.08224968 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais as taxas associadas se agruparam no teste de *bootstrap* (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 631 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016).

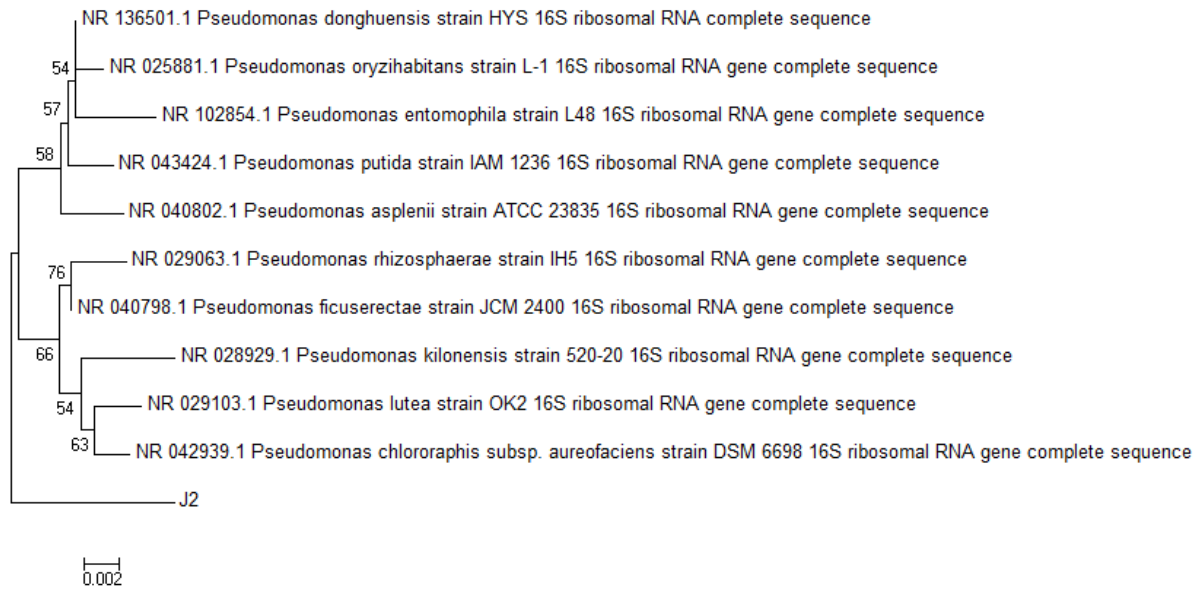


Figura 16. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A árvore ideal com a soma do comprimento da ramificação = 0.04347957 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais as taxas associadas se agruparam no teste de *bootstrap* (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 658 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016).

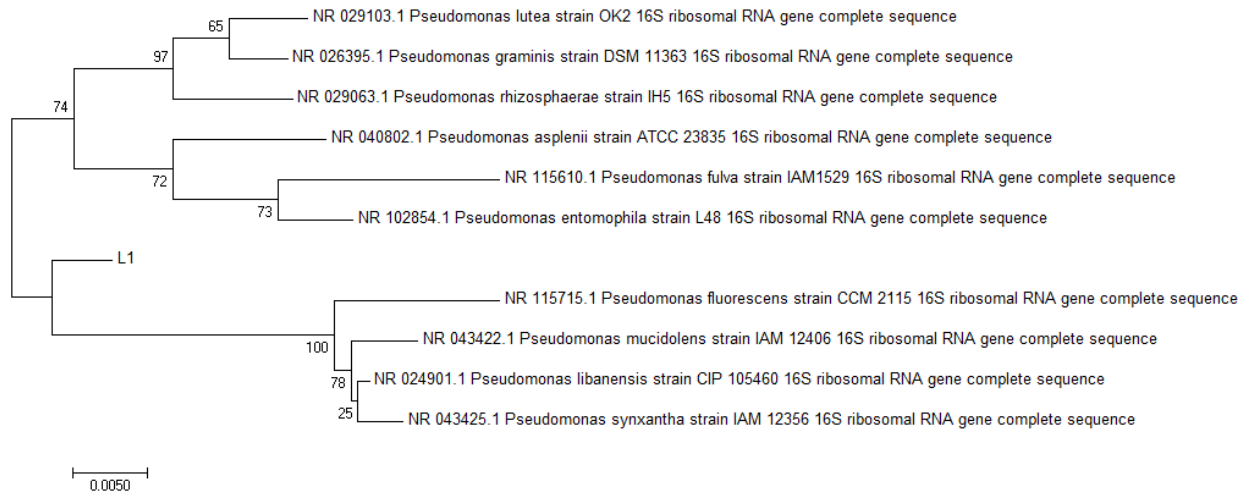


Figura 17. A história evolutiva foi inferida usando o método de *Maxima Verossimilhança* baseado no modelo Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980). A árvore com maior probabilidade de log (-3095.2193) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais as taxas associadas se agrupam é mostrada ao lado dos ramos. A(s) árvore(s) inicial(is) para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pairwise estimadas usando a abordagem de Máxima Veracidade Composta (MCL) e selecionando a topologia com valor de verossimilhança superior. Utilizou-se uma distribuição Gamma discreta para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre sítios (5 categorias (+ G, parâmetro = 0,0500)). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramo medidos no número de substituições por local. A análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos. Houve um total de 1531 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016).

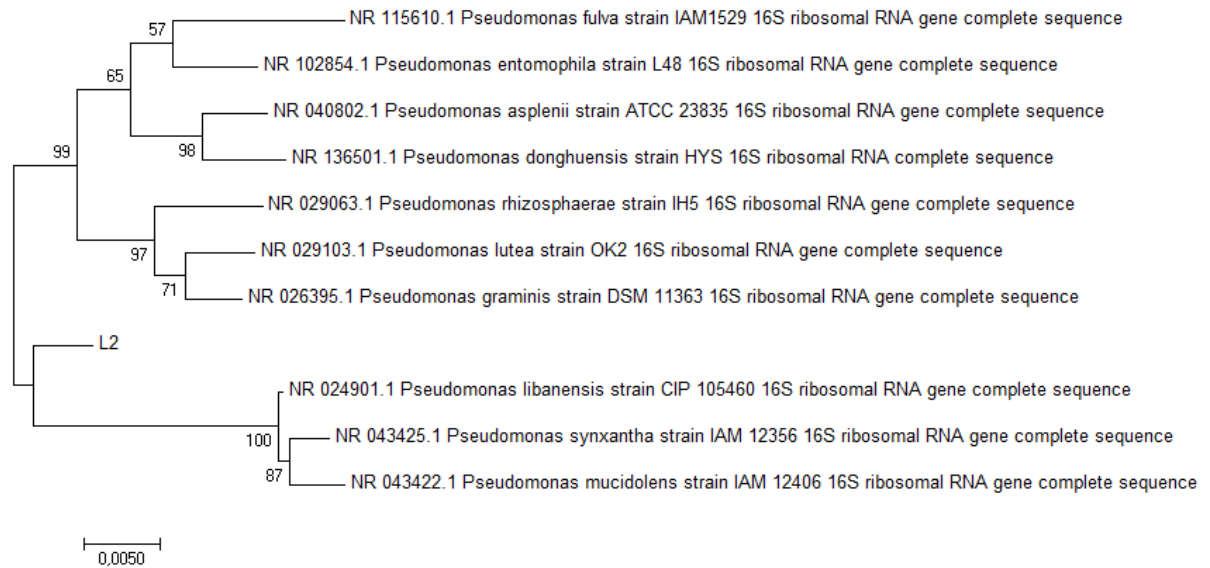


Figura 18. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU, NEI, 1987). A árvore ideal com a soma do comprimento da ramificação = 0.09346798 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas nas quais as taxas associadas se agruparam no teste de *bootstrap* (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore é desenhada à escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2 parâmetros (KIMURA, 1980) e estão nas unidades do número de substituições de bases por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11 sequências de nucleotídeos. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 1450 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7 (KUMAR et al., 2016).

Todos os isolados que tiveram o gene 16S rRNA sequenciados foram identificados como bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Diversas espécies pertencentes a esse gênero, tem sido descritas na literatura como ótimas degradadoras de corante, utilizando-os como única fonte de carbono. Vilar Junior e colaboradores (2015), realizaram experimentos de descoloração do azo corante Black B, utilizando cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, no qual a agitação teve um efeito positivo para a descoloração do corante, isso implica que o processo de descoloração dos azo corantes, dependem de uma série de fatores, dentre eles a própria molécula do corante ou até mesmo o metabolismo do micro-organismo, já que, é encontrado na literatura informações sobre a implicância do oxigênio do processo de descoloração.

Outro estudo realizado por Silveira e colaboradores (2009), testou a capacidade de quatro espécies diferentes de *Pseudomonas sp.* de descolorir 14 tipos diferentes de corantes sintéticos, dentre eles o alaranjado de metila, utilizados como única fonte de carbono, utilizado neste estudo, dentre as espécies nota-se a presença de *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas*

putida, que apresentaram grande semelhança no alinhamento local realizado para os isolados selecionados no presente estudo. Neste estudo as cepas de *P. aeruginosa* e *P. putida* apresentaram grande capacidade de descoloração do corante alaranjado de metila, com um intervalo de 24 horas até o início do processo, da mesma forma como foi observado no presente trabalho, após esse período *P. aeruginosa* apresentou um pico de descoloração alto, enquanto que a *P. putida* demonstrou um período de latência de mais 12 horas com acúmulo de biomassa no pellet.

Poucas bactérias foram descritas como capazes de crescer em meio utilizando corantes como única fonte de carbono, clivando as ligações $-N=N-$ de forma redutora e utilizando as aminas como fonte de carbono e energia para o crescimento. Os exemplos de bactérias com tais características são *Xenophilus azovorans* KF 46 (anteriormente *Pseudomonas* sp. KF46) e *Pigmentiphaga kullae* K24 (anteriormente *Pseudomonas* sp. K24), capazes de reduzir alguns corantes sintéticos em condições aeróbias, em carboxy-orange I e carboxy-orange II respectivamente, ambos já foram caracterizados como bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (ZIMMERMANN et al. 1982, KULLA et al., 1983). Além dessas *Pseudomonas* sp. PR41-1, também apresentou capacidade de crescer em meio utilizando o próprio corante como fonte de carbono em um estudo realizado por Sugiura et al (1999), da mesma forma que o presente trabalho, cujas bactérias isoladas identificadas como gênero *Pseudomonas* também apresentaram a capacidade de utilizar os corantes como fonte de carbono.

8. CONCLUSÃO

As bactérias isoladas do efluente da indústria de papel e celulose Eldorado (Três Lagoas-MS), apresentaram uma alta capacidade de descoloração dos azo corantes verde janus B e alaranjado de metila, apresentando resultados iguais ou superiores aos encontrados na literatura em condições de temperatura e pH semelhantes, provando em partes a hipótese, que dada a semelhança entre as estruturas de compostos lignolíticos e corantes sintéticos, essas bactérias sejam capazes de utilizar o corante como fonte de carbono.

A presença do extrato de levedura provou ter influência positiva para a descoloração do corante alaranjado de metila, aumentando a descoloração em cerca de 30%, ao mesmo tempo não teve interferência alguma para a redução da DQO, comprovando que a descoloração e a redução de DQO são eventos independentes, ou seja, parte da descoloração de ambos os corantes pode ser causada por adsorção do corante ou até mesmo uma pequena degradação, já que por mínima que seja, houve uma redução da DQO.

Pela identificação do gene 16S rRNA, os isolados que apresentaram melhor desempenho foram identificados, como pertencentes ao gênero *Pseudomonas sp.* Dessa forma a hipótese H0 foi descartada, e adotou-se a hipótese H1, onde pelo menos um dos isolados apresentou capacidade de descolorir azo corantes.

Estudos mais aprofundados seriam necessários para averiguar a real capacidade de redução dessas bactérias, como testes qualitativos e quantitativos de amins aromáticas, ensaios sob aerobiose e teste de toxicidade, que não foram realizados por falta de tempo e equipamentos, porém que poderão ser realizados em trabalhos futuros.

9. Referências

- ABIQUIM - Associação Brasileira da Indústria Química e Produtos Derivados. ,1997. Anuário da Indústria Química.
- ADEDAYO, O. et al. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 545-550, 2004.
- AHUJA, V. et al. Study of the sensitising potential of various textile dyes using a biphasic murine local lymph node assay. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 9, p. 709-718, 2010.
- AISLABIE, J. M.; RICHARDS, N. K.; BOUL, H. L. Microbial degradation of DDT and its residues—a review. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 40, n. 2, p. 269-282, 1997.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 213, n. 1-4, p. 251-273, 2010.
- AMARAL, F. M. **Remoção de corantes azo em sistema de reator anaeróbio/aeróbio e em reator uasb micro-aerado**. 101 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- ANNUAR, M. S. M. et al. Kinetics and energetics of azo dye decolorization by *Pycnoporus sanguineus*. **Water, air, and soil pollution**, v. 202, n. 1-4, p. 179-188, 2009.
- AYED, L. et al. Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. **Desalination**, v. 274, n. 1, p. 272-277, 2011.
- BAFANA, A. et al. Biological decolourization of CI Direct Black 38 by *E. gallinarum*. **Journal of hazardous materials**, v. 157, n. 1, p. 187-193, 2008.
- BAFANA, A; DEVI, S.S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, n. NA, p. 350-371, 2011.
- BARRETO, M. Degradação de espécies de relevância ambiental por processos oxidativos avançados, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Paraná, Curitiba, 2001.
- BASHA, C. A. et al. Degradation studies for textile reactive dye by combined electrochemical , microbial and photocatalytic methods. **Separation and Purification Technology**, v. 79, n. 3, p. 303-309, 2011.
- BENSON, D. R. et al. Amplification of 16S rRNA genes from Frankia strains in root nodules of *Ceanothus griseus*, *Coriaria arborea*, *Coriaria plumosa*, *Discaria toumatou*, and *Purshia tridentata*. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2904-2909, 1996.
- BILLINGS, R.M., DEHAAS, G.G., 1971. Pollution control in the pulp and paper industry. In: Lund, H.F. (Ed.), *Industrial Pollution Control Handbook*. McGraw-Hill, New York, pp. 18.1-18.28.
- BONATTO, F. A.; BREVE, H. A. M.; TEJADA, E. C. S. Comparação de protocolos de extração de dna nas bactérias *e. coli* e *pseudomonas* spp. **Atas de Ciências da Saúde** (ISSN

2448-3753), v. 2, n.1, 2014.

CHEN, K. et al. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 57-68, 2003.

CHEQUER, F. M. D. et al. The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, n. 1, p. 83-86, 2009.

CHEQUER, F. M. D.; DORTA, D.J.; DE OLIVEIRA, D.P. **Azo dyes and their metabolites: does the discharge of the azo dye into water bodies represent human and ecological risks?** INTECH Open Access Publisher, 2011.

CHEQUER, F. M. D. et al. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2054-2063, 2011.

CHINWETKITVANICH, S.; TUNTOOLVEST, M.; PANSWAD, T. Anaerobic decolorization of reactive dyebath effluents by a two-stage UASB system with tapioca as a co-substrate. **Water Research**, v. 34, n. 8, p. 2223-2232, 2000.

CHUNG, K.T.; STEVENS, S. Edward. Degradation azo dyes by environmental microorganisms and helminths. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2121-2132, 1993.

CHUNG, K. T. Mutagenicity and carcinogenicity of aromatic amines metabolically produced from azo dyes. **Journal of Environmental Science & Health Part C**, v. 18, n. 1, p. 51-74, 2000.

CLARKE, E. A.; ANLIKER, R. Organic dyes and pigments. In: **Anthropogenic compounds**. Springer Berlin Heidelberg, 1980. p. 181-215.

COUTO, S.R. Dye removal by immobilised fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 227-235, 2009.

CRIPPS, C.; BUMPUS, J. A.; AUST, S. D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1114-1118, 1990.

DAWKAR, V. V. et al. Effect of inducers on the decolorization and biodegradation of textile azo dye Navy blue 2GL by *Bacillus* sp. VUS. **Biodegradation**, v. 20, n. 6, p. 777-787, 2009.

DANESHVAR, N. et al. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. **Bioresource technology**, v. 98, n. 6, p. 1176-1182, 2007.

DE ARAGÃO UMBUZEIRO, G. et al. Mutagenicity evaluation of the commercial product CI Disperse Blue 291 using different protocols of the Salmonella assay. **Food and chemical toxicology**, v. 43, n. 1, p. 49-56, 2005.

DEIVE, F. J. et al. Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1-3, p. 735-742, 2010.

DE LAS MARÍAS, P. M. **Química y física de las fibras textiles**. Editorial Alhambra, 1976.

- DE LIMA, R. O. A. et al. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1, p. 53-60, 2007.
- DEWAN, A. et al. Benzydine and its acetylated metabolites in the urine of workers exposed to Direct Black 38. **Archives of Environmental Health: An International Journal**, v. 43, n. 4, p. 269-272, 1988.
- DOS SANTOS, A. B. et al. Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30 C) and thermophilic (55 C) treatments for decolourisation of textile wastewaters. **Chemosphere**, v. 55, n. 9, p. 1149-1157, 2004.
- DOS SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2369-2385, 2007.
- ENAYATZAMIR, K. et al. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. **Journal of hazardous materials**, v. 169, n. 1, p. 176-181, 2009.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p. 783-791, 1985.
- FERNANDES, A. F. T. et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 13974–13978, 2014.
- FORGACS, E.; CSERHATI, T.; OROS, Gyula. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environment international**, v. 30, n. 7, p. 953-971, 2004.
- FORSS, J.; WELANDER, U. Decolourization of reactive azo dyes with microorganisms growing on soft wood chips. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 752-758, 2009.
- FRANCISCON, E.G.D. **Descoloração e degradação de azo corantes por bactérias**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource technology**, v. 79, n. 3, p. 251-262, 2001.
- GARFIELD, S. Mauve: how one man invented a color that changed the world. **WW Norton & Company**, 2002.
- GIANFREDA, L. et al. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. **Water research**, v. 37, n. 13, p. 3205-3215, 2003.
- GOŁĘBIEWSKI, Marcin et al. 16S rDNA pyrosequencing analysis of bacterial community in heavy metals polluted soils. **Microbial ecology**, v. 67, n. 3, p. 635-647, 2014.
- GOMES, E. et al. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 31–39, 2009.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information

Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HSUEH, C.; CHEN, B.. Exploring effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Pseudomonas luteola*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1, p. 703-710, 2008.

JADHAV, S. U.; KALME, S. D.; GOVINDWAR, S. P. Biodegradation of methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 135-142, 2008.

JAIN, K. et al. Decolorization and degradation of azo dye–Reactive Violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures-SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil. **Journal of hazardous materials**, v. 213, p. 378-386, 2012.

JUNIOR, J. C. V. et al. Decolorization of Black B azo dye by *Pseudomonas aeruginosa*. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 4, n. 7, p. 720-728, 2015.

KALME, S. D. et al. Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1405-1410, 2007.

KAUSHIK, P.; MALIK, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. **Environment International**, v. 35, n. 1, p. 127-141, 2009.

KAWAKAMI, T. et al. Analysis of primary aromatic amines originated from azo dyes in commercial textile products in Japan. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 45, n. 10, p. 1281-1295, 2010.

KILIÇ, N. K. et al. Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr (VI). **Chemosphere**, v. 67, n. 4, p. 826-831, 2007.

KIMURA, Motoo. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. Encyclopedia of Chemical Technology. Vol. 2. 1953.

KIRK, T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 465-501, 1987.

KOLADO, W.; BALCERZAK, M. The examination of migration of primary aromatic amines from laminated plastic food packaging materials into food simulants by spectrophotometric method. **Acta Alimentaria**, v. 38, n. 1, p. 45-54, 2008.

KUČEROVÁ, M. et al. The possible mutagenic effect of the occupation of TV announcer. **Mutation Research Letters**, v. 192, n. 1, p. 59-63, 1987.

KUHAD, R. C. et al. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. **Advances in applied microbiology**, v. 56, p. 185-213, 2004.

KULLA, H. G. et al. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I and Orange II. **Archives of Microbiology**, v. 135, n. 1, p. 1-7, 1983.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.

LAZAROW, A.; COOPERSTEIN, S. J. Studies on the mechanism of Janus Green B staining of mitochondria: I. Review of the literature. **Experimental cell research**, v. 5, n. 1, p. 56-69,

1953.

LIN, Y.; LEU, J. Kinetics of reactive azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola* in a biological activated carbon process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 457-467, 2008.

LU, L. et al. Production and synthetic dyes decolourization capacity of a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1149-1156, 2009.

MANU, B.; CHAUDHARI, S. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. **Bioresource technology**, v. 82, n. 3, p. 225-231, 2002.

MÉNDEZ-PAZ, D.; OMIL, F.; LEMA, J. M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 2, p. 264-272, 2005.

NAM, S.; RENGANATHAN, V. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH. **Chemosphere**, v. 40, n. 4, p. 351-357, 2000.

NGO, A. C. R.; DEVANADERA, M. K. P.; DEDELES, G. R. Decolorization of Selected Synthetic Textile Dyes by Yeasts from Leaves and Fruit Peels. **Journal of Health and Pollution**, v. 6, n. 10, p. 42-55, 2016.

NIU, C. et al. Bioresource Technology Decolorization of an azo dye Orange G in microbial fuel cells using Fe (II) -EDTA catalyzed persulfate. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 101–106, 2012.

NOVOTNÝ, Č. et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1545-1551, 2004.

NOZAKI, K. et al. Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 105, n. 1, p. 69-72, 2008.

OLIVEIRA, D. P. et al. Chemical characterization of a dye processing plant effluent—identification of the mutagenic components. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 626, n. 1, p. 135-142, 2007.

O'NEILL, Cliona et al. Colour in textile effluents—sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 11, p. 1009-1018, 1999.

PAN, H. et al. Effects of Orange II and Sudan III azo dyes and their metabolites on *Staphylococcus aureus*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 10, p. 1729-1738, 2011.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, n. 2, p. 73-84, 2007.

PARSHETTI, G. K. et al. Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye methyl orange by *Kocuria rosea* MTCC 1532. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1, p. 503-509, 2010.

PASZCZYŃSKI, A.; CRAWFORD, R. L. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Progress**, v. 11, n. 4, p. 368-379, 1995.

PERALTA-ZAMORA, P. et al. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose. tratamento biológico e fotocatalítico. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 186-190, 1996.

- PIELESZ, A. et al. Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 53, n. 1, p. 42-47, 2002.
- PINHEIRO, H. M.; TOURAUD, E.; THOMAS, O. Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters. **Dyes and pigments**, v. 61, n. 2, p. 121-139, 2004.
- POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. **Science of the total environment**, v. 333, n. 1, p. 37-58, 2004.
- PORTELA VASCONCELOS, A.K. et al. A biodegradação de corantes têxteis associada ao cultivo de *Geobacillus stearothermophilus*: uma alternativa para produção de biossurfactante. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica**, v. 6, n. 1, p. 49-61, 2013.
- RAJAGURU, P. et al. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 444, n. 1, p. 175-180, 1999.
- RAMALHO, P. A. et al. Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 848-854, 2002.
- RAMALHO, P. A. et al. Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2279-2288, 2004.
- RAMALHO, P. A. et al. Azo reductase activity of intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of plasma membrane ferric reductase. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 7, p. 3882-3888, 2005.
- REDDY, C. A. The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. **Current opinion in Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 320-328, 1995.
- ROBINSON, T. et al. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 247-255, 2001.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SARATALE, R. G. et al. Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2493-2500, 2009.
- SEESURIYACHAN, P. et al. Influence of food colorant and initial COD concentration on the efficiencies of micro-aerobic sequencing batch reactor (micro-aerobic SBR) for casein recovery under non-sterile condition by *Lactobacillus casei* TISTR 1500. **Bioresource technology**, v. 100, n. 18, p. 4097-4103, 2009.
- SHAH, M. P. et al. Microbial decolorization of methyl orange dye by *Pseudomonas* spp. ETL-M. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 1, n. 2, p. 54-59, 2013.
- SHAUL, G. M. et al. Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. **Chemosphere**, v. 22, n. 1, p. 107-119, 1991.

- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.
- SILVEIRA, E. et al. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 2, p. 230-235, 2009.
- SINGH, R. et al. Antimicrobial activity of some natural dyes. **Dyes and pigments**, v. 66, n. 2, p. 99-102, 2005.
- STINGLEY, Robin L. et al. Metabolism of azo dyes by human skin microbiota. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 1, p. 108-114, 2010.
- STOLZ, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 69-80, 2001.
- SUGIURA, W. et al. Isolation of azo-dye-degrading microorganisms and their application to white discharge printing of fabric. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 88, n. 5, p. 577-581, 1999.
- SZILAGYI-ZECCHIN, Vivian Jaskiw et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 26, 2014.
- TALARPOSHTI, A. M.; DONNELLY, T.; ANDERSON, G. K. Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 425-432, 2001.
- THOMPSON, G. et al. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 275-286, 2001.
- ULSON, S. M. A. G. et al. Removal of COD and color from hydrolyzed textile azo dye by combined ozonation and biological treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 179, n. 1, p. 35-42, 2010.
- VALENTE, J.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu-SP. **Eclética Química**, p. 49-66, 1997.
- VAN DER ZEE, F. P.; VILLAVARDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies. **Water research**, v. 39, n. 8, p. 1425-1440, 2005.
- VIJAYKUMAR, M. H. et al. Decolourization of naphthalene-containing sulfonated azo dyes by *Kerstersia* sp. strain VKY1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 204-211, 2007.
- WEISBURGER, J. H. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 376, n. 1, p. 261-266, 1997.
- WILLETTS, J. R. M. et al. The use of a thermophilic anaerobic system for pretreatment of textile dye wastewater. **Water science and technology**, v. 42, n. 5-6, p. 309-316, 2000.
- WONG, C. K. et al. Effect of azo dyes on survivorship, oxygen consumption rate, and filtration rate of the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 12, n. 2, p. 289-300, 2006.

XIE, L. et al. Degradation of disperse blue 2BLN by oleaginous *C. sorokiniana* XJK. **RSC Advances**, v. 6, n. 108, p. 106935-106944, 2016.

YAN, H.; PAN, G. Increase in biodegradation of dimethyl phthalate by *Closterium lunula* using inorganic carbon. **Chemosphere**, v. 55, n. 9, p. 1281-1285, 2004.

YU, Z.; WEN, X. Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 56, n. 2, p. 109-114, 2005.

ZAOYAN, Yang et al. Anaerobic-aerobic treatment of a dye wastewater by combination of RBC with activated sludge. **Water Science and Technology**, v. 26, n. 9-11, p. 2093-2096, 1992.

ZHOU, W.; ZIMMERMANN, W. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 107, n. 2-3, p. 157-161, 1993.

ZIMMERMANN, T.; KULLA, H. G.; LEISINGER, T. Properties of purified Orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. **European Journal of Biochemistry**, v. 129, n. 1, p. 197-203, 1982.

ZIMMERMANN, T. et al. Comparison of two bacterial azoreductases acquired during adaptation to growth on azo dyes. **Archives of Microbiology**, v. 138, n. 1, p. 37-43, 1984.