

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS QUÍMICOS E
INFORMÁTICA

Seleção e Avaliação de *Pseudomonas* para a Descoloração de
Corantes Têxteis por Cultivo Submerso

Autor: Edgar Silveira Campos
Orientador: Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi
Co-Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo
Maio, 2010.

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

C157s Campos, Edgar Silveira
Seleção e avaliação de *Pseudomonas* para
descoloração de corantes têxteis por cultivo submerso /
Edgar Silveira Campos. --Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Elias Basile Tambourgi, Ana Lucia
Figueiredo Porto.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Pseudomonas. 2. Biorremediação. 3. Corantes. 4.
Planejamento experimental. I. Tambourgi, Elias Basile.
II. Porto, Ana Lucia Figueiredo. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
Química. IV. Título.

Título em Inglês: Pseudomonas' selection and evaluation of textile dyes
decolorization by submerse culture

Palavras-chave em Inglês: Pseudomonas, Bioremediation, Dyes,
Experimental design

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre, Priscila Gava Mazzola, Ana
Paula Brescancini Rabelo, Fabiana Maria Salvador
Navarro

Data da defesa: 31/05/2010

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

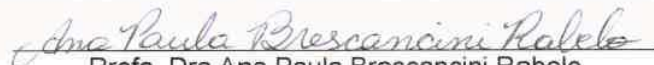
Tese de Doutorado defendida por Edgar Silveira Campos e aprovada em 31 de maio de 2010 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi (Orientador)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre



Profa. Dra. Ana Paula Brescancini Rabelo



Profa. Dra. Priscila Gava Mazzola



Prof. Dr. Fabiana Maria Salvador Navarro

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi

À minha avó, Lourdes,
por ter construído
grande parte do meu
caráter...

Dedico.

Agradecimentos

Primeiramente, à minha mãe, por tudo que fez por mim até hoje, todos os conselhos, carinhos, afagos e compreensão nos momentos difíceis.

À minha esposa, Beatriz Zanchetta Silveira, por me alegrar e dar luz a minha vida.

Ao Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi, o qual foi mais que um orientador, acima de tudo um ótimo amigo.

À Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, a qual torceu pelo meu sucesso desde o primeiro momento desta tese.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

À Clariant do Brasil, em especial a Prof. Dra. Roberta Navarro, pela atenção e por ter cedido os corantes utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, por toda compreensão e pelo acesso ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Prof. Dr. José Carlos Curvelo Santana, pela ajuda e colaboração nas análises estatísticas realizadas neste trabalho.

À Prof. Dra. Priscila Gava Mazzola, pela força e empolgação no final deste trabalho.

Aos amigos Anisabela, Camila, Carol, Clarissa, Germana, Gustavo, Márcia Carine, Pabyton, e Roberto, do Laboratório de Biotecnologia do LIKA por toda diversão nas horas vagas entre os experimentos.

Aos amigos Gisele, Márcia Nieves, Roberto Afonso, Rose, Pedro e Taciana, do Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela troca de conhecimento constante.

Aos amigos Dalva, Giovana, Iara, Juliana, Kleber, Nara e Thayse, do Laboratório de Processos de Separação II da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, por ajudar a vencer as dificuldades durante este trabalho.

Aos amigos Amanda, Gilson, Goran, Igor, Paulista, Pinguim, Tropeço e Pinico e Viviane, do Departamento de Desenvolvimento de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, por todos os momentos de alegria nas horas vagas.

Aos amigos Guilherme, Marília, Rafael e Sergio, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA, por todo apoio.

Ao amigo Ivan Marcelino, “Ah, Jaqueline! Na Trairagem!”.

Ao amigo Petrus Pires Marques, “Eu gosto mais de estudar! E eu gosto mais de batata!”.

Por último, mas não menos importante, aos meus amigos, que estiveram comigo desde o início de tudo, e estarão pelo resto de minha vida.

“Ne me dites pas que ce problème
est difficile. S’il n’était pas difficile,
ce ne serait pas un problème.”
Ferdinand Foch (1851-1929)

Resumo

Aproximadamente, 10.000 corantes e pigmentos diferentes são utilizados industrialmente, representando um consumo anual por volta de 7×10^5 toneladas mundialmente, com 26.500 só no Brasil. Em sua maioria, corantes são substâncias recalcitrantes e tóxicas, os quais são resistentes a degradação biológica. Na região metropolitana de São Paulo, três quartos dos efluentes industriais têxteis possuem resposta mutagênica positiva, o que torna a contaminação por corantes não só um problema ambiental, mas também um problema de saúde pública. Este trabalho tem como objetivo a seleção e avaliação de *Pseudomonas* para a descoloração de efluentes têxteis. Quatro espécies de *Pseudomonas* foram testadas, *P. oleovorans*, *P. cepacia*, *P. putida* e *P. aeruginosa*, com 14 corantes industriais, onde a *P. oleovorans* mostrou-se mais promissora, pois foi capaz de metabolizar 12 dos corantes testados. Posteriormente, a descoloração de corantes por *P. oleovorans* foi otimizada através de dois planejamentos experimentais consecutivos, onde foi possível reduzir o tempo de descoloração foi reduzido pela metade. As melhores condições para a *P. oleovorans* foram atingidas em condições de anoxia (zero RPM); pH inicial de 8,5; 32°C; uso de 25% do volume total do reator; tamanho da cultura inicial de 0,16 g l⁻¹; e uma concentração de corantes de 50 mg l⁻¹. Após a otimização, foi realizada descoloração de corante em cultura *Fed-Batch*, o que aumentou a massa de corante degradado em 10 vezes. Por conseguinte, a *P. oleovorans* foi imobilizada em espumas de poliuretano (PUF) e estas empacotadas em um reator anóxico para a descoloração de efluente sintético. A *P. oleovorans* foi capaz de descolorir efluente sintético contendo corantes em reator anóxico empacotado com PUF em apenas 24 horas, o que aumentou a produtividade em mais de seis vezes quando comparado a fermentação em *Fed-Batch*.

Abstract

Approximately, different 10,000 dyes and pigments are for industrial use, representing an annual consumption of around 7×10^5 worldwide, 26,500 only in Brazil. In overall, dyes are toxic and recalcitrant substances, which are resistant to biological degradation. At the Sao Paulo's metropolitan region, three out of four textile industrial effluents have a positive mutagenic response, which makes dye contamination not only an environmental problem, but also a public health one. This work aims the selection and evaluation of *Pseudomonas* for textile effluent decolourization. Four *Pseudomonas* species were tested, *P. oleovorans*, *P. cepacia*, *P. putida* e *P. aeruginosa*, against 14 industrial dyes, where *P. oleovorans* showed to be the most promising one, it was capable to metabolize 12 dyes tested. Afterwards, *P. oleovorans* dye decolourization was optimized through two consecutive experimental designs, in which was possible to reduce the decolourization in half. The best conditions to *P. oleovorans* were achieved in anoxic conditions (0 RPM); initial pH of 8.5; 32°C; usage of 25% of total reactor; culture initial size of 0.16 g l⁻¹; and dye concentration of 50 mg l⁻¹. After the optimization, dye decolourization was performed in Fed-Batch, which increased the degraded dye mass 10-fold. At last, *P. oleovorans* was immobilized in Poly Urethane Foam (PUF), and packed in an anoxic reactor to the decolourization of a synthetic effluent. *P. oleovorans* was capable of decolourize the dye containing synthetic effluent in an anoxic reactor packed with PUF in only 24 hours, which increased the productivity in over than 6-fold when compared with Fed-Batch decolourization.

Sumário

1 Introdução	1
2 Revisão de Literatura	5
2.1 Corantes Têxteis	7
2.1.1 Azo	9
2.1.2 Antraquinona	10
2.1.3 Aspectos Econômicos	11
2.1.4 Problemas Ambientais	12
2.2 Tratamento de Efluentes	14
2.2.1 Métodos Químicos	14
2.2.1.1 Oxidação	14
2.2.1.2 Reagente de Fenton	15
2.2.1.3 Ozonização	15
2.2.1.4 Hipoclorito de Sódio (NaOCl)	16
2.2.1.5 Oxidação Eletro-Química	17
2.2.1.6 Coagulação e Precipitação	17
2.2.2 Métodos Físico-Químicos	18
2.2.2.1 Adsorção	18
2.2.2.2 Irradiação	18
2.2.3 Métodos Biológicos	19
2.2.3.1 Descoloração Fúngica	19
2.2.3.2 Descoloração Bacteriana	23
2.3 Fisiologia Microbiana	24
2.3.1 Glicólise	25
2.3.2 Transição Entre Aerobiose e Anaerobiose	29

2.3.3 Metanogênese	30
2.3.4 Metabolismo de Compostos Aromáticos	31
2.3.5 Metabolismo de Corantes	32
2.3.5.1 Mecanismo Enzimático Direto	33
2.4 Imobilização Celular	35
2.4.1 Escolha dos Suportes	35
2.4.2 Métodos de Imobilização	36
2.4.2.1 Métodos de Imobilização Irreversíveis	36
2.4.2.2 Métodos de Imobilização Reversíveis	37
2.4.3 Imobilização de Células em Alginato	37
2.4.4 Imobilização de Células em Espumas de Poliuretano	38
2.5 Proteômica	39
2.6 Engenharia de Reatores	41
2.6.1 Reator em Batelada	42
2.6.2 Reator Contínuo em Tanque Agitado (CSTR)	43
2.6.3 Reator <i>Plug Flow</i>	43
3 Materiais e Métodos	45
3.1 Microrganismos	47
3.2 Conservação dos Microrganismos	47
3.3 Meio de Cultura para Adaptação dos Microrganismos	47
3.4 Corantes	47
3.5 Detecção Qualitativa em Placas dos Microrganismos Degradadores de Corantes	47
3.6 Detecção Quantitativa em Tubos dos Microrganismos Degradadores de Corantes	48
3.7 Planejamento Fracionário para o Processo de Descoloração de Corantes	48
3.8 Descoloração de Corantes por Cultivo Submerso	49
3.9 Descoloração em Culturas Submersas em Fed-Batch	49

3.10 Determinação do Crescimento Celular e da Descoloração	50
3.11 Imobilização de Células em Espumas de Poliuretano	50
3.12 Imobilização de Células em Alginato	51
3.13 Planejamento Estatístico Central Composto para Imobilização de Células em Alginato de Sódio	51
3.14 Microscopia Eletrônica de Varredura	51
3.15 Reator Plug Flow	52
3.16 Tempo de Residência	53
3.17 Efluente Sintético	53
3.18 Descoloração em Reator Plug Flow	53
4 Referências	55
5 Manuscrito Apresentado no XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química	71
5.1 Introduction	74
5.2 Materials and Methods	75
5.2.1 Microorganisms	75
5.2.2 Chemicals	75
5.2.3 Qualitative Plate Detection of Dyes Degrading Microorganisms	75
5.2.4 Quantitative Tube Detection of Dyes Degrading Microorganisms	75
5.2.5 Dyes Decolourization under Submerse Cultures	75
5.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization	75
5.3 Results and Discussion	76
5.3.1 <i>Pseudomonas</i> Qualitative Selection	76
5.3.2 <i>Pseudomonas</i> Quantitative Selection	77
5.4 Conclusion	79
5.5 Acknowledgements	79
5.6 References	79

6 Manuscrito Publicado no Periódico International Biodeterioration and Biodegradation, v. 63, pp. 230-235.	83
6.1 Introduction	85
6.2 Materials and Methods	86
6.2.1 Microorganisms	86
6.2.2 Dyes and Reagents	87
6.2.3 Culture Conditions	87
6.2.4 Screening of Decolourization Strain	87
6.2.5 Decolourization Cultures	87
6.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization	88
6.2.7 Scanning Electron Microscopy	88
6.3 Results	89
6.3.1 Screening of Decolourizing Strains	89
6.3.2 Decolouration Cultures	89
6.3.3 Time-dependent Decolourization	90
6.3.4 Effect of Industrial Dye Concentration	91
6.3.5 Scanning Electron Microscopy	92
6.4 Discussion	92
6.5 Conclusion	96
6.6 Acknowledgements	96
6.7 References	96
7 Manuscrito Publicado no Periódico Research and Reviews in Biosciences, v.3 pp. 183-195.	101
7.1 Introduction	104
7.2 Materials and Methods	105
7.2.1 Microorganisms	105
7.2.2 Dyes and Reagents	105
	XIV

7.2.3 Pre-Culture Conditions	106
7.2.4 Statistical Design of Experiments	106
7.2.5 Decolourization Cultures	106
7.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization	107
7.3 Results and Discussion	108
7.3.1 Factorial Experimental Design (2^{7-2})	108
7.3.2 Full Experimental Design (2^4)	108
7.3.3 Response Surface Methodology	112
7.3.4 Decolourization Process of Optimized Cultures	113
7.4 Conclusion	114
7.5 Acknowledgements	115
7.6 References	115
8 Manuscrito Enviado ao XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química	119
8.1 Introdução	122
8.2 Materiais e Métodos	122
8.2.1 Microrganismos	122
8.2.2 Conservação dos Microrganismos	123
8.2.3 Meio de Cultura para Adaptação dos Microrganismos	123
8.2.4 Corantes	123
8.2.5 Descoloração de Corantes por Cultivo Submerso	123
8.2.6 Descoloração de Corantes em <i>Fed-Batch</i>	123
8.2.7 Determinação do Crescimento Celular e da Descoloração	124
8.3 Resultados e Discussão	124
8.3.1 Descoloração de Corantes em Cultivo Submerso	124
8.3.2 Descoloração de Corantes em <i>Fed-Batch</i>	126
8.4 Conclusão	127

8.5 Agradecimentos	128
8.6 Referências Bibliográficas	128
9 Manuscrito a ser Enviado ao Periódico Journal of Hazardous Materials	131
9.1 Introduction	133
9.2 Materials and Methods	135
9.2.1 Microorganism	135
9.2.2 Dyes and Reagents	135
9.2.3 Pre-Culture Conditions	135
9.2.4 Dye Decolourizing Cultures	135
9.2.5 Dye Decolourization in Fed-Batch Cultures	136
9.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization	136
9.2.7 Cell Immobilization in PUF	137
9.2.8 Anaerobic Plug Flow Reactor	137
9.2.9 Reactor Operation	138
9.2.10 Synthetic Effluent	138
9.2.11 Scanning Electronic Microscopy	138
9.3 Results	139
9.3.1 Time-dependent and Fed-Batch Cultures	139
9.3.2 Immobilization of <i>Pseudomonas oleovorans</i> in PUF	139
9.3.3 Reactor Decolourization Process	140
9.4 Discussion	142
9.5 Conclusion	145
9.6 Acknowledgments	145
9.7 References	145
10 Conclusões	149
11 Sugestões para Trabalhos Futuros	153

Anexos	157
A1 Produção Bibliográfica	159
A1.1 Artigos Publicados	159
A1.2 Trabalhos Apresentados em Congresso	159
A2 Proteômica	161
A3 Tempo de Residência do Reator Anóxico	165

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura do 4,4' diidroxí azo benzeno, único composto azo natural	10
Figura 2 - Efluente semi-industrial em Santa Cruz do Capibaribe – PE (7°56'32"S 36°13'53"O)	13
Figura 3 - Ciclo catalítico da Lacase	20
Figura 4 - Rota de degradação de corante azo catalisado por uma peroxidase	21
Figura 5 - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo	25
Figura 6 - Primeira fase da glicólise	26
Figura 7 - Segunda fase da glicólise, fase de ganho de ATP	28
Figura 8 - Degradação anaeróbica do benzoato	32
Figura 9 - Representação esquemática dos mecanismos de redução de corantes em condições anaeróbicas. A – Mecanismo enzimático direto; B – Mecanismo biológico mediado. DE = Doador de elétrons; e MR = Mediador redox.	33
Figura 10 - Cubos de espuma de poliuretano comercial	39
Figura 11 - Desenho esquemático da coluna projetada para a descoloração de efluentes têxteis	52
Figure 12 - Strains Qualitative Selection	78
Figure 13 - <i>P. oleovorans</i> Disperse Blue 165 colour removal.	79
Figura 14 - Decolourization of dyes (50 mg·l ⁻¹) in liquid cultures after 48 hours of incubation with its standard deviation.	90
Figure 15 - Decolourization of Methyl Orange by <i>Pseudomonas</i> . <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biomass production (□) and decolourisation (■); <i>P. oleovorans</i> biomass production (○) and decolourization (●); and <i>P. putida</i> biomass production (□), and decolourization	91
Figura 16 - Decolourization of B15 from its initial concentration. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (■) and <i>P. oleovorans</i> (●).	92
Figura 17 - A) <i>P. oleovorans</i> from dye-free medium, X1,700 ; B) Mineralization of B69 dye by <i>P. oleovorans</i> , X1,700; C) Mineralization of B69 dye by <i>P. oleovorans</i> , X650; D) Mineralization of B69 dye by <i>P. oleovorans</i> , X430.	93

Figure 18 - Response Surface of decolourization of B15 dye as a function of temperature and time	112
Figure 19 - a) Decolourization as a function of time and pH value;	
b) Decolourization as a function of time and dye concentration;	
c) Decolourization as a function of temperature and pH value; and	
d) Decolourization as a function of temperature and dye concentration	113
Figura 20 - Decolourization profile before (initial pH 6.5; 37°C; inoculum concentrarion 0.32 g·l ⁻¹ ; reactor volume 50%; agitation speed 0 rpm) and after the optimization.	114
Figure 21 - B15 dye's wavescan along the decolourization process	115
Figura 22 - Perfis de descoloração e produção biomassa de <i>Pseudomonas oleovorans</i>	125
Figura 23 - Descoloração do corante B15 por <i>Pseudomonas oleovorans</i>	126
Figura 24 - Varredura de comprimento de onda do corante B15 após o processo de descoloração	127
Figura 25 - Descoloração do corante B15 em Fed-Batch	128
Figure 26 - The schematic of the column used for industrial dye decolourization	137
Figure 27 - Decolourization of B15 dye in Fed-Batch	139
Figure 28 - Decolourization of B15 dye by: ■ – Non-Immobilized cells; and Immobilized cells ● – 1st run; • - 2nd run; and □ - 3rd run.	140
Figure 29 - Scanning Electronic Microscopy of immobilized cells in Polyurethane Foam (PUF). a – PUF cross section after immobilization; b – PUF cross section before immobilization; c – PUF surface after immobilization; d – PUF surface before immobilization; e – PUF cross section surface containing immobilized with <i>P. oleovorans</i> ; f – PUF cross section surface before immobilization with <i>P. oleovorans</i> .	141
Figure 30 - Anoxic reactor packed with PUF cylinder. a – before; and b – after the decolourization	142
Figura 31 - B15 Dye Degradation Pattern by <i>Pseudomonas oleovorans</i> immobilized in PUF in an anoxic reactor	142
Figura 32 - Synthetic effluent wavescan along the decolourization process in the anoxic reactor	143

Figura 33 - Perfil de eletroforese bidimensional da *Pseudomonas* oleovorans após descoloração do corante B15. O gel foi obtido utilizando-se um pool de 125 µg de proteína total de células de *P. oleovorans* separadas por eletroforese bidimensional de 12,5% de poliacrilamida corado com nitrato de prata. 161

Figura 34 - SDS-PAGE da *Pseudomonas* oleovorans após descoloração do corante B15. MW – marcador molecular(66, 45, 36, 29, 24, 20, 14 KDa); 1 - 30 µg de proteínas de *P. oleovorans* sem adição de corantes; 2 - 30 µg de proteínas de *P. oleovorans* após descoloração do corante B15; 3 - 20 µg de proteínas de *P. oleovorans* sem adição de corantes; 4 - 20 µg de proteínas de *P. oleovorans* após descoloração do corante B15; 5 - 10 µg de proteínas de *P. oleovorans* sem adição de corantes; e 6 - 10 µg de proteínas de *P. oleovorans* após descoloração do corante B15. 162

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classes Químicas dos Corantes de acordo com o Colour Index (C.I.)	7
Tabela 2 - Classe de Corantes Sintéticos de Acordo com seus Grupamentos Cromóforos	8
Tabela 3 - Classificação de Corantes de Acordo com o seu Uso	9
Tabela 4 - Classificação dos suportes	36
Tabela 5 - Níveis das variáveis utilizadas na descoloração de corantes em cultivos submerso	48
Tabela 6 - Níveis das variáveis estudadas no segundo planejamento, para cultivo submerso	49
Tabela 7 - Níveis das variáveis utilizadas na imobilização de células em alginato	51
Table 8 - Pseudomonas Growth in Plates	76
Table 9 - Pseudomonas growth on plates with dye as sole carbon source	89
Table 10 - Studied parameters on decolourization under submerse culture (2^{n-2})	106
Tabela 11 - Studied parameters on decolourization under submerse culture (2^n)	107
Table 12 - Conditions and Results of the 2^{7-2} -factorial experimental design selected for industrial dye decolourization	109
Table 13 - Estimated effects of studied parameters (t distribution)	110
Table 14 - Conditions and Results of the 2^4 – experimental design selected for industrial dye decolourization	110
Table 15 - Estimated effects of studied parameters (t distribution)	111

1 Introdução

Este capítulo apresenta uma breve introdução sobre corantes têxteis e sua necessidade de descoloração. Expõe também a justificativa e a relevância para a realização de pesquisa e desenvolvimento no âmbito do tratamento de efluentes têxteis, bem como os objetivos primários e secundários da presente tese.

1 Introdução

O primeiro corante sintético, *mauevin*, foi descoberto em 1856, e excluindo uma ou duas notáveis exceções, todos os tipos de corantes utilizados hoje foram descobertos no século XIX. Desde então, mais de 100.00 corantes foram criados mundialmente, e a produção anual ultrapassa mais de 7×10^5 toneladas (Pearce *et al.*, 2003), das quais 26.500 toneladas somente no Brasil (Ulson De Souza *et al.*, 2007).

No início do século XX, cerca de 85% dos corantes eram produzidos na Alemanha, com outros países da Europa (Suíça, Reino Unido e França) contabilizando no máximo 10%. Após um século e duas guerras mundiais este padrão mudou dramaticamente, tendo a sua produção espalhado para países do oriente, tais como Japão, Coréia, e Taiwan, bem como outros países como Índia, Brasil e México. Em 1999, o valor global do mercado de tinturaria foi estimado em US\$ 6,6 bilhões, onde US\$ 700 milhões estavam concentrados na América Central e do Sul (Wesenberg *et al.*, 2003).

Os corantes sintéticos, os quais incluem uma ampla faixa de compostos orgânicos solúveis em água, são usados extensivamente nas indústrias têxteis, de papel, impressão, cosmética, e alimentícia (Wang *et al.*, 2008). Efluentes das indústrias têxteis tendem a variar sua composição entre os dias, e até entre as horas, devido às naturezas das bateladas do processo de tingimento, e com isso torna-se difícil caracterizar seus ingredientes (O'niell *et al.*, 1999a). Os processos utilizados em uma tinturaria para o processamento de algodão são geralmente: encolhimento, estonamento, alvejamento, tingimento e impressão (Isik e Sponza, 2008).

A ineficiência dos processos de tingimento resulta em 10-15% de desperdício de corante que são despejados diretamente nos efluentes (Spadaro *et al.*, 1994). Nem todos os corantes ligam-se ao tecido igualmente, dependendo do tipo de corante, a perda nos efluentes pode variar entre 2% para os corantes básicos, a até 50% para os corantes reativos (Pandey *et al.*, 2007). A cor presente em um efluente indica claramente que a água está poluída, e o descarte de um efluente fortemente corado é capaz de contaminar diretamente a água.

As maiores classes de corantes sintéticos incluem os corantes azos, antraquinona e triarilmetano; e além do impacto visual, muitos destes compostos são tóxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos em períodos de exposição prolongada (Zheng *et al.*, 1999). A cor é um dos primeiros contaminantes a ser reconhecido em um efluente e precisa ser removido antes

do descarte nos corpos d'água ou na terra. A presença de pequenas quantidades de corante na água (menos que $\text{um mg} \cdot \text{l}^{-1}$ para alguns corantes) é extremamente visível e afeta a transparência da água e a solubilidade gasosa em lagos, rios e outros corpos d'água (Banat *et al.*, 1996), além de impossibilitar seu uso recreativo e econômico (Michniewicz *et al.*, 2008). Além disso, o grande volume de descarga dos efluentes industriais combinados com a legislação cada dia mais restritiva, faz com que a busca por novas tecnologias limpas de tratamento seja de extrema prioridade (O'niell *et al.*, 1999b).

Atualmente, os métodos mais comuns para a remoção de cor de um efluente compreendem processos físico-químicos, que incluem flotação, coagulação, adsorção, filtração, precipitação, irradiação, e ozonização (Yesiladali *et al.*, 2006); os quais podem ser onerosos e normalmente envolve a formação de lodo concentrado, o que cria um segundo, e ainda mais complicado, problema de descarte (Chang e Lin, 2000). Alternativamente, sistemas de biodegradação baseados na remoção de cor através de células bacterianas têm se mostrado muito efetivos (Pearce *et al.*, 2008).

A utilização de microrganismos como biocatalizadores na redução de corantes presentes em efluentes industriais, oferece vantagens potenciais frente aos processos físico-químicos. Sob condições aeróbicas, os corantes não são imediatamente metabolizados (Robinson *et al.*, 2001b), entretanto, sob condições anaeróbicas, ou anóxicas, muitos microrganismos podem reduzir as moléculas de corantes, produzindo aminas aromáticas incolores (Pearce *et al.*, 2003), os quais são menos recalcitrantes que os corantes.

Este trabalho tem como objetivo principal a seleção e avaliação de *Pseudomonas* para descoloração de corantes têxteis em cultivo submerso. Dentre seus objetivos específicos estão a seleção de microrganismos capazes de descolorir corantes têxteis, com posterior otimização, via planejamento experimental, das condições de cultivo. Por último, visa à imobilização das células em espumas de poliuretano e sua aplicação em reator anóxico.

2 Revisão de Literatura

Este capítulo apresenta uma revisão atualizada da literatura existente sobre os corantes têxteis, descrevendo a sua classificação, estrutura, uso e formas de tratamento de efluentes. Como ferramenta para o tratamento, é abordada a fisiologia microbiana, a qual dá subsídio para o entendimento da degradação de compostos recalcitrantes.

2 Revisão de literatura

2.1 Corantes Têxteis

O primeiro corante sintético, *mauevin*, foi descoberto por Perkin em 1856, por acaso. As primeiras indústrias de corantes viram o descobrimento dos principais grupos cromóforos (o básico alinhamento de átomos responsável pela cor do corante). De fato, com a exceção de um ou dois corantes, todos os tipos de corantes usados hoje, foram descobertos no século XIX (Gordon e Gregory, 1983).

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua origem, propriedades químicas e/ou físicas, e características relacionadas com o seu processo de aplicação. A simples divisão em corantes naturais e sintéticos é inadequada, já que atualmente a síntese de vários produtos naturais é possível (Wesenberg *et al.*, 2003). Uma classificação mais adequada é a classificação sistemática de acordo com sua estrutura química, ou *Colour Index* (C.I., Tabela 1). Este esquema também é útil para estimar a degradação dos corantes.

Tabela 1 - Classes Químicas dos Corantes de acordo com o Colour Index (C.I.)

Código	Classe Química	Código	Classe Química	Código	Classe Química
10.000	Nitroso	42.000	Triarilmetano	53.000	Sulfur
10.300	Nitro	45.000	Xanteno	55.000	Lactona
11.000	Monoazo	46.000	Acridine	56.000	Aminocetona
20.000	Diazo	47.000	Quinolina	57.000	Hidroxiketona
30.000	Triazo	48.000	Metine	58.000	Antraquinona
35.000	Poliazo	49.000	Tiazole	73.000	Indigoide
37.000	Azóico	49.400	Indamina	74.000	Ftalocianina
40.000	Stilbene	50.000	Azina	75.000	Natural
40.800	Carotenoide	51.000	Oxazine	76.000	Oxidação
41.000	Difenilmetano	52.000	Tiazine	77.000	Inorgânico

Os corantes são classificados dentro do *Colour Index* de acordo com sua aplicação e estrutura química. Eles são compostos por um grupo de átomos responsáveis pela cor do corante, cromóforos, da mesma forma que os grupamentos doadores e receptores de elétrons que causam ou intensificam a cor dos cromóforos, chamados de auxí cromos (Christie, 2001). A Tabela 2 lista os grupamentos cromóforos mais importantes, bem como sua fórmula

esquemática. Os grupamentos auxí cromos mais importantes são: amina (-NH₃), carboxila (-COOH), sulfonato (-SO₃H), e hidroxila (-OH). Onde é importante mencionar que os grupamentos sulfonatos conferem uma solubilidade aquosa alta aos corantes. Os grupamentos auxí cromos conferem aos corantes a classificação de acordo com o seu uso, tais como reativos, ácidos, básicos, diretos, dispersos, etc. (Welham, 2000). A classificação de acordo com o uso está descrita na Tabela 3.

Tabela 2 - Classe de Corantes Sintéticos de Acordo com seus Grupamentos Cromóforos

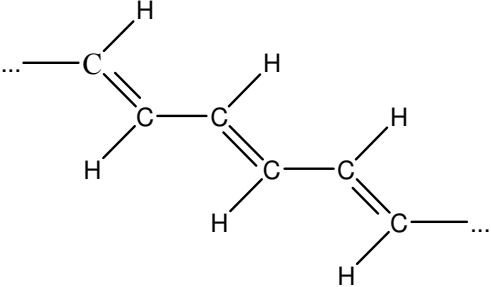
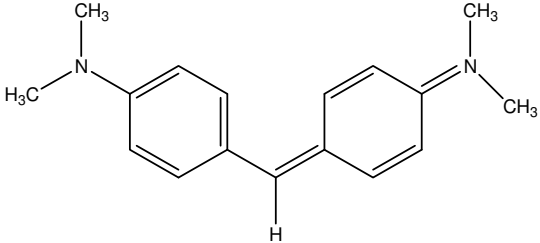
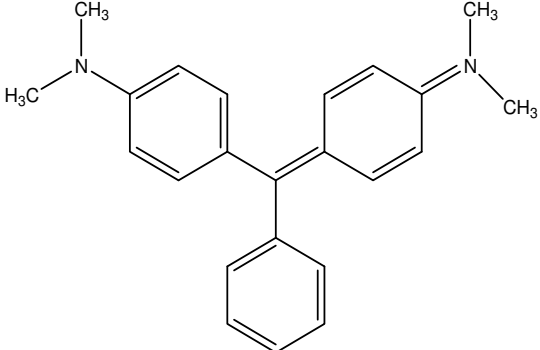
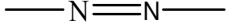
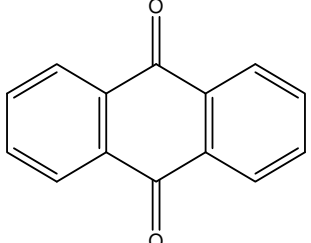
Nome	Estrutura Representativa
Poliene e Polimetano	
Diarilmetano	
Triarilmetano	
Azo	
Antraquinona	

Tabela 3 - Classificação de Corantes de Acordo com o seu Uso

Classe	Método de Aplicação	Tipos Químicos
Ácido	Normalmente em banhos neutros a ácidos	Azo, antraquinona, trifenilmetano, azina, xanteno, nitro e nitroso
Azóicos	A fibra é impregnada com o componente ligante e então é tratada com uma solução de sal diazonio estabilizada	Azo
Básico	Aplicado em banhos básicos	Cianina, hemicianina, diazahemicianina, difenilmetano, triarilmetano, azo, azina, xanteno, acridina, oxazina e antraquinona
Direto	Aplicado em banhos neutros ou levemente alcalinos contendo eletrólitos adicionais	Azo, ptalocianine, stilbeno e oxazina
Disperso	Dispersões aquosas normalmente aplicadas em alta temperatura ou pressão	Azo, antraquinona, stiril, nitro e benzodifuranona
Mordante	Aplicados em conjunto com Sais de Cr	Azo e antraquinona
Reativos	O sítio reativo do corante reage com o grupamento funcional da fibra	Azo, antraquinona, ptalocianina, formazan e oxazina

2.1.1 Azo

Os corantes azos são de longe a classe mais importante, contabilizando por mais de 50% de todos os corantes comerciais, e sendo mais estudados que qualquer outra classe de corantes (*Colour Index*, 1971; Zollinger, 1987). Em 1994, foi estimado que dos quase 10⁹ kg de corantes produzidos no mundo anualmente, os corantes azo contabilizavam 70% deste peso (Stolz, 2001). Os corantes azos contêm ao menos um grupamento azo (Tabela 2), o qual é ligado a dois grupos, em que ao menos um, entretanto mais comumente ambos, são aromáticos. Nos corantes monoazo, o tipo mais importante, os grupos aromáticos

normalmente contêm doadores e receptores de elétrons, particularmente grupamentos hidroxila e aminas.

Quase sem exceção, os corantes azos são produzidos por diazotização de uma amina aromática primária seguida de uma conjugação do sal diazonio resultante com um nucleófilo rico em elétrons. O sal diazonio é um eletrófilo fraco, e desta forma reage apenas com compostos altamente ricos em elétrons, tais como aminas e compostos hidroxilados.

Dependendo da alcalinidade e solubilidade das aminas a serem diazotizadas existe dois importantes métodos distintos de diazotização. Primeiramente a *Diazotização Direta*, onde a amina aromática é dissolvida ou suspensa em uma solução de ácido clorídrico ou sulfúrico, e uma solução concentrada de nitrito de sódio é adicionada. A segunda é a *Diazotização Indireta*, onde as aminas com grupamentos sulfônicos ou carboxílicos ácidos, que são possuem pouca solubilidade em ácidos, são dissolvidas em água ou base fraca (Hunger, 2003).

2.1.2 Antraquinona

A segunda classe de corantes mais importantes, que também incluem os corantes mais antigos; foram encontrados registros de antraquinonas em múmias com mais de 4.000 anos. Em contraste com os corantes azos, o qual só foi descrito um composto natural até hoje, 4,4'-diidroxí azo benzeno (figura 1) (Gill e Strauch, 1984; Pandey *et al.*, 2007), todos os corantes vermelhos naturais importantes são antraquinonas (Gordon e Gregory, 1983). Entretanto, a importância das antraquinonas vem decaindo devido a sua baixa eficiência.

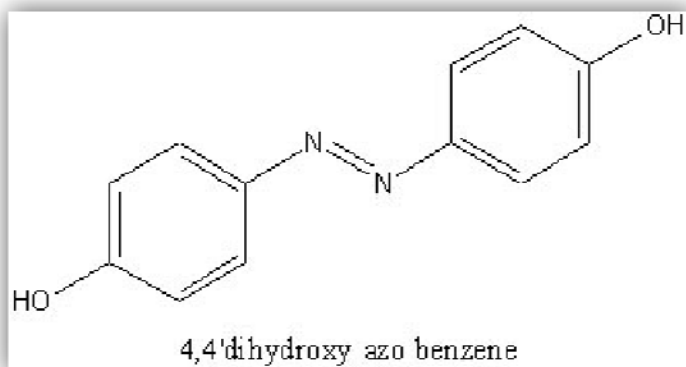


Figura 1 - Estrutura do 4,4' diidroxí azo benzeno, único composto azo natural

Os corantes antraquinonas são baseados na 9,10-antraquinona (Tabela 2), a qual é essencialmente incolor. Para produzir corantes comerciais de qualidade, grupos fortes de

doadores de elétrons, tais como aminas e hidroxilas são introduzidos em uma ou mais das quatros posições α . Para aperfeiçoar suas propriedades, grupamentos aminos primários e secundários e grupamentos hidroxilas são empregados.

As principais vantagens das antraquinonas são seu brilho e boa velocidade de fixação, mas estes corantes são dispendiosos e fracos industrialmente. Entretanto, eles ainda são utilizados, particularmente para sombreamento vermelho e azul, porque outros corantes não provem a combinação de efeitos oferecida pelas antraquinonas.

2.1.3 Aspectos Econômicos

Durante a última década, a produção de corantes nos Estados Unidos, Europa Ocidental e Japão diminuíram significativamente, enquanto a produção nos países Asiáticos, particularmente na China, aumentou (Ishikawa *et al.*, 2008). O consumo de corantes na Europa Ocidental e Japão também diminuiu durante o mesmo período, enquanto o aumento principal foi na China e outros países Asiáticos incluindo Índia, Tailândia e Indonésia (Ishikawa *et al.*, 2008). Entretanto, grande parte das indústrias americanas e européias está lotada em subsidiárias presentes na Ásia ou em países em desenvolvimento, a sua produção final continua no mesmo nível.

Em 1999, o valor do mercado global de corantes foi estimado em US\$ 6,6 bilhões, a América do Norte contabilizando com US\$ 1,2 bilhões, as Américas Central e do Sul com US\$ 700 milhões, Europa Ocidental com US\$ 1,2 bilhões, e a Ásia com US\$ 2,7 bilhões (Will *et al.*, 2000). O consumo *per capita*, segue praticamente o mesmo padrão do mercado mundial de corantes, onde nos Estados Unidos o consumo é consideravelmente maior que nos países em desenvolvimento. Entretanto, o consumo de materiais têxteis vem crescendo em um ritmo muito avançado na China, Índia e outros países em desenvolvimento, como no Brasil, conseqüentemente, o consumo de corantes também cresce no mesmo ritmo (Ishikawa *et al.*, 2008).

Em 1994, a produção mundial de corantes foi estimada em um milhão de toneladas, dos quais 50% destes eram corantes azos (Stolz, 2001). Aproximadamente, 10.000 tipos diferentes de corantes e pigmentos são de uso industrial, representando um consumo anual de 0,7 milhões de toneladas (Akhtar *et al.*, 2005), dos quais 26.500 toneladas somente no Brasil (Ulson De Souza *et al.*, 2007).

Recentemente, novas normas têm afetado as industriais produtoras de corante e seus portfólios. Como exemplo, a Comissão Européia banuiu vários corantes azo em 2002, e em junho de 2004 o *navy blue* (corante azo baseado em cromo, um dos mais usados na indústria do couro). REACH, órgão regulador de produtos químicos da União Européia, a qual foi criada em 2007, também afetou o consumo de corantes (Ishikawa *et al.*, 2008).

Por muitos anos as maiores companhias químicas da Europa permaneceram inalteradas. Desta forma, a produção química, incluindo corantes e drogas, eram realizadas na Alemanha pela Bayer, BASF e Hoechst; na Suíça pela Ciba-Geigy e Sandoz; no Reino Unido pela ICI. Estes três países representavam o foco da produção mundial de corantes, entretanto com a legislação mais restritiva na União Européia, foi observada uma grande mudança neste cenário. As companhias passaram por grandes reorganizações, desmembramentos, e fusões para focar no núcleo de suas atividades, onde surgiram as grandes empresas contemporâneas de produção de corantes, tais como a Dystar e a Clariant.

2.1.4 Problemas Ambientais

Os sérios problemas ambientais como resultado da larga produção e utilização de corantes tem atraído muita atenção nos últimos anos (Yang *et al.*, 2008). Nem todo o corante liga-se ao tecido, dependendo da classe do corante, a sua perda nos efluentes pode variar entre 2% para os corantes básicos, para altos 50% nos corantes reativos (O'niell *et al.*, 1999b). Isto representa uma perda mundial entre 5.000 e 20.000 toneladas de corantes, as quais são jogadas diretamente nos efluentes, e que constitui um sério problema de poluição (Vanhulle *et al.*, 2008). Entretanto o maior motivo para esta perda é a exaustão incompleta do corante na fibra.

A primeira evidencia de contaminação em um efluente é a cor, muitos corantes são visíveis em água em concentrações tão pequenas quanto $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Banat *et al.*, 1996), entretanto, Willmott (1997) descreveu que concentrações a partir de $1,56 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ podem ser detectadas em massas fluentes de água, contudo corantes em concentrações tão baixas como $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ são visíveis em rios de águas límpidas. A figura 2 exhibe um efluente semi-industrial fortemente corado.

A presença de cor nos ecossistemas aquosos diminui a penetração de luz na massa d'água, diminuindo assim a fotossíntese, e com isso deteriorando a qualidade e diminuindo a solubilidade gasosa. Além do mais, corantes e seus produtos de degradação podem ser tóxicos

para a flora e fauna (Banat *et al.*, 1996; Talarposhti *et al.*, 2001; Asad *et al.*, 2007). Por outro lado, efluentes fortemente corados possuem também o problema estético, no qual impossibilita seu uso em parques aquáticos, fontes, e praças públicas.



Figura 2 - Efluente Semi-industrial em Santa Cruz do Capibaribe – PE
(7°56'32"S 36°13'53"O)

O descarte de efluentes contendo corantes industriais diretamente nos corpos d'água constitui outro sério problema que é o risco tóxico contra organismos vivos. Uma pesquisa realizada sobre a toxicidade oral aguda em 4.461 corantes, avaliados pela dose letal para 50% dos ratos tratados, revelou que corantes azo e catiônicos são na maioria tóxicos (Clarke e Anliker, 1980). A maioria destes compostos é considerada venenosa por ingestão, nas rotas subcutânea, intraperitoneal e intramuscular; além de exibir potencial mutagênico e carcinogênico (Kulkarni e Chaudhari, 2007). Alguns corantes foram diretamente relacionados com câncer de bexiga em humanos; sarcomas esplênicos, hepatocarcinomas e anomalias nucleares em cobaias; e aberrações cromossômicas em células de mamíferos (Ben Mansour *et al.*, 2007).

Sanchez *et al.* (1988) descreveram que na área metropolitana de São Paulo os efluentes de várias indústrias têxteis obtiveram a maior resposta positiva mutagênica (nove

resultados positivos dentre as 12 amostras testadas) entre os vários tipos de efluentes industriais analisados. Da mesma forma, o descarte de indústrias processadoras de corantes é o maior contribuinte para a atividade mutagênica encontrada no Rio Paraíba no estado de São Paulo (Valent *et al.*, 1993). Recentemente, Rajaguru *et al.* (2002) descobriram que efluentes têxteis não tratados estavam contribuindo com a contaminação de águas subterrâneas na Índia, onde os corantes e/ou seus produtos de degradação foram associados à mutagenecidade observada.

Infelizmente, os corantes azos presentes em efluentes normalmente não são afetados pelos processos de tratamento convencionais. Sua persistência é principalmente devida aos grupamentos sulfato e azo, os quais não ocorrem naturalmente, fazendo que estes corantes sejam xenobióticos e recalcitrantes a biodegradação oxidativa (Bafana *et al.*, 2008).

2.2 Tratamento de Efluentes

A remoção eficiente de corantes presentes nos efluentes industriais é ainda um dos maiores desafios ambientais. Tipicamente os efluentes consistem em uma grande variedade de subprodutos de diferentes operações. Alguns corantes são polímeros fortemente estruturados e desta forma, sua decomposição torna-se muito difícil. Atualmente, vários métodos de tratamento químico, físico e biológicos são utilizados para a remoção de cor (Anjaneyulu *et al.*, 2005).

2.2.1 Métodos Químicos

2.2.1.1 Oxidação

Oxidação é o processo químico de descoloração mais utilizado devido ao seu manuseio simples. Como descrito em vários trabalhos de pesquisa (Banat *et al.*, 1996; Rieger *et al.*, 2002; Barragan *et al.*, 2007), os corantes modernos são resistentes a condições suaves de oxidação. A remoção de cor eficiente, entretanto, deve ser realizada por agentes oxidantes mais fortes, tais como cloro, ozônio, reagente de Fenton, UV/peróxido, UV/ozônio, ou outras técnicas oxidantes ou combinações. Foi provado que o cloro é um bom agente oxidante de corantes, e aplicado a baixos custos operacional e de capital. Contudo, o potencial do cloro para formar compostos indesejáveis com componentes que contêm nitrogênio presentes nos efluentes, tem limitado a aceitação deste método. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é um dos agentes oxidantes mais utilizados, o qual precisa ser ativado de algum modo, por exemplo, pela luz ultravioleta. Vários métodos de descoloração química variam dependendo do método

no qual o H_2O_2 é ativado. A oxidação química remove o corante do efluente pela oxidação, resultando na quebra dos anéis aromáticos das moléculas de corante (Raghavacharya, 1997).

2.2.1.2 Reagente de Fenton

O reagente de Fenton (peróxido de hidrogênio, ativado com sais de ferro II) é adequado para a oxidação de produtos tóxicos presentes nos efluentes, os quais inibem o tratamento biológico. A separação química utiliza a ação de sorção ou ligação para remover corantes dissolvidos nos efluentes e mostrou-se efetivo na descoloração de corantes solúveis e insolúveis (Pak e Chang, 1999). As vantagens deste processo incluem a redução da Demanda Química de Oxigênio (DQO), cor e toxicidade.

Já que o mecanismo envolve floculação, as impurezas são transferidas do efluente para o lodo, o qual é ainda ambientalmente questionável. Este lodo tem sido convencionalmente incinerado para produzir energia, mas tal destino aparenta ser muito longe de uma solução amigável ao ambiente. O desempenho do método é dependente da formação final dos flocos e sua qualidade, aliás, corantes catiônicos não são coagulados (Robinson *et al.*, 2001b). Corantes ácidos, diretos, vat, mordantes e reativos geralmente são coagulados, mas o flocó resultante é de baixa qualidade e não sedimenta facilmente, gerando resultados medíocres (Raghavacharya, 1997). De acordo com Gregor e Schwarzer (1993), o processo de Fenton é preferível para o tratamento de efluentes nos casos onde as leis municipais permitem o descarte do lodo de Fenton diretamente nos esgotos.

O reagente de Fenton atinge seu ponto ótimo com concentrações elevadas de corante e baixo pH inicial. Entretanto, a concentração inicial do corante no banho após o ajuste do pH é fortemente inibida pela presença de cloreto de sódio, o qual é encontrado em efluentes contendo corantes reativos (Aplin e Waite, 2000). Várias estações do reagente de Fenton em larga escala foram construídas em meados da década de 1990 para o tratamento de efluentes têxtil (Gravelet-Blondin *et al.*, 1996), e foi averiguado que esta tecnologia é muito efetiva para a descoloração de uma ampla faixa de corantes.

2.2.1.3 Ozonização

O uso de ozônio foi utilizado pela primeira vez na década de 1970, e é um ótimo agente oxidante devido à sua alta instabilidade ($E^\circ = 2,07 \text{ V}$) comparado com o cloro ($E^\circ = 1,36 \text{ V}$) e H_2O_2 ($E^\circ = 1,78 \text{ V}$). O ozônio pode oxidar seletivamente ligações não saturadas (por exemplo, $-\text{C}=\text{C}-$ ou $-\text{N}=\text{N}-$) e estruturas aromáticas (Adams e Gorg, 2002). A

oxidação pelo ozônio levava a degradação de hidrocarbonetos clorados, fenóis e hidrocarbonetos aromáticos (Xu *et al.*, 1999).

O ozônio pode reagir em ambas às rotas, direta e indireta. A rota direta envolve a própria molécula do ozônio comoceptor de elétrons. Íons hidroxila (presente a concentração suficiente em níveis de pH maiores que 7-8) catalisam a auto decomposição do ozônio em radicais hidroxilas (*OH) em soluções aquosas (Staehelin e Hoigne, 1982). Os radicais hidroxilas são oxidantes não-seletivos e muito fortes ($E^{\circ} = 3,06 \text{ V}$) que reagem com compostos orgânicos e inorgânicos com taxa constante até 10^9 vezes maior que o ozônio. Desta forma, em baixo pH, o ozônio pode reagir eficientemente com ligações cromóforas não saturadas, e em pH mais alto, reações indiretas do ozônio podem levar a um processo menos eficiente pela oxidação indiscriminada de todas as partes da molécula do corante (Adams e Gorg, 2002).

A ozonização é um dos meios mais efetivos de descoloração de efluentes e tem-se mostrado que o processo atinge uma alta taxa de remoção de cor, conjuntamente com remoção da DQO (Liakou *et al.*, 1997; Koyuncu, 2002). A dosagem aplicada ao efluente contaminado é dependente da cor total e DQO residual a ser removida. Sem formação de resíduos ou lodo, e sem metabolitos tóxicos, a ozonização deixa o efluente sem coloração e com baixa DQO, perfeito para o descarte em sistemas aquáticos (Xu *et al.*, 1999). A desvantagem da ozonização é sua curta meia-vida (normalmente 20 minutos), demandando aplicação continua, elevando fortemente o custo do processo.

2.2.1.4 Hipoclorito de Sódio (NaOCl)

A oxidação química de efluentes corados é também possível com compostos clorados. Neste processo, os grupamentos amins das moléculas de corante são atacados pelos íons Cl^+ , os quais iniciam e aceleram a quebra das ligações azo. A taxa de descoloração aumenta com o aumento da concentração de cloro e diminuição do pH do meio (Robinson *et al.*, 2001b). Entretanto, um aspecto que se torna evidente nos últimos anos, por motivos ambientais, é a restrição do uso de compostos químicos contendo cloro e o descarte de amins aromáticas no ambiente, as quais são carcinogênicas (Banat *et al.*, 1999). Porém, vale salientar que apesar de que cerca de 40% dos pigmentos utilizados no mundo contem cloro, isto apenas corresponde a menos que 0,02% de toda a produção de cloro mundial.

2.2.1.5 Oxidação Eletro-Química

O tratamento eletro-químico de efluentes corados é considerado como um processo avançado, e um método potencialmente forte de controle de poluição, oferecendo altas taxas de remoção. O processo eletro-químico geralmente requer temperaturas mais baixas, quando comparado com outros tratamentos e da mesma forma não necessita de nenhuma adição de compostos químicos (Kim *et al.*, 2002).

O equipamento e operação necessários são geralmente simples. Os controles são simples e os reatores eletro-químico são compactos, e previnem a produção de subprodutos indesejáveis. Acredita-se que o principal agente oxidante no processo eletro-químico é o íon hipoclorito ou o ácido hipocloroso produzido a partir de íons de cloro encontrados naturalmente no meio. Radicais hidroxilas ou outras espécies reativas também participam na oxidação eletro-química de compostos orgânicos (Kim *et al.*, 2002). Desta forma, o processo é relativamente não específico, o qual é aplicável a uma ampla faixa de contaminantes.

Esta oxidação eletro-química pode ser atingida tanto diretamente ou indiretamente no anodo, quanto indiretamente utilizando reagentes gerados no anodo (Rajeshwar *et al.*, 1994). Os metabolitos gerados são freqüentemente inofensivos, possibilitando que o efluente tratado seja descartado diretamente no meio ambiente sem riscos. O processo eletro-químico é econômico e eficiente na remoção de corantes e possui uma alta eficiência na degradação de poluentes recalcitrantes (Pelegrini *et al.*, 1999).

2.2.1.6 Coagulação e Precipitação

Sais de ferro e alumínio hidrolisados são amplamente utilizados como coagulantes primários para promover a formação de agregados nos efluentes e reduzir a concentração de corantes e outros compostos orgânicos. Os curtos tempos de retenção e baixo custo de capital faz da coagulação química uma técnica amplamente utilizada. O alto custo de produtos químicos para precipitação, tanto quanto para o ajuste de pH, problemas associados com secagem e descarte do lodo formado, e a alta concentração de cátions residuais, os quais permanecem no sobrenadante, são fatores limitantes deste método.

O tratamento com compostos químicos, como sulfato de alumínio, sulfato ferroso e férrico, cloreto de ferro, sulfato de cobre, etc., sozinhos ou combinados para a remoção de cor de efluentes industriais (Alinsafi *et al.*, 2005). Estudos indicam que a coagulação e precipitação química para a remoção de cor é possível e sugerem que a remoção de cor é

exercida pela agregação/precipitação e adsorção dos corantes em coagulantes polinucleares e em flocos hidratados (Alinsafi *et al.*, 2005).

2.2.2 Métodos Físico-Químicos

2.2.2.1 Adsorção

Dentre os processos físico-químicos de tratamento, a tecnologia da adsorção é considerada uma das mais eficientes e comprovado potencial na aplicação do tratamento de água e efluentes. A adsorção é um fenômeno rápido de seqüestro passivo e separação do adsorbato da fase aquosa ou gasosa, para a fase sólida (Reddy, 2000). As técnicas de adsorção ganharam força recentemente devido a sua eficiência na remoção de poluentes de forma estável por métodos convencionais.

A adsorção é um processo economicamente aceitável que produz produtos de alta qualidade (Choy *et al.*, 1999). A descoloração é um resultado de dois mecanismos, adsorção e troca iônica, e é influenciada por vários fatores físico-químicos, tais como a interação corante-adsorvente, área de superfície do adsorvente, tamanho da partícula, temperatura, pH e tempo de contato (Kumar *et al.*, 1998).

Adsorvente que contem grupamentos aminas nitrogenados, tais como quitina, tendem a apresentar uma capacidade de adsorção significativamente maior para corantes. Existem vários exemplos de adsorventes feitos a partir de materiais de descarte, para a remoção de corante e matéria orgânica corada em meio aquoso, que são de baixo custo (Bousher *et al.*, 1997).

O carbono ativado é normalmente o método mais utilizado para remoção de cor por adsorção (Nassar e El-Geundi, 1991). O carvão ativado em pó tem uma capacidade de remoção de cor razoável quando introduzida em um passo de filtração separado. As capacidades de adsorção de corantes em materiais não-biológicos, tais como carvão ativado, também dependerão da carga de superfície do adsorvente em contato com a água. Para o carbono, a carga de superfície será neutra, e assim a adsorção física predominará (Robinson *et al.*, 2001b).

2.2.2.2 Irradiação

Técnicas convencionais utilizadas no tratamento de água e efluentes produzem água de alta qualidade. Entretanto, a aplicação dessas tecnologias é limitada devido aos custos

econômicos e manutenção (El-Gohary *et al.*, 1995). Contudo, tratamento com radiação utilizando raios gama ou feixes de elétrons é uma técnica simples e eficiente que pode eliminar uma ampla variedade de contaminantes orgânicos, bem como eliminar microrganismos patogênicos (Borrely *et al.*, 1998).

Recentemente, catalisadores tais como dióxido de titânio tem sido usado para aumentar a eficiência do tratamento de irradiação (Krapfenbauer *et al.*, 1999). No entanto, há poucos trabalhos que caracterizam a atividade catalítica do TiO_2 durante a irradiação gama. Quantidades suficientes de oxigênio dissolvido são requeridas para que uma substância orgânica seja degradada efetivamente pela radiação. O oxigênio dissolvido é consumido rapidamente e, desta forma, é necessário que o seu suprimento adequado seja constante (Hosono *et al.*, 1993).

2.2.3 Métodos Biológicos

O uso extensivo dos processos químicos e físico-químicos produz um grande volume de lodo ativado, o qual requer cuidados para o descarte. Os métodos biológicos são geralmente considerados amigos do meio ambiente, já que os mesmos levam a uma mineralização completa dos poluentes orgânicos a baixo custo. Os corantes, mais precisamente os corantes azo, são xenobióticos na natureza, e com isso espera-se que sejam recalcitrantes a biodegradação (Stolz, 2001).

2.2.3.1 Descoloração Fúngica

O uso de fungos ligninolíticos, tais como *Phanerochaete chrysosporium* e *Tinctoporia* sp., para descoloração de polpa contendo lignina e efluentes das indústrias de papel começou no início dos anos 1980 (Jurj *et al.*, 1980). Conjuntamente com o *P. chrysosporium*, outros fungos lignolíticos são capazes de descolorir corantes, incluindo *Trametes versicolor*, *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* e *R. oryzae*. Na descoloração fúngica de efluentes, estes fungo podem ser classificados em dois tipos de acordo com seu estado, células vivas, as quais adsorvem e degradam os corantes; e células mortas (biomassa fúngica), a qual apenas adsorve os corantes.

Os fungos lignolíticos são reguladores globais do ciclo do carbono, suas enzimas modificadoras de lignina, em especial manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases (LiP) e lacase (Lac) não estão apenas envolvidas com a degradação de lignina como substrato natural (Becker e Sinitsyn, 1993), mas também atuam na degradação de vários compostos

xenobióticos (Pointing e Pointing, 2001), incluindo os corantes (Spadaro *et al.*, 1992). As enzimas modificadoras de lignina são essenciais para a degradação de lignina, entretanto para a mineralização de lignina, elas combinam-se geralmente com outros processos envolvendo enzimas adicionais.

Desta forma, a capacidade dos fungos para reduzir corantes azos está relacionada com a formação de exoenzimas, tais como peroxidases e fenoloxidasas (Duran *et al.*, 2002). A lignina e manganês peroxidases possuem o mecanismo de reação similar, o qual começa com a oxidação da enzima pelo H_2O_2 durante o ciclo catalítico. Em seguida, em um mecanismo envolvendo duas transferências de elétrons sucessivas, os substratos, tais como corantes azos, reduzem a enzima a sua forma original (Stolz, 2001).

Embora, a lignina peroxidase seja capaz de oxidar tanto compostos aromáticos fenólicos e não-fenólicos, a manganês peroxidase precisa converter Mn^{2+} a Mn^{3+} para oxidar compostos fenólicos (Glenn *et al.*, 1986). As fenoloxidasas, as quais podem ser divididas em tirosinases e lacases, são oxirredutases que catalisam a oxidação do fenol e outros compostos aromáticos sem o uso de cofatores (Duran *et al.*, 2002). As lacases são enzimas contendo cobre e que possuem uma ampla especificidade de substratos, em relação aos doadores de elétrons, como por exemplo, os corantes (Abadulla *et al.*, 2000). A figura 3 descreve o ciclo catalítico da lacase e a figura 4 mostra a rota catalítica de uma peroxidase.

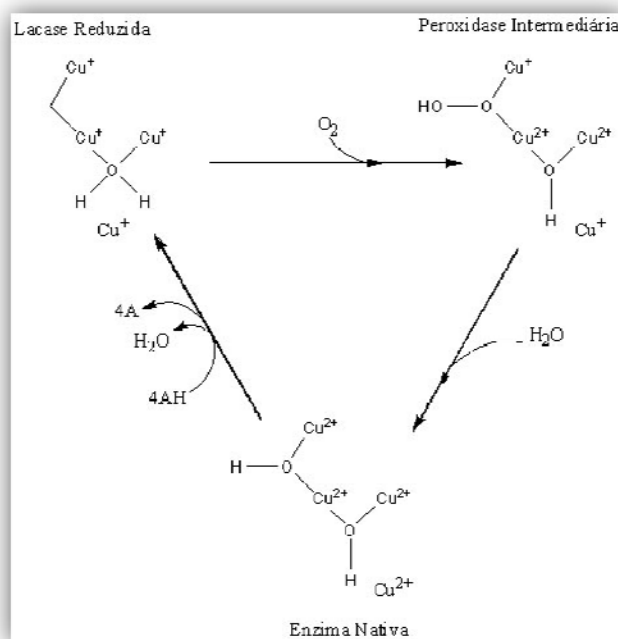


Figura 3 - Ciclo catalítico da Lacase

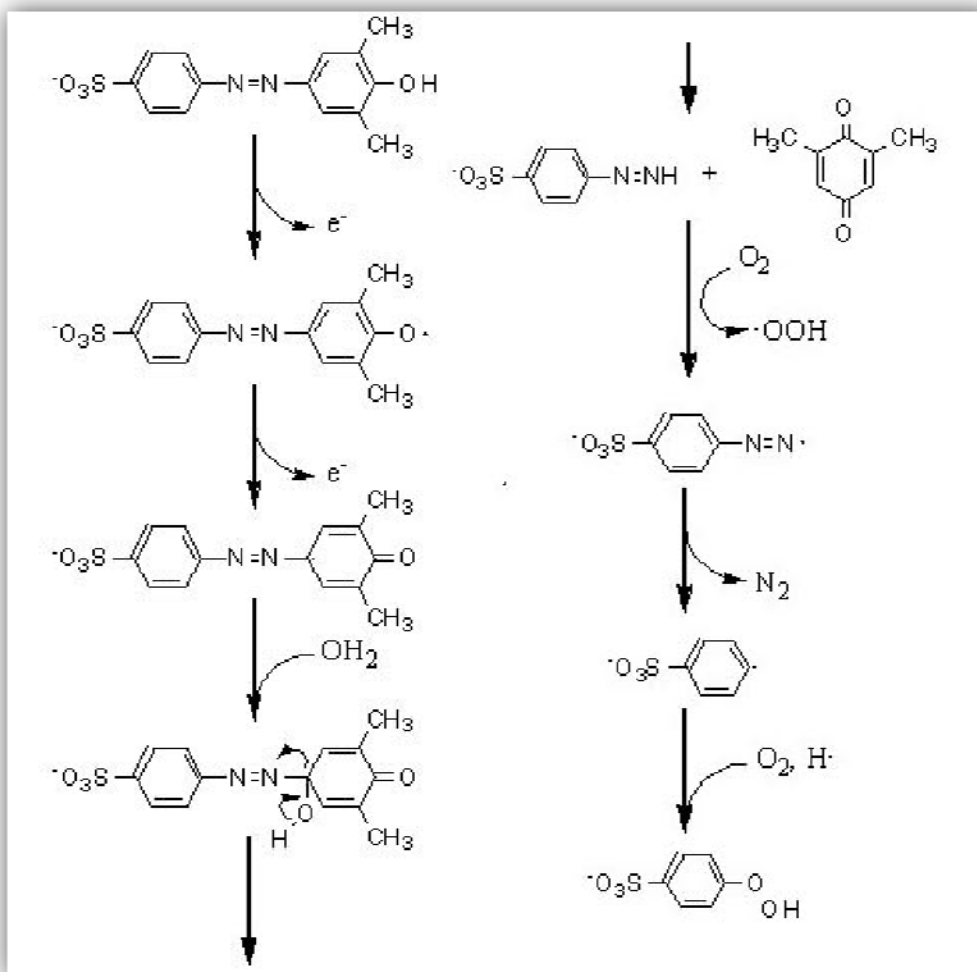


Figura 4 - Rota de degradação de corante azo catalisado por uma peroxidase

A produção de enzimas modificadoras de lignina por fungos lignolíticos para a degradação de poluentes recalcitrantes é explanada pelo metabolismo secundário dos fungos, já que tanto a lignina, quanto os corantes provem pouca energia para o microrganismo. A síntese destas enzimas geralmente é induzida por níveis limitantes de nutrientes, e sua produção atinge o ponto ótimo em altas concentrações de oxigênio dissolvido no meio.

O efeito da absorção dos corantes pelos micélios dos fungos lignolíticos sem a sua degradação real é geralmente mínima (Glenn e Gold, 1983), estes efeitos são vistos nas aplicações de fungos não-lignolíticos, tais como *Aspergillus niger*, onde a sua biomassa pode ser utilizada como material adsorvente (Fu e Viraraghavan, 2001), a qual serve como parte de uma solução técnica no controle da poluição de efluentes.

O envolvimento individual das enzimas modificadoras de lignina na descoloração é confirmado pela sua utilização *in vitro*, onde o perfil de degradação varia muito. Por exemplo, lacase é a principal enzima envolvida na descoloração de corantes em culturas de *Phlebia tremullosa* (Robinson *et al.*, 2001a), enquanto a ação da LiP e da MnP foi ausente (Kirby *et al.*, 2000). A MnP só pode ser detectada quando a cultura foi suplementada com $MnCl_2$. As enzimas modificadoras de lignina atuam significativamente no metabolismo de corantes por fungos lignolíticos, provavelmente devido à similaridade estrutural de muitos corantes industriais com a lignina.

Apesar disso, há grandes dificuldades na aplicação de fungos lignolíticos para a descoloração de efluentes, quando é considerada a complexidade de um efluente industrial. A sua composição além de corantes, contém também sais, às vezes uma grande força iônica e valores de pH extremos, agentes quelantes, surfactantes, etc. Apenas recentemente, a primeira tentativa em aplicar fungos lignolíticos para descolorir um efluente real foi publicado (Wesenberg *et al.*, 2002). Utilizando *Clitocybula dusenii*, Wesenberg *et al.* (2002) conseguiram atingir o máximo da descoloração após um período de 20 dias a 28 °C utilizando um efluente diluído quatro vezes e uma pré-cultura de cinco dias.

Zhang *et al* (1999) utilizou basidiomiceto produtor de LiP, MnP e lacase imobilizado em alginato, em várias configurações de reator, para o desenvolvimento de biorreatores para a descoloração. O desempenho de reatores de leito empacotado, leito fluidizado contínuo e em batelada alimentada, em termos de taxa de descoloração e estabilidade do micélio, foi comparável com a descoloração contínua em biorreator utilizando *Phanerochaete chrysosporium* imobilizado (Yang e Yu, 1996). A transferência de massa e oxigênio adequada no leito fluidizado assegura a estabilidade evitando o crescimento excessivo do micélio, o qual é a principal desvantagem do uso de fungos micelares em reatores.

A descoloração de corantes azos e outros corantes solúveis em água anaerobicamente é possível via oxidação-redução, e uma fonte de carbono adicional é requerida como doador de elétrons, produzindo metano e ácido sulfídrico. O reuso do biogás produzido poderia reduzir o custo energético de tal aplicação, entretanto o preço da glicose pode ser um fator limitante no escalonamento de tais projetos (Robinson *et al.*, 2001b). Além disso, grupamentos aminas tóxicos que são produzidos pelos fungos podem criar um problema de poluição adicional (Banat *et al.*, 1996), e a exposição de compostos azo reduzidos ao oxigênio pode levar a reaparição da cor.

2.2.3.2 Descoloração Bacteriana

A redução das ligações azo é o passo inicial da degradação dos corantes azos. A descoloração ocorre sob condições anaeróbicas (metanogênese), anóxicas e aeróbicas, por diferentes grupos tróficos de bactérias. A metanogênese a partir de compostos orgânicos complexos requer a participação coordenada de vários grupos tróficos diferentes de bactéria, incluindo bactérias acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas (Kaspar e Wuhrmann, 1978). A descoloração de corantes sob estas condições requer uma fonte de carbono orgânica. Há relatos sobre o uso de um substrato simples como a glicose, amido, acetato e etanol; e outro mais complexo como proteína do soro do leite e tapioca; na descoloração sob condições de metanogênese (Talarposhti *et al.*, 2001; Isik e Sponza, 2005; Van Der Zee e Villaverde, 2005).

Estudos extensivos foram realizados para determinar o papel de diversos grupos de bactéria na descoloração de corantes. Carlieel *et al.* (1996) e Razo-Flores *et al.* (1997) associaram a descoloração com bactérias metanogênicas, por outro lado, estudos de outros pesquisadores mostraram que as bactérias acidogênicas, como as metanogênicas contribuem para a descoloração (Chinwetkitvanich *et al.*, 2000; Brás *et al.*, 2001). Com o uso de métodos moleculares para caracterizar as populações microbiológicas em reatores anaeróbicos para o tratamento de efluentes contendo corante industrial, foi possível observar que a população bacteriana presente era composta por γ -proteobactéria, em conjunto com bactérias redutoras de sulfato. Em conjunto, uma população metanogênica dominada por espécies de *Methanosaeta* e *Methanomethylovorans hollandica* contribuem com o tratamento de efluentes industriais (Plumb *et al.*, 2001).

A redução em condições anaeróbicas aparenta ser não-específica, desde que a maioria dos compostos azo é descolorida, entretanto a taxa de descoloração é dependente da fonte de carbono orgânica adicionada, tanto quanto a sua estrutura (Bromley-Challenor *et al.*, 2000; Stolz, 2001). Além disso, não há correlação entre a taxa de descoloração e o peso molecular, indicando que a descoloração não é um processo específico e a permeabilidade celular não é limitante para a descoloração. Desta forma, a descoloração de corantes em anaerobiose é um processo inesperado, onde o corante age como um acceptor de elétrons supridos por carregadores da cadeia transportadora de elétrons. Alternativamente, a descoloração deve ser atribuída a reações extracelulares não-específicas que ocorrem entre os compostos reduzidos gerados pela biomassa anaeróbica (Van Der Zee *et al.*, 2001).

Várias estirpes bacterianas com capacidade de descolorir corantes azos foram isoladas durante os últimos anos. Muitas destas cepas requerem fontes orgânicas de carbono, já que elas não conseguem metabolizar os corantes como substrato para seu crescimento (Stolz, 2001). A *Pseudomonas aeruginosa* foi capaz de descolorir corantes têxteis na presença de glicose sob condições de aerobiose, onde é capaz de descolorir vários corantes (Nachiyar e Rajkumar, 2003).

Existem apenas algumas bactérias que são capazes de crescer apenas com compostos azo como fonte única de carbono. Estas bactérias clivam as ligações azo redutivamente e utilizam as aminas geradas como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Entretanto, estes microrganismos são específicos em relação a seus substratos (Zimmermann *et al.*, 1982).

A descoloração anóxica de vários corantes azos por consórcios aeróbicos e anaeróbicos facultativos já foi descrita por vários pesquisadores (Nigam *et al.*, 1996; Kapdan *et al.*, 2000; Khehra *et al.*, 2005). Enquanto estas culturas foram capazes de crescer aerobicamente, a descoloração foi atingida apenas em condições anaeróbicas. Cepas bacterianas puras, tais como *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis* e *Proteus mirabilis*, descoloriram corantes azo em condições anóxicas (Chang *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003).

A descoloração de corantes por culturas mistas, tanto quanto por culturas puras, geralmente requer uma fonte de carbono complexa, tal como extrato de levedura, peptona, ou uma combinação de fontes de carbono complexa orgânica e carboidratos (Chen *et al.*, 2003; Khehra *et al.*, 2005). A glicose é o substrato preferido na descoloração anaeróbica de corantes em condições de metanogênese, porém a sua preferência na descoloração de corantes em condições anóxicas por bactérias fermentadoras e anaeróbicas facultativas variam, dependendo da cultura bacteriana. O efeito negativo da glicose na descoloração anóxica foi atribuído ao decaimento do pH devido à formação ácida ou a repressão catabólica (Chen *et al.*, 2003).

2.3 Fisiologia Microbiana

As células e os organismos vivos necessitam realizar trabalho para se manterem vivos, crescer e reproduzir. A habilidade de obter energia e canalizá-la para o trabalho biológico é a propriedade fundamental dos organismos vivos. Estes organismos utilizam

energia química para produzir macromoléculas complexas a partir de precursores simples. Eles ainda convertem esta energia em gradientes de concentração e gradientes elétricos, bem como a transformam em movimento ou calor (Berg *et al.*, 2006).

O composto universal para o transporte de energia química em células vivas é a adenosina trifosfato (ATP). As células podem produzir ATP por duas vias: primeiramente, pela fosforilação em nível de substrato na qual um fosfato de alta-energia é transferido de um composto químico para uma adenosina difosfato (ADP) durante o catabolismo de carboidratos; por outro lado, existe a fosforilação oxidativa, na qual energia oriunda de um gradiente químico ou elétrico formado ao longo da membrana celular é utilizado por um complexo de ATP hidrolases para produzir ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Hogg, 2005).

O metabolismo de carboidratos é a oxidação progressiva de um açúcar no quais moléculas de hidrogênio são transferidas a partir de intermediários na sua rota metabólica. Na presença de oxigênio, onde ocorre a glicólise, o aceptor de hidrogênio mais comum é a nicotinamida adenina dinucleotídeo, NAD (figura 5). Entretanto, em um ambiente anaeróbico ou anóxico, as células são forçadas a tomar uma rota metabólica secundária, ou alternativa a glicólise (Hogg, 2005).

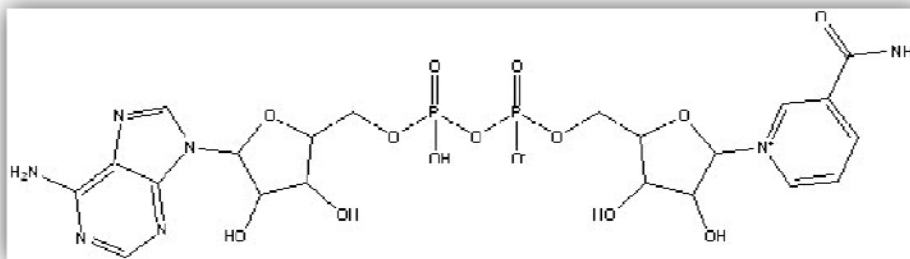


Figura 5 - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

2.3.1 Glicólise

Na glicólise, a molécula de glicose, a qual possui seis átomos de carbono, é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas onde renderá duas moléculas de três carbonos, o piruvato. Durante as reações sequenciais da glicólise, uma parte da energia livre da glicose liberada é conservada na forma de ATP e NADH. A via glicolítica é a única fonte de energia metabólica em grande parte das células aeróbicas, onde vários microrganismos são totalmente dependentes da glicólise (Murray *et al.*, 2003).

A quebra da molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, produzindo energia, ocorre em dez passos, onde os cinco primeiros constituem a fase preparatória (figura 6) e os outros cinco constituem a fase de oxidação, ou fase de ganho de ATP. O primeiro passo da glicólise, a glicose é ativada para as reações subseqüentes pela sua fosforilação no C-6, formando assim uma molécula de glicose 6-fosfato, onde uma molécula de ATP é doadora do fosfato. Esta reação é irreversível em condições intracelulares (Berg *et al.*, 2006).

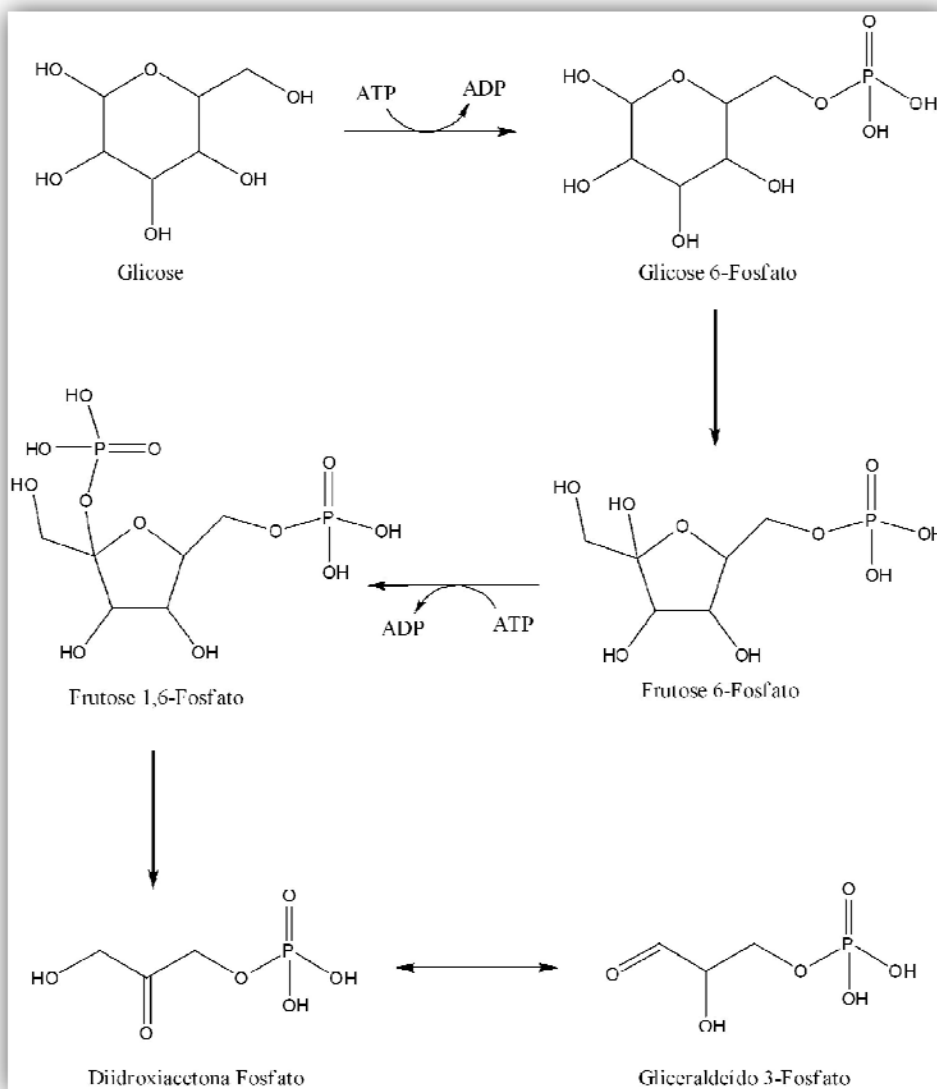


Figura 6 - Primeira fase da glicólise

No segundo passo, a molécula de glicose 6-fosfato é isomerada em frutose 6-fosfato, uma cetose. Esta isomerização possui um papel crítico na glicólise, já que o rearranjo da carbonila e da hidroxila no C-1 e C-2 é de extrema importância para o início dos próximos

dois passos. No terceiro passo, há uma nova fosforilação da molécula de frutose 6-fosfato gerando a frutose 1,6-bifosfato. Esta reação é essencialmente irreversível em condições intracelulares, onde também é conhecido como o passo de comprometimento da glicólise. Tanto a glicose 6-fosfato e quanto à frutose 6-fosfato podem ter outros caminhos metabólicos, entretanto o a frutose 1,6-bifosfato é exclusiva da glicólise (Berg *et al.*, 2006).

O quarto passo é a quebra da frutose 1,6-bifosfato, onde dois açúcares de três carbonos são formados, o gliceraldeído 3-fosfato, uma aldose, e a diidroxiacetona fosfato, uma cetose. O quinto e último passo da fase preparatória da glicólise é a isomerização das trioses formadas, pois somente a molécula de gliceraldeído 3-fosfato pode ser diretamente degradada nos passos subseqüentes da glicólise. Esta reação completa a fase preparatória da glicólise, onde o açúcar foi fosforilada no C-1 e C6 e depois quebrada para formar duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato (Berg *et al.*, 2006).

Após a fase preparatória, descrita anteriormente, inicia-se a fase de ganho de ATP ou fase de oxidação (figura 7). A conversão das duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato geradas na fase preparatória em duas moléculas de piruvato é acompanhada pela formação de quatro moléculas de ATP. Entretanto, devido ao investimento de duas moléculas de ATP por molécula de glicose da fase preparatória, o ganho bruto de ATP por molécula de glicose é de apenas duas moléculas de ATP (Murray *et al.*, 2003).

O primeiro passo da fase de ganho de ATP é a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato, este é a primeira das duas reações de conservação de energia que eventualmente levam a formação de ATP. O acceptor de elétrons é uma molécula de NAD^+ , a qual gera a co-enzima reduzida NADH, os outros prótons são liberados livremente, bem como a fosforilação realizada nesta etapa é a partir de um fosfato inorgânico, também conhecida como fosforilação no nível de substrato. No segundo passo, uma molécula de fosfato é transferida para uma molécula de ADP a partir da molécula de 1,3-bifosfoglicerato, onde formara uma molécula de 3-fosfoglicerato. Estas duas etapas estão ligadas energeticamente, no qual a molécula de 1,3-fosfoglicerato é o intermediário comum (Berg *et al.*, 2006).

O terceiro passo da fase de ganho de ATP é a conversão do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato. O grupamento fosfato é transferido, reversivelmente, entre o C-3 e o C-2 do glicerato, onde íons magnésio são essenciais para esta reação. No quarto passo ocorre a desidratação do 2-fosfoglicerato, formando assim fosfoenolpiruvato. Apesar do 2-fosfoglicerato e o fosfoenolpiruvato conterem praticamente a mesma quantidade total de

energia, a perda da molécula de água do 2-fosfoglicerato causa uma redistribuição da energia dentro da molécula, aumentando incrivelmente a energia livre (Berg *et al.*, 2006).

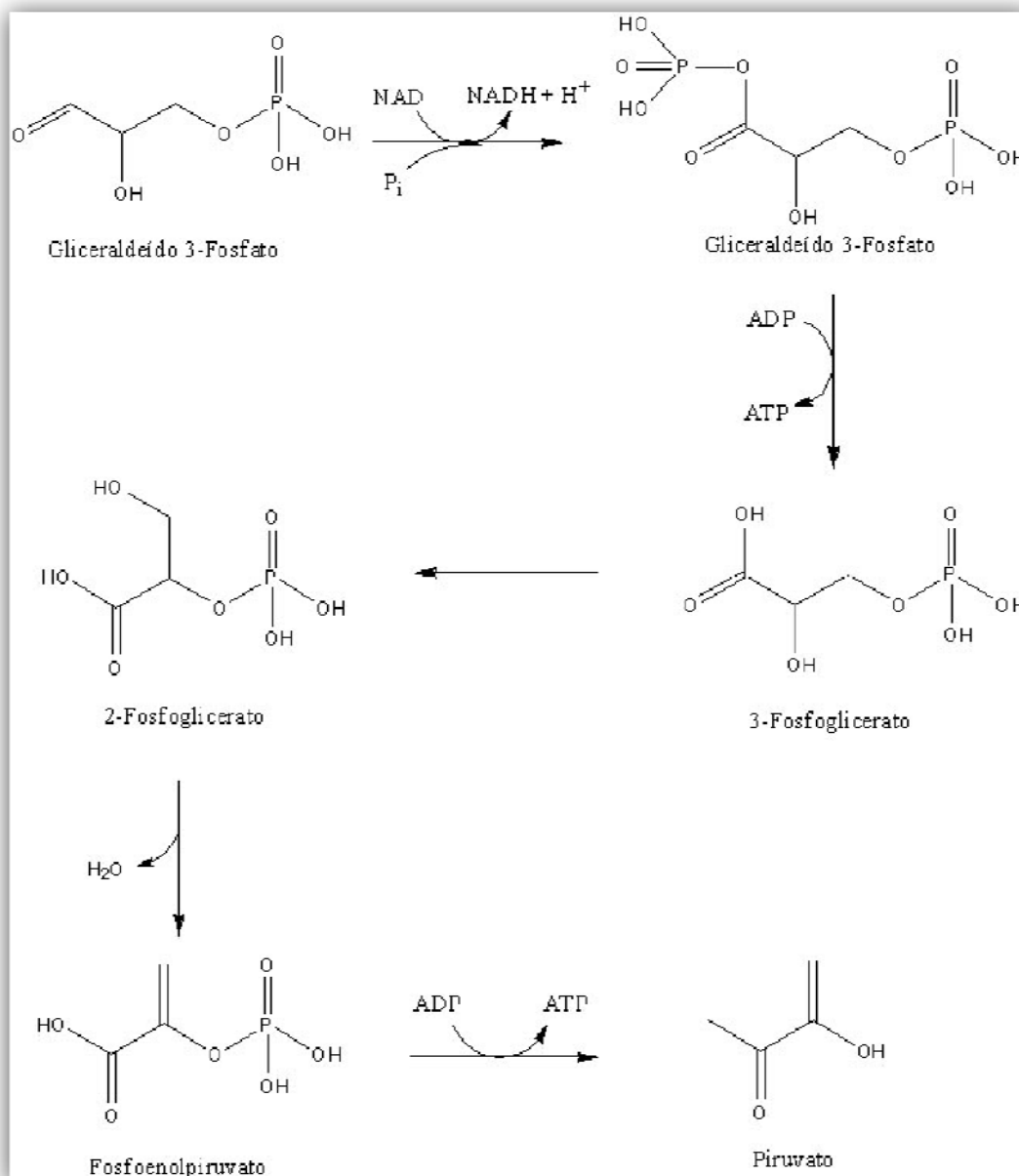
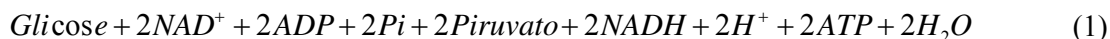


Figura 7 - Segunda fase da glicólise, fase de ganho de ATP

A glicólise é terminada com a quinta etapa da fase de ganho de ATP, onde o grupo fosfato do fosfoenolpiruvato é transferido para uma molécula de ADP, onde forma uma molécula de piruvato. Nesta fosforilação em nível de substrato, o produto, piruvato, aparece primeiramente em sua forma *enol*, e depois é tautomerizada rapidamente para sua forma *ceto*, a qual é predominante em pH neutro (Berg *et al.*, 2006).

Com isso, é possível construir o balanço energético da glicólise, levando em consideração o destino do esqueleto carbônico da glicose, a introdução de fosfato inorgânico e ADP, liberação de ATP e a rota de elétrons nas reações de oxidação-redução.



onde, o lado esquerdo da equação (1) mostra todos os acréscimos de NAD^+ , ADP e P_i , e o lado esquerdo exibe todas as moléculas formadas (Berg *et al.*, 2006).

As duas moléculas de NADH formadas pela glicólise são reoxidadas à NAD^+ . Dependendo do organismo, esta reação de reoxidação pode ocorrer aerobicamente, pela cadeia transportadora de elétrons, a qual é realizada nas mitocôndrias, em eucariotos. Bem como anaerobicamente, a qual terá destinos distintos de acordo com o tipo de microrganismo, seja na formação de lactato, seja na formação de etanol (Murray *et al.*, 2003).

2.3.2 Transição Entre Aerobiose e Anaerobiose

Microrganismos facultativos, tais como *E. coli* e *Pseudomonas* sp. são capazes de modificar seu metabolismo para adaptar seu crescimento em condições aeróbicas ou anaeróbicas. A transição entre aerobiose e anaerobiose é acompanhada pelas alterações na taxa, rota e eficiência do fluxo eletrônico. Sob condições anaeróbicas, sem aceptores de elétrons alternativos, o piruvato é convertido em formato, acetato ou etanol, CO_2 e H_2 gasosos. Entretanto, o rendimento energético torna-se maior quando aceptores de elétrons alternativos estão disponíveis. Em condições aeróbicas, ao menos cinco oxirredutases são produzidas (Hogg, 2005).

As bactérias controlam a produção de varias enzimas utilizadas na rota respiratória, primeiramente, pela resposta da disponibilidade de oxigênio no meio, e em segundo, pela disponibilidade de aceptores de elétrons alternativos. Existe uma hierarquia ou preferência pelo substrato de uso, e quando vários aceptores de elétrons estão presentes simultaneamente, o aceitor mais favorecido energeticamente será utilizado inicialmente.

O nitrato é o aceitor de elétrons preferido por células anaeróbicas por conta do alto potencial do conjunto nitrato/nitrito. O nitrato, em baixas concentrações, induz a produção da enzima nitrato redutase e a nitrito redutase de alta afinidade, com isso a célula ira produzir energia ao máximo com a presença de nitrato. Entretanto, em altas concentrações de nitrato, a nitrato redutase ainda será expressa, mas uma nitrito redutase de baixa afinidade será expressa no lugar da de alta afinidade. Esta regulação diferencial evita a geração de uma força motora

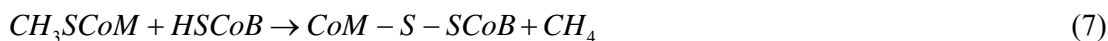
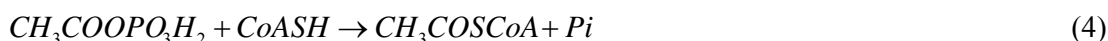
de prótons alta, quando há uma grande quantidade de energia é gerada a partir de da nitrato redutase. Contudo, a nitrato redutase ainda é necessária para redução da toxicidade do nitrito produzido (Hogg, 2005).

2.3.3 Metanogênese

Os organismos produzem energia pelo uso de H_2 para reduzir gás carbônico (CO_2) formando metano (CH_4). Estes organismos podem também descarboxilar o acetato, produzindo CO_2 e CH_4 . A formação de metano representa a porção terminal de uma serie de reações anaeróbicas complexas que ocorrem na natureza, e envolvem os organismos que degradam biopolímeros, tais como celulose, amido ou proteínas, em acetato, H_2 e CO_2 .

A conversão destes materiais orgânicos complexos nestes produtos simples requer a ação primaria e secundária de organismos aeróbicos. A ação primaria gera acetato, H_2 e CO_2 . Outros produtos requerem uma degradação adicional pela ação secundaria destes organismos. Os microrganismos metanogênicos conduzem a porção final da seqüência de conversão, onde a formação de CH_4 é o produto final.

A grande maioria dos microrganismos metanogênicos produz CH_4 a partir de H_2 e CO_2 como está descrito na equação (2). Já a conversão de acetato em CH_4 e CO_2 envolve os passos descritos nas equações (3) a (8).



Onde, CoASH é co-enzima A, HSCoM é co-enzima M, e HSCoB é co-enzima B. Todos os microrganismos metanogênicos utilizam o passo de maior rendimento de energia associado com a redução do grupamento metila a CH_4 , contudo, espécies diferentes podem obter elétrons para o passo redutivo a partir da oxidação de vários substratos.

2.3.4 Metabolismo de Compostos Aromáticos

Muitos microrganismos podem utilizar compostos aromáticos como fonte única de carbono. A estrutura do anel aromático é degradada e seus produtos convertidos em compostos que possam entrar nas rotas centrais do metabolismo provendo assim fonte de carbono e energia. A degradação de compostos aromáticos é de grande importância por conta da ampla ocorrência destas substâncias na natureza, tanto quanto em materiais sintéticos (Hogg, 2005).

Os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos facilitam a reentrada do carbono destes compostos nos ciclos naturais biológicos, prevenindo assim, sua acumulação no meio ambiente. A acumulação de hidrocarbonetos aromáticos tóxicos, particularmente herbicidas, pesticidas, corantes e outros produtos de descarte industrial, podem levar a contaminações sérias de águas de superfície, causando sérios danos ecológicos (Hogg, 2005).

Um aspecto fundamental do metabolismo de compostos aromáticos envolve a conversão da estrutura em anel, para uma forma que pode ser clivada para gerar uma cadeia aberta, a qual pode ser metabolizada em compostos intermediários das rotas metabólicas centrais. Vários mecanismos de oxidação de anéis aromáticos são conhecidos. *Pseudomonas putida*, por exemplo, oxida o grupamento metila do tolueno para forma álcool benzênico. Reações subsequentes levam a formação de catecol, o qual entra na rota de meta-clivagem gerando a formação de ceto-ácidos. O metabolismo de compostos aromáticos pela *P. putida* representa um exemplo de indução sequencial de enzimas (Hogg, 2005).

Compostos com estruturas mais complexas, tais como naftaleno, antracina e fenantrina passam inicialmente por uma fase de fissão dos anéis aromáticos para formar estruturas que possam ser degradadas mais facilmente. Compostos clorados, tais como clorobenzoato, normalmente requerem dealogenação inicial, antes da hidroxilação dos anéis para facilitar a fissão do anel. Normalmente, quanto mais complexo for o anel aromático, mais resistente são para a degradação (Hogg, 2005).

As *Pseudomonas* sp. são bastante conhecidas pela sua capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos. Em condições naturais, um consórcio de microrganismos pode ser necessário para degradar rapidamente um composto de quatro ou mais anéis fusionados. Em condições anaeróbicas, os anéis aromáticos são atacados redutivamente. A figura 8 demonstra a degradação anaeróbica de uma molécula de benzoato (Hogg, 2005).

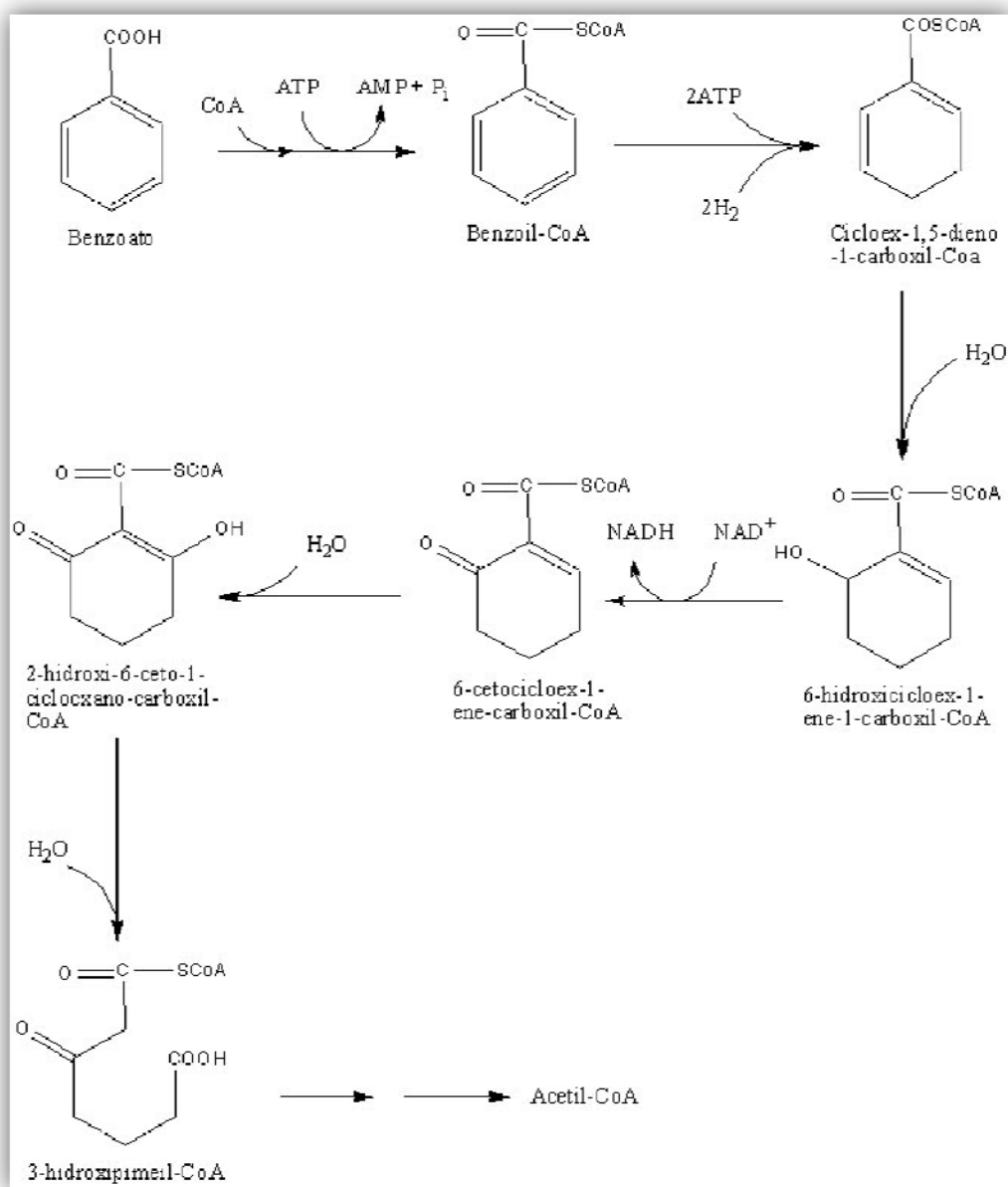


Figura 8 - Degradação anaeróbica do benzoato

2.3.5 Metabolismo de Corantes

A primeira etapa para a degradação bacteriana de corantes azos, tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, é a redução da ligação $-\text{N}=\text{N}-$. Esta redução pode envolver diferentes mecanismos, tais como enzimas, mediadores redox de baixo peso molecular, redução química por redutores biogênicos como o sulfito, ou uma combinação destes (figura 9). Além disso, o local desta reação pode ser intracelular ou extracelular.

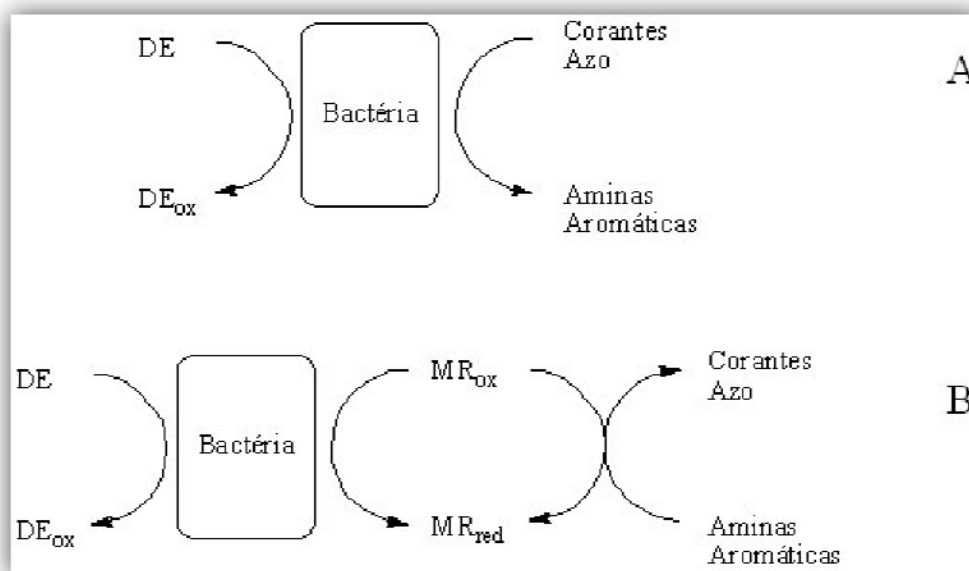


Figura 9 - Representação esquemática dos mecanismos de redução de corantes em condições anaeróbicas. A – Mecanismo enzimático direto; B – Mecanismo biológico mediado. DE = Doador de elétrons; e MR = Mediador redox.

2.3.5.1 Mecanismo Enzimático Direto

Este mecanismo envolve a transferência de equivalentes redutores mediados enzimaticamente, gerados pela oxidação do complexo substrato-coenzima em corantes. Estas enzimas podem ser específicas, catalisando apenas esta redução, ou não específica. As enzimas não específicas catalisam a redução de uma ampla gama de substratos. Devido a sua natureza não específica, estas enzimas podem reduzir corantes.

A presença de azorredutases em bactérias anaeróbicas que podem descolorir corantes azos sulfonados durante seu crescimento em meio sólido ou complexo foi descrito inicialmente por Rafii *et al.* (1990). As cepas descritas pertenciam principalmente ao gênero *Clostridium* e *Eubacterium*. As azorredutases dessas cepas eram sensíveis ao oxigênio e eram produzidas constitutivamente e liberadas no meio extracelular. Investigações posteriores com *C. perfringens* mostraram que a redução de corantes azos é catalisada pela enzima FAD desidrogenase, a qual era capaz de reduzir compostos nitro-aromáticos (Rafii e Cerniglia, 1995). Análises em microscopia imunoelétrica demonstraram que a enzima é secretada à medida que é produzida (Rafii e Cerniglia, 1995).

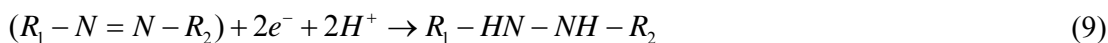
Ao contrário dos estudos extensivos das azorredutases sensíveis ao oxigênio de bactérias por Rafii e seus colaboradores (Rafii *et al.*, 1990; Rafii e Cerniglia, 1995), a fonte de NADH necessária para a atividade extracelular das enzimas ainda não é clara.

Outro mecanismo de descoloração pode envolver redutases dependentes de flavina citosólicas, no qual os elétrons são transferidos via flavinas solúveis para os corantes azos. Entretanto, os estudos de Russ *et al.* (2000) com uma cepa recombinante de *Sphingomonas* BN6 demonstrou que a redução de corantes azo sulfonados por azorredutases dependentes de flavina citosólicas é observada principalmente *in vitro* e é de pouca importância *in vivo*.

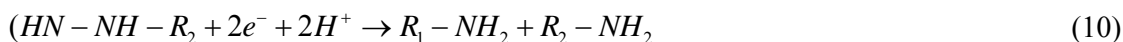
Estes achados de Russ *et al.* (2000) sugerem que, em células vivas com membranas celulares intactas, outros sistemas enzimáticos e/ou outros mediadores redox são responsáveis pela redução dos corantes azos. Nas bactérias que possuem sistema de transporte de elétrons nas suas membranas, com no caso das bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, tais como *Sphingomonas* e *Pseudomonas*, a transferência de elétrons da cadeia respiratória aos mediadores redox apropriados pode ocorrer diretamente. Se redutases intracelulares estão envolvidas no processo, deve ser assumido que mediadores diferentes dos cofatores de flavina, com uma maior habilidade para passar através da membrana, estão envolvidos.

Em condições anaeróbicas, um baixo potencial redox (< -50 mV) pode ser atingido, o qual é necessário para que haja uma descoloração efetiva de corantes (Bromley-Challenor *et al.*, 2000). A remoção de cor em condições anaeróbicas é também conhecida como redução do corante na qual a literatura mostra principalmente a bioquímica da redução.

A quebra da ligação azo, $-N=N-$, envolve a transferência de quatro elétrons (equivalente redutores), no qual procede em duas etapas na ligação azo. Em cada etapa, dois elétrons são transferidos para o corante, o qual age como um aceptor de elétrons final:



(hidroazo intermediário)



(Quebra redutora da ligação azo)

O mecanismo exato da redução de corantes azos, onde este ocorre intracelular ou extracelular, ainda é assunto de investigação, tanto quanto o papel de carregadores de elétrons intracelulares como as flavinas.

2.4 Imobilização Celular

Devido as suas excelentes propriedades funcionais, as enzimas e células são capazes de catalisar a maioria dos processos químicos sob a maioria das condições ambientais e experimentais (Wong e Whitesides, 1994). As células foram modificadas ao longo dos tempos, sofrendo evolução biológica, com o intuito de otimizar seu comportamento diante das cadeias metabólicas complexas.

Desta forma, enzimas e células possuem excelentes propriedades catalíticas, da mesma forma que possuem algumas características que não são atraentes industrialmente. A bioengenharia, desde indústrias biológicas até indústrias químicas, é uma das metas mais excitantes, complexas e interdisciplinares da biotecnologia. A implementação de enzimas e células em larga escala como catalisadores industriais requerem uma utilização multidisciplinar de várias técnicas: (a) seleção de células e enzimas com propriedades desejadas (Robertson e Steer, 2004), (b) melhoramento das propriedades celulares e enzimáticas através de técnicas de biologia molecular (Van Der Burg e Eijssink, 2002), (c) melhoramento das propriedades celulares e enzimáticas através de técnicas de imobilização e pós-imobilização (Betancor *et al.*, 2003), e (d) o melhoramento das propriedades celulares através da engenharia de reação e reatores (Spiess *et al.*, 1999).

O principal objetivo da imobilização enzimática e celular é a reutilização industrial das enzimas e células em vários ciclos reacionais ou o uso contínuo do biocatalisador por um longo período de tempo. De um ponto de vista industrial, simplicidade e eficiência são as propriedades principais para as técnicas de imobilização.

2.4.1 Escolha dos Suportes

As características de uma matriz são de extrema importância para determinar o desempenho de um sistema imobilizado. As propriedades ideais do suporte incluem resistência a compressão, hidrofobicidade, inerte as enzimas, biocompatibilidade e disponibilidade a baixos custos (Trevan, 1980; Brodelius e Mosbach, 1987).

Os suportes podem ser classificados em inorgânicos e orgânicos de acordo com a sua composição química (tabela 4). Os suportes orgânicos podem ser subdivididos em polímeros naturais e sintéticos.

Tabela 4 - Classificação dos suportes

	Naturais	Sintéticos
Orgânicos	Polissacarídeos	Poliestireno
	Proteínas	Poliacrilamida
	Carbono	Poliuretano
Inorgânicos	Naturais	Processados
	Bentonita	Vidro
	Sílica	Metais

As características físicas das matrizes (tais como diâmetro médio da partícula, absorção de água, força mecânica, e compressão) são de grande importância para o desempenho do sistema imobilizado e determina o tipo de reator a ser utilizado. Particularmente, o diâmetro dos poros e tamanho da partícula determina a área total de superfície e assim, afeta criticamente a capacidade de imobilização da matriz. Suportes não porosos possuem poucas limitações difusionais, mas possuem uma baixa capacidade de imobilização. Por outro lado, suportes porosos são geralmente escolhidos por conta sua grande área de superfície e por prover uma proteção do ambiente (Gemeiner, 1992).

2.4.2 Métodos de Imobilização

2.4.2.1 Métodos de Imobilização Irreversíveis

O conceito de imobilização irreversível significa que uma vez que o biocatalisador é ligado ao suporte ele não pode mais ser separado sem destruir o biocatalisador ou o suporte. O procedimento mais comum de imobilização irreversível é a ligação covalente, encapsulamento e ligação cruzada.

A imobilização por métodos baseados na formação de ligações covalentes estão entre uma das mais difundidas. Uma vantagem deste método é que por conta da natureza estável das ligações formadas, o catalisador não é liberado na solução após o uso.

O encapsulamento é baseado na oclusão do catalisador em uma rede polimérica que permite que o substrato e o produto passem através do suporte, retendo o catalisador (O'driscoll, 1976). O uso prático deste método é limitado por limitações de transferência de massa através de membranas ou géis.

2.4.2.2 Métodos de Imobilização Reversíveis

Por conta do tipo de ligação entre o catalisador e o suporte, a imobilização pode ser desfeita em condições brandas. O uso de métodos irreversíveis é fortemente atrativo por razões econômicas, pois quando a atividade do catalisador decai, o suporte pode ser regenerado e então recarregado com catalisadores novos. Na verdade, o custo do suporte é geralmente o fator primário do custo total da imobilização (Gupta e Mattiasson, 1992).

2.4.3 Imobilização de Células em Alginato

Um dos polímeros naturais mais freqüentemente utilizados na imobilização de células é o alginato. Por conta de sua gelação suave e propriedades biocompatíveis e biodegradativas, o alginato tem sido utilizado amplamente nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (Yang e Wright, 1999).

Os alginatos são polissacarídeos de ocorrência natural extraídos de algas marrons (*Phaeophyceae*) encontradas em águas rasas das zonas temperadas. Embora, Krefting (1896) tenha purificado o alginato na década de 1880, somente na década de 1930 que o alginato foi explorado comercialmente pela primeira vez. Diferentes espécies de algas marrons, tais como *Laminaria hyperborea* e *Macrocystis pyrifera*, são responsáveis pela produção de alginatos com diferentes composições químicas (Haug *et al.*, 1966). Na realidade, os alginatos são uma família de copolímeros binários lineares de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G).

Sob condições controladas, alginatos formam géis com uma grande quantidade de cátions divalentes. A rigidez do gel iônico de alginato aumenta de acordo com a afinidade do íon na seguinte ordem: $Mn > Co > Zn > Cd > Ni > Cu > Pb > Ca > Sr > Br$ (Smidsrod, 1974). Entretanto, a maioria dos íons não pode ser utilizada para imobilização de células para o uso terapêutico. Normalmente, íons Ca^{+2} são os mais empregados freqüentemente para tais fins por conta de sua baixa toxicidade. A habilidade de formar géis do alginato é principalmente relacionada ao conteúdo de ácido gulurônico.

A força dos géis depende do tamanho molecular e da composição do alginato. Por exemplo, alginatos com grande quantidade de ácido gulurônico ligam-se com os íons divalentes melhor que alginatos com baixa quantidade, formando assim um gel com uma força mecânica maior (Martinsen *et al.*, 1989), maior estabilidade de compostos quelantes (Skjak-Braek e Martinsen, 1991), e alta porosidade.

A alta porosidade do alginato pode ser explicada pela alta concentração de ácido gulurônico, o qual cria redes mais estáticas e abertas quando comparado com alginatos com baixa concentração de ácido gulurônico. Outras variáveis que podem ser levadas em consideração quando as perolas de alginato são produzidas incluem: tipo e viscosidade do alginato, pH, temperatura, presença de agentes quelantes, tais como EDTA ou citrato, fonte e concentração dos íons de cálcio e método de microencapsulação.

2.4.4 Imobilização de Células em Espumas de Poliuretano

A adsorção em superfícies representa uma forma particular de adesão celular baseada na habilidade de certos microrganismos de fixarem-se em superfícies sólidas por ligações físico-químicas naturais (Moonmangmee *et al.*, 2000). As espumas de poliuretano adquiriram recentemente uma grande relevância como um carreador, um fato exemplificado pelo aumento do número de aplicações descritas na literatura. Estas aplicações incluem a remoção de compostos orgânicos (Hori *et al.*, 2001; Manohar *et al.*, 2001; Moe e Irvine, 2001b; 2001a; Yang *et al.*, 2003), controle de odor (Burgess *et al.*, 2001), fermentação acética (De Ory *et al.*, 2004), remoção de hidrocarbonetos (Holubar *et al.*, 1994) e oxidação de sulfato ferroso (Armentia e Webb, 1992).

A espuma de poliuretano é um suporte inerte com boas propriedades mecânicas (alta resistência e elasticidade) e baixo custo comercial. Este material também possui uma alta porosidade (próxima dos 97%) e com isso possui uma grande área de superfície. Além disso, a espuma de poliuretano não possui problemas em seu escalonamento, tais como outras matrizes de encapsulamento, já que grandes volumes deste suporte podem ser preparados facilmente.

Outra vantagem importante da espuma de poliuretano é que os problemas de difusão gasosa podem ser reduzidos como resultado aos tamanhos dos poros, o que é um fator relevante para os microrganismos aeróbicos. Cubos de espuma comercial podem ser observados na figura 10.

O processo de imobilização em espumas de poliuretano pode ser explicado através do equilíbrio de adsorção e desorção na formação de biofilme. Quando o biofilme imobilizado é formado (adsorção), uma perda contínua de células (desorção) ocorre simultaneamente, especialmente se o reator é agitado ou contínuo. Desta forma, uma taxa de agitação, ou taxa de fluxo deve ser estabelecida para que haja um balanço satisfatório entre estes dois efeitos.



Figura 10 - Cubos de espuma de poliuretano comercial

Por outro lado, uma agitação vigorosa aumenta as condições gerais de transferência de massa na biomassa submersa e, como consequência, aumenta a população total de biomassa e o número de células absorvidas na matriz. Entretanto, tanto os efeitos de erosão, como os efeitos das tensões de colisão podem ser aumentadas pela agitação turbulenta, diminuindo seriamente o processo de adsorção celular (Mori, 1985; Van Loosdrecht *et al.*, 1995).

Do mesmo modo, a quantidade de biomassa intersticial (células submersas no líquido remanescente dentro da estrutura interna da espuma de poliuretano) constitui uma fonte crucial de biomassa potencialmente imobilizada para a adsorção-desorção contínua e tem uma grande relevância para o sucesso de fermentações subseqüentes (De Ory *et al.*, 2000).

2.5 Proteômica

O termo proteoma foi utilizado pela primeira vez por Wilkins *et al.* (1995), como sendo o complemento protéico do genoma. Pode-se considerar o proteoma como a expressão protéica de uma célula, um tecido, um órgão, ou até mesmo de um organismo, em um determinado momento, em uma condição específica. Pode-se afirmar que há apenas um genoma para um organismo, entretanto, há um numero muito grande de proteomas para o mesmo organismo.

Em meados dos anos 1970, foi desenvolvida a técnica de eletroforese bidimensional para o estudo de proteínas (O'farrel, 1975). Esta técnica possibilitou a separação simultânea de milhares de proteínas em um único experimento. Além disso, permitiu a detecção de modificações pós traducionais, as quais não podem ser mensuradas através do seqüenciamento genético (López, 2007).

De certa forma, ainda não há uma plataforma de alta capacidade para analisar simultaneamente todas as propriedades das proteínas, entretanto, a análise protéica por eletroforese bidimensional, com posterior análise em espectrofotômetro de massa é o método mais desenvolvido e versátil existente, a qual permite acessar boa parte das características das proteínas como pI, massa molecular, hidrofobicidade e modificações pós traducionais (Rabilloud, 2002).

A eletroforese em duas dimensões em gel de poliacrilamida tem sido o método mais utilizado para obter perfis proteômicos. A maior vantagem desta técnica consiste na possibilidade de separar uma grande quantidade de proteínas – por volta de 2000 – presentes em uma amostra utilizando apenas um gel (Zhu *et al.*, 2003).

A técnica é baseada na focalização isoeletrica (IEF) das proteínas, onde estas são separadas em um gradiente de pH até o ponto estacionário, ou ponto isoeletrico (pI), onde adquirem carga total igual a zero (primeira dimensão). Após esta etapa, as proteínas são separadas de acordo com sua massa molecular através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (segunda dimensão) (O'farrel, 1975; Zhu *et al.*, 2003). O resultado é um perfil onde cada proteína é alocada em um ponto específico ou “*spot*” no gel. Cada *spot* contém múltiplas cópias da proteína correspondente, sendo que a intensidade e área de cada *spot* podem fornecer também dados quantitativos sobre a expressão da mesma.

Assim, a alta resolução dos géis de eletroforese bidimensional deve-se ao fato de que a separação das proteínas depende de parâmetros diferentes na primeira e segunda dimensão, pI e massa molecular, respectivamente (Ong e Pandey, 2001). Desta forma, é possível determinar o perfil global de proteínas em uma amostra distinguindo-as em proteínas ácidas, básicas, de alto ou baixo peso molecular.

Por outro lado, é importante salientar que mesmo separando uma quantidade grande de proteínas, a eletroforese bidimensional não é suficiente para determinar todas elas em virtude das modificações pós-traducionais que as proteínas podem sofrer (Gygi e Aebersold, 2000). Além disso, a eletroforese bidimensional apresenta algumas limitações com relação à detecção de classes específicas de proteínas, como as muito ácidas (pI < 3,5), as muito básicas (pI > 9,0), muito pequenas (< 6 kDa), muito grandes (> 120 kDa), muito hidrofóbicas e as de baixa expressão (cuja quantidade é inferior ao limite de detecção da mesma) (Bienvenut *et al.*, 1999).

2.6 Engenharia de Reatores

A taxa em quem uma reação química ou bioquímica ocorre em um sistema homogêneo depende primariamente da temperatura e da concentração dos substratos e seus produtos. Outras variáveis, tais como concentração do catalisador, concentração dos inibidores ou pH, também afetam a taxa de reação. Já nos sistemas heterogêneos, a taxa de reação torna-se mais complexa, pois esta não é governada somente pela cinética química, mas também pelas taxas de transferência de massa e/ou calor, as quais geralmente têm papéis importantes (Missen *et al.*, 1999).

Um tipo especial de reator heterogêneo envolve os sistemas biológicos com enzimas ou microrganismos que converte algum tipo de material inicial em produtos químicos, farmacêuticos, alimentos e outras substâncias. A conversão de açúcar em etanol através da fermentação representa historicamente um dos mais antigos tipos de reator para a produção de cerveja e vinho. Na fermentação, um substrato tal como a glicose é convertido em um produto pela ação de um microrganismo ou pelo efeito catalítico das enzimas produzidas pelo microrganismo (Luyben, 2007).

Pode-se ver uma enzima como um catalisador biológico, e como tal, leva a uma taxa de conversão que é bem similar àquelas derivadas em sistemas de reações heterogêneas. A expressão da cinética de Michaelis-Menten é uma das formulas padrões em uma fermentação catalisada por enzimas. Ela assume que o substrato e a enzima formam um complexo através de uma reação reversível. Este complexo “enzima-substrato”, o qual é bastante reativo, forma o produto em uma reação irreversível.



A reação de formação do produto (r_p) pode ser então derivada tomando a seguinte forma que representa o comportamento experimental razoavelmente bem:

$$r_p = \frac{kC_{E0}C_S}{C_S + K_M} \quad (12)$$

onde k é a constante para a reação irreversível, C_{E0} é o total da concentração enzimática, C_S é a concentração de substrato, e K_M é a constante de Michaelis-Menten. Tanto k e K_M podem ser funções do pH, temperatura e outras propriedades do meio fermentativo. A partir da equação (12), pode-se perceber que com uma alta concentração de substrato a taxa de formação do produto é independente de C_S e é aproximadamente igual a kC_{E0} . Isto é devido a uma

quantidade limitada de enzima, a qual é requerida para que a reação proceda, e adicionando-se mais substrato a estas condições não irá aumentar a velocidade da reação (Luyben, 2007).

Em baixas concentrações de substrato, a velocidade de formação do produto torna-se uma reação de primeira ordem em relação à C_s . Dentro destas condições, a concentração do substrato torna-se determinante para a formação do produto, e o aumento da C_s produz um aumento proporcional na velocidade. A velocidade de formação é também proporcional a concentração total da enzima sob todas as condições da concentração de substrato (Luyben, 2007).

O substrato também pode ser convertido em produto nos fermentadores por células ou microrganismos, os quais não atuam apenas como catalisadores da reação, mas também se reproduzem para promover ainda mais a reação. O substrato alimentado à biomassa celular provê carbono, hidrogênio e oxigênio aos organismos. O substrato é também a fonte de energia para as células, mantém a sua existência e possibilitam seu crescimento (Eibl *et al.*, 2009).

Tendo em vista que as reações bioquímicas e sua estequiometria não são bem definidas, uma abordagem mais empírica é utilizada para se acessar a cinética da reação. As unidades de concentração de massa (ex.: g l^{-1}) são utilizadas conjuntamente com os coeficientes de rendimento para calcular a distribuição dos produtos formados e a quantidade de substrato consumido. Na ausência de qualquer efeito de inibição e na presença de um suprimento infinito de substrato, a velocidade do crescimento celular é autocatalítica, ou seja, depende apenas da concentração celular.

$$r_X = \mu_{\max} C_X \quad (13)$$

Onde $\mu_{\max}$ é a velocidade máxima do crescimento celular (tipicamente expressa em h^{-1}) e C_X é a concentração de massa celular (g l^{-1}). Em que a velocidade de crescimento celular é inicialmente exponencial com o tempo. O valor de $\mu_{\max}$ depende da temperatura e do pH para cada microrganismo (Eibl *et al.*, 2009).

2.6.1 Reator em Batelada

O reator em batelada é geralmente utilizado para a investigação básica da cinética das reações químicas e/ou bioquímicas em laboratório, bem como em operações de larga escala em qual um número grande de produtos são produzidos por diferentes reações. Os reatores em batelada são um receptáculo perfeitamente misturado no qual o substrato são

convertidos em produtos ao longo do ciclo da batelada. O substrato é adicionado ao reator inicialmente e só então o catalisador é adicionado para que a reação seja iniciada. A concentração do substrato decai ao longo do tempo, enquanto a concentração do produto aumenta (Luyben, 2007).

2.6.2 Reator Contínuo em Tanque Agitado (CSTR)

O reator contínuo em tanque agitado (CSTR) é normalmente usado para reações de fase líquida, o qual é tanque encamisado com agitação, com uma entrada de alimentação e uma saída para o produto formado. Assume-se que o líquido do reator é misturado perfeitamente, ou seja, sem nenhum gradiente radial, axial ou angular de temperatura ou composição. O fluxo de saída do produto tem a mesma composição e temperatura que o conteúdo dentro do reator (Missen *et al.*, 1999).

Estas características de um CSTR geram uma falha deste reator, pois a concentração do substrato no reator é a mesma que a concentração do substrato na saída do produto. A concentração do substrato em um CSTR é inversamente proporcional a sua taxa de conversão. Se uma taxa de conversão alta é desejada, a concentração do substrato deve ser pequena. Entretanto, o uso de vários reatores em linha ajuda a aumentar a taxa de conversão, pois o ultimo reator terá uma concentração bem pequena do substrato (Missen *et al.*, 1999).

2.6.3 Reator *Plug Flow*

A característica mais marcante de um reator *Plug Flow* é a sua natureza na distribuição dos parâmetros, ou seja, as variáveis mudam ao longo do tempo, bem como ao longo do reator. O reator *Plug Flow* é um reator em cilíndrico, onde o fluido contendo o substrato flui ao longo do reator em uma velocidade linear fixa, em que não haja mistura axial, bem como sem gradientes radiais de temperatura ou composição (Luyben, 2007).

Existem duas diferenças básicas entre um reator *Plug Flow* e um CSTR. A primeira é a variação das concentrações de substrato e produto ao longo do reator. A segunda é resposta dinâmica, em um CSTR ao mudar alguma variável em sua alimentação, a resposta é mensurada imediatamente em sua saída. Já em um *Plug Flow* é necessário que o distúrbio passe por toda a coluna até a sua saída (Missen *et al.*, 1999).

Quando há, na saída de um reator *Plug Flow*, uma concentração significativa de substrato, pode-se gerar um reciclo. O uso do reciclo, ou seja, o retorno do fluxo de saída para o fluxo de alimentação pode ter dois motivos: (a) conservar o meio quando ele não foi

totalmente convertido ao produto desejado, e/ou (b) aumentar o rendimento do processo. O reciclo serve para misturar o produto com a solução de alimentação, com isso diluindo o substrato e fazendo que o *Plug Flow* se aproxime de um CSTR em produtividade (Missen *et al.*, 1999).

3 Materiais e Métodos

Este capítulo apresenta o material e a metodologia usados nos experimentos, os processos analíticos utilizados durante o desenvolvimento da tese. A metodologia usada na fermentação é detalhada em todas as etapas do processo, desde a manutenção da cultura até a sua aplicação em reator anóxico. Também são descritos os procedimentos para a otimização via planejamento experimental.

3 Materiais e Métodos

3.1 Microrganismos

As amostras utilizadas foram obtidas das coleções do Instituto de Antibióticos (IA) da Universidade Federal de Pernambuco e da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas, previamente identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. oleovorans* e *P. putida*.

3.2 Conservação dos Microrganismos

Os microrganismos foram preservados em criotubos contendo miçangas de vidro e glicerol a 10%. Cada criotubo foi inoculado a partir da mesma cultura inicial e continha em média 25 miçangas de vidro, possibilitando assim a utilização da mesma geração de células em todos os experimentos.

3.3 Meio de Cultura para Adaptação dos Microrganismos

Uma miçanga de vidro foi inoculada em um Erlenmeyer contendo 20 mL de caldo nutriente (extrato de carne 3 g l⁻¹; e peptona 5 g l⁻¹), o qual foi incubado na temperatura ótima de cada microrganismo (28 ou 37 °C) por 24 horas, tempo necessário para que a cultura atinja o fim da fase exponencial ou início da fase estacionária.

3.4 Corantes

Os corantes têxteis utilizados foram doados pela Clariant do Brasil (São Paulo, Brasil) e tendo em vista que os mesmos são de uso comercial da empresa, seus nomes e estrutura molecular serão omitidos ao longo do trabalho. Aos corantes utilizados, foram determinadas siglas de identificação, as quais estão listadas a seguir: B15; B19; B31; B36; B54; B69; B86; R34; R90; R91; Y15; Y79; e Y87. Por outro lado, o corante Alaranjado de Metila (Sigma) foi utilizado como corante azo modelo.

3.5 Detecção Qualitativa em Placas dos Microrganismos Degradores de Corantes

Os microrganismos foram estriados em placas de Petri e então incubados por 96 horas, com diferentes corantes como fonte única de carbono em Meio Mínimo Basal

(NaCl 7 mg l⁻¹; CaCl₂ 2H₂O 4 mg l⁻¹; MgSO₄ 7H₂O 2 mg l⁻¹; Ágar bacteriológico 3 g l⁻¹; e corante 1 g l⁻¹), e o pH ajustado para 7,0.

3.6 Detecção Quantitativa em Tubos dos Microrganismos Degradores de Corantes

Os microrganismos foram inoculados em caldo nutriente contendo 50 mg l⁻¹ de corante em condições estáticas, anóxicas e livres de luz. Após 48 horas de crescimento, foi calculado o percentual de descoloração de todos os microrganismos frente a cada corante utilizado.

3.7 Planejamento Fracionário para o Processo de Descoloração de Corantes

Uma pré-cultura em fase exponencial final, ou em fase estacionária inicial foi inoculada em tubos rosqueados contendo caldo nutritivo suplementado corante, onde foram realizados os experimentos para otimização da descoloração por planejamento estatístico fracionário.

O estudo para determinação das melhores condições de cultivo na descoloração do corante escolhido para continuidade do estudo foi feito inicialmente por um planejamento estatístico fracionário (2ⁿ⁻²), onde as variáveis estudadas estão descritas na tabela 5.

Tabela 5 - Níveis das variáveis utilizadas na descoloração de corantes em cultivo submerso

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração do corante (mg L ⁻¹)	30	50	70
Agitação (RPM)	0	75	150
pH	6,0	7,0	8,0
Temperatura (°C)	27	32	37
Tempo de cultivo (horas)	36	48	60
Volume do tubo (%)	25	50	75
Tamanho do inóculo (D.O.)	0,500	1,000	1,500

De acordo com os resultados obtidos no primeiro planejamento estatístico, um segundo planejamento estatístico foi traçado, desta vez um planejamento completo (2^n), o qual foi desenhando visando melhores condições industriais além das melhores condições de descoloração. Os fatores estudados estão descritos na tabela 6. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente com o auxílio do pacote estatístico *Statistica* 7.0 (Statsoft, Inc., USA).

Tabela 6 - Níveis das variáveis estudadas no segundo planejamento, para cultivo submerso

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração do corante (mg L^{-1})	40	55	70
Tempo de cultivo (horas)	24	36	48
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	24	28	32
pH	7,5	8,0	8,5

3.8 Descoloração de Corantes por Cultivo Submerso

Uma pré-cultura em fase exponencial final, ou em fase estacionária inicial foi inoculada em garrafas de 500 ml contendo 160 ml de caldo nutriente contendo $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do corante estudado. Os corantes utilizados foram esterilizados por filtração, em filtro de $0,2 \mu\text{m}$ (Millipore, USA), antes da sua adição em meio de cultura estéril.

A descoloração foi realizada em fermentação estática, pH inicial de 8,5, 32°C , 25% de volume total do reator e cultura inicial com densidade óptica de 0,500 D.O. (aproximadamente $0,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) como descrito previamente (Silveira *et al.*, 2008).

3.9 Descoloração em Culturas Submersas em Fed-Batch

Após o procedimento descrito no item 3.8, as culturas foram alimentadas com uma solução concentrada de corante, com o intuito de retomar a concentração de corante inicial. A alimentação foi realizada sempre que a concentração do corante contido no meio de cultura atingisse valores menores iguais a $3,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.10 Determinação do Crescimento Celular e da Descoloração

As amostras das culturas de descoloração coletadas foram analisadas de acordo com a metodologia descrita por Silveira et al. (2009b):

- a) Quantificação da absorbância da amostra a 600 nm;
- b) Centrifugação por 10 minutos a 13.000 g a 4 °C, e o sobrenadante livre de células quantificado a sua absorbância a 600 nm; e
- c) Quantificação do sobrenadante livre de células a no espectro máximo de absorbância do corante utilizado ($\lambda_{\text{máx}}$).

A quantidade de biomassa produzida foi determinada subtraindo o valor de b do valor obtido em a. A relação entre a densidade ótica a 600 nm ($D.O_{600\text{nm}}$) e a concentração de biomassa é de $D.O_{600\text{nm}} 1,000 \approx 0,32 \text{ g l}^{-1}$ de peso seco celular.

A eficiência de descoloração foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$Descoloração(\%) = \frac{A_{\lambda, \text{inicial}} - A_{\lambda, \text{final}}}{A_{\lambda, \text{inicial}}} \times 100 \quad (14)$$

onde, $A_{\lambda, \text{inicial}}$ é a absorbância inicial e $A_{\lambda, \text{final}}$ é a absorbância final do sobrenadante livre de células.

3.11 Imobilização de Células em Espumas de Poliuretano

Células de uma cultura em fase exponencial final ou fase estacionária inicial foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e para serem imobilizadas em espuma de poliuretano. A espuma de poliuretano, cortada em cubos de um cm^3 , foi lavada com água destilada e autoclavada duas vezes e secas em estufa a temperatura de 37 °C. Cerca de 9×10^9 células suspensas em meio de cultura foram adicionadas a garrafas de tampa rosqueadas contendo os cubos de espuma.

O conteúdo do frasco foi misturado em agitador magnético por duas horas. Os frascos foram acondicionados em agitador orbital por 1 hora a 140 RPM e deixados sob condições de cultura estática por outras 2 horas. Por ultimo, foi adicionado o corante ao meio de cultura e incubado nas condições descritas no item 3.8.

3.12 Imobilização de Células em Alginato

Células de uma cultura em fase exponencial final ou fase estacionária inicial foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e então ressuspensas em PBS (tampão fosfato salino, 137 mM NaCl, 10 mM fosfato, 2,7 mM KCl e 10 mM EDTA em pH = 7,4) em concentrações desejadas previamente planejadas. Esta suspensão de células foi misturada a uma certa massa da alginato também planejada previamente, até a obtenção de uma pasta.

Esta solução (células em PBS/alginato) foi gotejada em uma solução de 4% CaCl₂, obtendo-se esferas contendo as células de *Pseudomonas oleovorans* imobilizadas em alginato de sódio. As esferas preparadas foram separadas da solução de CaCl₂ por filtração em papel filtro 40 e lavadas em água destilada (Silva *et al.*, 2008).

3.13 Planejamento Estatístico Central Composto para Imobilização de Células em Alginato de Sódio

O estudo para determinação das melhores condições para a imobilização de células de *Pseudomonas oleovorans* foi realizado através de um planejamento estatístico (2²) com ponto central composto e as variáveis estudadas estão descritas na tabela 7.

Tabela 7 - Níveis das variáveis utilizadas na imobilização de células em alginato

Variáveis	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Concentração de Alginato (g·l ⁻¹)	15,86	20	30	40	44,14
Concentração de Células (g·l ⁻¹)	0,25376	0,32	0,48	0,64	0,70624

3.14 Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras de *Pseudomonas oleovorans* antes de depois dos processos de descoloração foram centrifugadas (10.000 g por 10 minutos) e fixadas em glutaraldeído (2% v/v) e formaldeído (4% v/v) em temperatura ambiente. As amostras foram pós fixadas em tetróxido de ósmio (1%) contendo ferrocianeto de potássio (0,8%) e ácido tânico (1%), e posteriormente desidratadas em etanol e secas em ponto crítico de CO₂.

As amostras foram então desidratadas em série de etanol, transferidas em óxido de propileno, secadas em ar e montadas em suportes de alumínio com fita de dupla face (ScotchTM), cobertas em ouro em câmara de alto vácuo. As amostras foram então examinadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Joel JSM 5600LV) com aceleração de voltagem de 10 kV e distancia de trabalho de 8 mm (Silveira *et al.*, 2009b).

3.15 Reator Plug Flow

De acordo com os dados descritos por Silveira *et al.* (2009a), foi projetado um reator em coluna (*Plug Flow*) para descoloração de corantes têxteis. Um tubo de vidro medindo 20 cm de altura e 3 cm de diâmetro interno foi encamisado para que o controle de temperatura fosse possível (figura 11). A coluna foi autoclavada por 15 minutos e seca em estufa a 37°C antes de cada utilização.

Rolhas de borracha foram perfuradas para a passagem da tubulação de silicone usada para a alimentação e saída do reator. O controle de temperatura do reator foi realizado utilizando um banho-maria com circulação de água, onde o fluxo d'água foi realizado em contracorrente de acordo com o fluxo interno do reator.

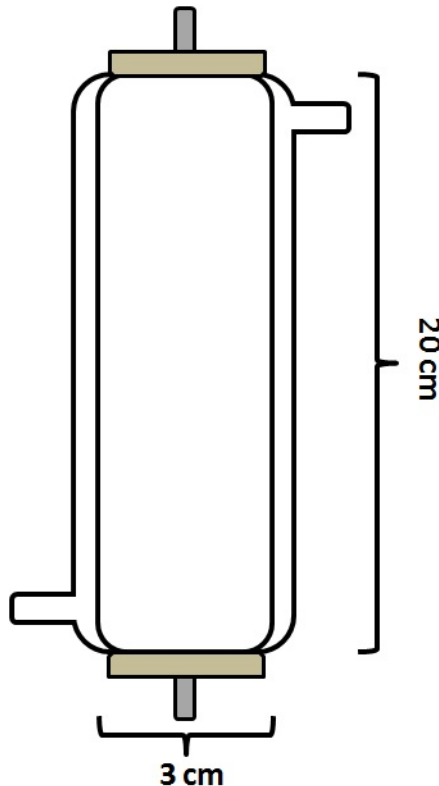


Figura 11 - Desenho esquemático da coluna projetada para a descoloração de efluentes têxteis

A coluna foi empacotada com espumas de poliuretano cortadas em cubos de cm^3 (item 3.11) e com espuma de poliuretano cortada em forma cilíndrica (19 cm de altura e 3 cm de diâmetro).

3.16 Tempo de Residência

Os experimentos para determinar o tempo de residência foram realizados com espumas de poliuretano antes da imobilização celular. Para acessar o tempo de residência no reator empacotado, com espuma em cubos e em formato cilíndrico, foi utilizado o corante B15 como traçador. O corante foi bombeado na coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica com uma velocidade linear de 10 cm h^{-1} até que a absorbância na saída da coluna fosse igual ao valor de entrada. A alimentação foi trocada por H_2O destilada e foram coletadas frações a cada 1 minuto até que o valor da absorbância voltasse à zero.

3.17 Efluente Sintético

O efluente artificial foi composto basicamente por corante 25 mg l^{-1} ; amido solúvel 1000 mg l^{-1} ; ácido acético 150 mg l^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 280 mg l^{-1} ; NH_4Cl 230 mg l^{-1} ; KH_2PO_4 67 mg l^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40 mg l^{-1} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 22 mg l^{-1} ; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 mg l^{-1} ; extrato de levedura 200 mg l^{-1} ; NaCl 150 mg l^{-1} ; NaHCO_3 1000 mg l^{-1} ; e 1 ml l^{-1} de solução de elementos traço ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg l^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100 mg l^{-1} ; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 392 mg l^{-1} ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 248 mg l^{-1} ; $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 177 mg l^{-1} ; e $\text{NiCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mg l^{-1}).

3.18 Descoloração em Reator Plug Flow

O reator foi inoculado com 20 ml de uma cultura em fase estacionária inicial ou fase exponencial final diluída em 100 ml de caldo nutriente diluído 10 vezes. Após a inoculação, as saídas e entradas do reator foram lacradas e o reator mantido sem alimentação em temperatura constante de 32°C por 24 horas.

Após o período inicial de crescimento, a coluna foi alimentada com efluente sintético a uma velocidade linear constante de 15 cm h^{-1} . O estoque de efluente sintético (item 3.17) para a alimentação do reator foi acondicionado em um frasco de vidro de 1 litro, o qual foi bombeado com reciclo através da coluna com o auxílio de uma bomba peristáltica.

4 Referências

Este capítulo apresenta as referências bibliográficas utilizadas no texto, listadas em ordem alfabética em relação ao primeiro autor e ano de publicação.

4 Referências Bibliográficas

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.-H., Cavaco-Paulo, A. e Gubitz, G.M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, n.8, August 1, 2000, p.3357-3362. 2000.
- Adams, C.D. e Gorg, S. Effect of pH and gas-phase ozone concentration on the decolorization of common textile dyes. *Journal of Environmental Engineering*, v.128, n.3, p.293-298. 2002.
- Akhtar, S., Khan, A.A. e Husain, Q. Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere*, v.60, n.3, p.291-301. 2005.
- Alinsafi, A., Khemis, M., Pons, M.N., Leclerc, J.P., Yaacoubi, A., Benhammou, A. e Nejmeddine, A. Electro-coagulation of reactive textile dyes and textile wastewater. *Chemical Engineering and Processing*, v.44, n.4, p.461-470. 2005.
- Anjaneyulu, Y., Sreedhara Chary, N. e Samuel Suman Raj, D. Decolourization of Industrial Effluents – Available Methods and Emerging Technologies – A Review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v.4, n.4, p.245-273. 2005.
- Aplin, Z. e Waite, T.D. Comparison of three advanced oxidation processes for degradation of textile dyes. *Water Science and Technology*, v.42, p.345-354. 2000.
- Armentia, H. e Webb, C. Ferrous sulfate oxidation using *Thiobacillus ferrooxidans* cells immobilised in polyurethane foam support particles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.36, p.697-700. 1992.
- Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A., Sarbolouki, M.N. e Dastgheib, S.M.M. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology*, v.98, n.11, p.2082-2088. 2007.
- Bafana, A., Chakrabarti, T. e Devi, S. Azoreductase and dye detoxification activities of *Bacillus velezensis* strain AB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.77, n.5, p.1139-1144. 2008.

- Banat, I.M., McMullan, G., Meehan, C., Kirby, N., Nigam, P., Smyth, W.F. e Marchant, R. Microbial decolouration of textile dyes present in textile industries effluents. *Industrial Waste Technical Conference*. Indianapolis, USA 1999.
- Banat, M.I., Nigam, P., Singh, D. e Marchant, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, v.58, p.217-227. 1996.
- Barragan, B.E., Costa, C. e Carmen Marquez, M. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments*, v.75, n.1, p.73-81. 2007.
- Becker, H.G. e Sinitsyn, A.P. Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. *Biotechnology Letters*, v.15, n.3, p.289-294. 1993.
- Ben Mansour, H., Corroler, D., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir, L. e Mosrati, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, n.9, p.1670-1677. 2007.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. e Stryer, L. *Biochemistry*. USA: W. H. Freeman. 2006
- Betancor, L., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R. e Guisán, J.M. Preparation of a stable biocatalyst of bovine liver catalase. *Biotechnol. Prog.*, v.19, n.763-767, p.763. 2003.
- Bienvenut, W.V., Sanchez, J.-C., Karmime, A., Rouge, V., Rose, K., Binz, P.-A. e Hochstrasser, D.F. Toward a Clinical Molecular Scanner for Proteome Research: Parallel Protein Chemical Processing before and during Western Blot. *Analytical Chemistry*, v.71, n.21, p.4800-4807. 1999.
- Borrely, S.I., Cruz, A.C., Del Mastro, N.L., Sampa, M.H.O. e Somessari, E.S. Radiation processing of sewage and sludge. A review. *Progress in Nuclear Energy*, v.33, n.1-2, p.3-21. 1998.
- Bousher, A., Shen, X. e Edyvean, R.G.J. Removal of coloured organic matter by adsorption onto low-cost waste materials. *Water Research*, v.31, n.8, p.2084-2092. 1997.
- Brás, R., Isabel A. Ferra, M., Pinheiro, H.M. e Gonçalves, I.C. Batch tests for assessing decolourisation of azo dyes by methanogenic and mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, v.89, n.2-3, p.155-162. 2001.

- Brodelius, P. e Mosbach, K. Immobilization techniques for cells/organelles. In: Mosbach, K. (Ed.). *Methods in enzymology*. London: Academic Press, v.135, 1987. p.173-454
- Bromley-Challenor, K.C.A., Knapp, J.S., Zhang, Z., Gray, N.C.C., Hetheridge, M.J. e Evans, M.R. Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Water Research*, v.34, n.18, p.4410-4418. 2000.
- Burgess, J.E., Parsons, S.A. e Stuetz, R.M. Developments in odour control and waste gas treatment biotechnology: a review. *Biotechnology Advances*, v.19, p.35-63. 2001.
- Carlieel, C.M., Barclay, S.J. e Buckley, C.A. Treatment of exhausted reactive dyebath effluent using anaerobic digestion: Laboratory and full-scale trials. *Water SA*, v.22, n.3, p.225-233. 1996.
- Chang, J.-S., Chou, C., Lin, Y.-C., Lin, P.-J., Ho, J.-Y. e Hu, T.L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, v.35, n.12, p.2841-2850. 2001.
- Chang, J.S. e Lin, Y.C. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol. Prog.*, v.16, n.6, p.979-985. 2000.
- Chen, K.-C., Wu, J.-Y., Liou, D.-J. e Hwang, S.-C.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.101, n.1, p.57-68. 2003.
- Chinwetkitvanich, S., Tuntoolvest, M. e 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.
- Choy, K.K.H., McKay, G. e Porter, J.F. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. *Resources, Conservation and Recycling*, v.27, n.1-2, p.57-71. 1999.
- Christie, R. *Colour chemistry*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 2001
- Clarke, E.A. e Anliker, R. *Organic dyes and pigments. The handbook of environmental chemistry*. New York, USA: Springer Verlag. 1980
- Colour Index*. Bradford, UK: The Society of Dyers and Colourists, v.4. 1971
- De Ory, I., Romero, L.E. e Cantero, D. Influence of shear stress on immobilization of acetic acid bacteria on polyurethane foam carriers. *Universiteit Gent.*, v.65, n.3a, p.235-241. 2000.

- De Ory, I., Romero, L.E. e Cantero, D. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carries for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*, v.39, p.547-555. 2004.
- Duran, N., Rosa, M.A., D'annibale, A. e Gianfreda, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, n.7, p.907-931. 2002.
- Eibl, R., Eibl, D., Pörtner, R., Catapano, G. e Czermak, P. *Cell and Tissue Reaction Engineering*. Berlin: Springer. 2009
- El-Gohary, F., El-Hawarry, S., Badr, S. e Rashed, Y. Wastewater treatment and reuse for aquaculture. *Water Science and Technology*, v.32, n.11, p.127-136. 1995.
- Fu, Y. e Viraraghavan, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, v.79, n.3, p.251-262. 2001.
- Gemeiner, P. Materials for enzyme engineering. In: Gemeiner, P. (Ed.). *Enzyme engineering*. New York, NY: Ellis Horwood, 1992. p.13-119
- Gill, M. e Strauch, R.J. Constituents of *Agaricus xanthodermus* Genevier: the first naturally endogenous azo compound and toxic phenolic metabolites. *Zeitschrift fur Naturforschung C: A Journal of Biosciences*, v.39c, p.1027-1029. 1984.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L. e Gold, M.H. Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.251, n.2, p.688-696. 1986.
- Glenn, J.K. e Gold, M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.45, n.6, June 1, 1983, p.1741-1747. 1983.
- Gordon, P.F. e Gregory, P. *Organic chemistry in colour*. Berlin: Springer-Verlag. 1983
- Gravelet-Blondin, L.R., Carlieel, C.M., Barclay, S.J. e Buckley, C.A. Management of water resources in South Africa with respect to the textile industry. *II IAWQ specialized conference on pretreatment of Industrial Wastewater*. Greece 1996.
- Gregor, K.H. e Schwarzer, H. Oxidative decolourization of textile waste water with advanced oxidation process. *Versto voda. Odpadnih Voda* 1993.

- Gupta, M. e Mattiasson, B. Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems. In: Suelter, C.H. (Ed.). *Methods of biochemical analysis*. New York, NY: Wiley, v.36, 1992. p.1-34
- Gygi, S.P. e Aebersold, R. Mass spectrometry and proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.4, n.5, p.489-494. 2000.
- Haug, A., Larsen, B. e Smidsrod, O. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chem. Scan.*, v.20, p.183. 1966.
- Hogg, S. *Essential microbiology*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd. 2005
- Holubar, P., Plas, C., Weiss, B., Sasshofer, S. e Braun, R. Hydrocarbon removal with a polyurethane foam bioreactor. *Biologische Abgasreinigung*, v.1104, p.505-510. 1994.
- Hori, H., Yamashita, S., Ishii, M., Tanji, Y. e Unno, H. Isolation, characterization and application to off-gas treatment of toluene-degrading bacteria. *J. Chem. Eng.*, v.34, n.9, p.1120-1126. 2001.
- Hosono, M., Arai, H., Aizawa, M., Yamamoto, I., Shimizu, K. e Sugiyama, M. Decoloration and degradation of azo dye in aqueous solution supersaturated with oxygen by irradiation of high-energy electron beams. *Applied Radiation and Isotopes*, v.44, n.9, p.1199-1203. 1993.
- Hunger, K. *Industrial dyes - chemistry, properties, applications*. Weinheim, Deutschland: Wiley-VCH. 2003
- Ishikawa, Y., Glausser, J. e Janshekar, H. *Chemical economics handbook: dyes*. Menlo Park, USA: SRI Chemical and Health Business Services. 2008
- Isik, M. e Sponza, D.T. Effects of alkalinity and co-substrate on the performance of an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor through decolorization of Congo Red azo dye. *Bioresource Technology*, v.96, n.5, p.633-643. 2005.
- Isik, M. e Sponza, D.T. Anaerobic/aerobic treatment of a simulated textile wastewater. *Separation and Purification Technology*, v.60, n.1, p.64-72. 2008.
- Jurj, T.K., Higuchi, T. e Chang, H. *Microbiology, chemistry and potential applications*. Boca Raton FL, USA: CRC press, v.1. 1980

- Kapdan, I.K., Kargi, F., McMullan, G. e Marchant, R. Decolorization of textile dyestuffs by a mixed bacterial consortium. *Biotechnology Letters*, v.22, n.14, p.1179-1181. 2000.
- Kaspar, H.F. e Wuhrmann, K. Kinetic parameters and relative turnovers of some important catabolic reactions in digesting sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.36, n.1, July 1, 1978, p.1-7. 1978.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. e Chimni, S.S. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, v.67, n.1, p.55-61. 2005.
- Kim, T.-H., Park, C., Lee, J., Shin, E.-B. e Kim, S. Pilot scale treatment of textile wastewater by combined process (fluidized biofilm process-chemical coagulation-electrochemical oxidation). *Water Research*, v.36, n.16, p.3979-3988. 2002.
- Kirby, N., Marchant, R. e McMullan, G. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v.188, n.1, p.93-96. 2000.
- Koyuncu, I. Reactive dye removal in dye/salt mixtures by nanofiltration membranes containing vinylsulphone dyes: effects of feed concentration and cross flow velocity. *Desalination*, v.143, n.3, p.243-253. 2002.
- Krapfenbauer, K.F., Robinson, M.R. e Getoff, N. Development of and testing of TiO₂-Catalysts for EDTA – radiolysis using γ -rays (1-part). *J. Adv. Oxid. Technol.*, v.4, p.213-217. 1999.
- Krefting, A. An improved method of treating seaweed to obtain valuable products therefrom. British Patent no.11538, 1896.
- Kulkarni, M. e Chaudhari, A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *Journal of Environmental Management*, v.85, n.2, p.496-512. 2007.
- Kumar, M.N.V.R., Sridhar, T.R., Bhavani, K.D. e Dutta, P.K. Trends in colour removal in textile mill effluents. *Colourage*, v.40, p.25-34. 1998.
- Liakou, S., Kornaros, M. e Lyberatos, G. Pretreatment of azo dyes using ozone. *Water Science and Technology*, v.36, n.2-3, p.155-163. 1997.
- López, J.L. Two-dimensional electroforesis in proteome expression analysis. *Journal of Chromatography B*, v.849, n.1-2, p.190-202. 2007.
- Luyben, W.L. *Chemical Reactor Design and Control*. New Jersey: John Wiley & Sons. 2007

- Manohar, S., Kim, C.K. e Karegoudar, T.B. Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomonas sp.* strain NGK1 in polyurethane foam. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.55, n.3, p.311-316. 2001.
- Martinsen, A., Skjak-Braek, G. e Smidsrod, O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol. Bioeng.*, v.33, p.79-89. 1989.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R. e Hofrichter, M. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. *Dyes and Pigments*, v.77, n.2, p.295-302. 2008.
- Missen, R.W., Mims, C.A. e Saville, B.A. *Introduction to Chemical Reaction Engineering and Kinetics*. New York: John Wiley & Sons. 1999
- Moe, W.M. e Irvine, R.L. Effect of nitrogen limitation on performance of toluene degrading biofilters. *Water Research*, v.35, n.6, p.1407-1414. 2001a.
- Moe, W.M. e Irvine, R.L. Polyurethane foam based biofilter media for toluene removal. *Water Science and Technology*, v.43, n.11, p.35-42. 2001b.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O. e Matsushita, K. A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *acetobacter aceti*. *J. Biosci. Bioeng.*, v.93, n.2, p.192-200. 2000.
- Mori, A. Production of vinegar by immobilized cells. *Process Biochemistry*, v.20, n.3, p.67-74. 1985.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. e Rodwell, V.W. *Harper's Illustrated Biochemistry*. USA: McGraw-Hill Companies. 2003
- Nachiyar, C.V. e Rajkumar, G.S. Degradation of a tannery and textile dye, Navitan Fast Blue S5R by *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, n.6, p.609-614. 2003.
- Nassar, M.M. e El-Geundi, M.S. Comparative cost of colour removal from textile effluents using natural adsorbents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.50, n.2, p.257-264. 1991.

- Nigam, P., Banat, I.M., Singh, D. e Marchant, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochemistry*, v.31, n.5, p.435-442. 1996.
- O'driscoll, K.F. Techniques of enzyme entrapment in gels. In: Mosbach, K. (Ed.). *Methods in enzymology*. New York, NY: Academic Press, 1976. p.169-183
- O'farrel, P.H. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.250, n.10, p.4007-4021. 1975.
- O'niell, C., Hawkes , F.R., Esteves, S., Hawkes, D.L. e Wilcox, S. Anaerobic and aerobic treatment of a simulated textile effluent. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.74, n.10, p.993-999. 1999a.
- O'niell, C., Hawkes , F.R., Hawkes, D.L., Lourenço, N.D., Pinheiro , H.M. e Delée, W. Colour in textile effluents - sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.74, n.11, p.1009-1018. 1999b.
- Ong, S.-E. e Pandey, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomolecular Engineering*, v.18, n.5, p.195-205. 2001.
- Pak, D. e Chang, W. Decolorizing Dye Wastewater with Low Temperature Catalytic Oxidation. *Water Science and Technology*, v.40, n.4-5, p.115-121. 1999.
- Pandey, A., Singh, P. e Iyengar, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, n.2, p.73-84. 2007.
- Pearce, C.I., Guthrie, J.T. e Lloyd, J.R. Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143. *Dyes and Pigments*, v.76, n.3, p.696-705. 2008.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R. e Guthrie, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v.58, p.179-196. 2003.
- Pelegrini, R., Peralta-Zamora, P., De Andrade, A.R., Reyes, J. e Durán, N. Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Applied Catalysis B: Environmental*, v.22, n.2, p.83-90. 1999.

- Plumb, J.J., Bell, J. e Stuckey, D.C. Microbial Populations Associated with Treatment of an Industrial Dye Effluent in an Anaerobic Baffled Reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, n.7, July 1, 2001, p.3226-3235. 2001.
- Pointing e Pointing, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.57, n.1, p.20-33. 2001.
- Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but still climbs up the mountains. *Proteomics*, v.2, p.3-10. 2002.
- Rafii, F. e Cerniglia, C.E. Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. *Environmental Health Perspectives*, v.103, n.Suppl. 5, p.17-19. 1995.
- Rafii, F., Franklin, W. e Cerniglia, C.E. Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.56, n.7, July 1, 1990, p.2146-2151. 1990.
- Raghavacharya, C. Colour Removal from Industrial effluents – A comparative review of available technologies. *Chemical Engineering World*, v.32, n.7, p.53-54. 1997.
- Rajaguru, P., Vidya, L., Baskarasethupathi, B., Kumar, P.A., Palanivel, M. e Kalaiselvi, K. Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.517, n.1-2, p.29-37. 2002.
- Rajeshwar, K., Ibanez, J.G. e Swain, G.M. Electrochemistry and the environment. *Journal of Applied Electrochemistry*, v.24, n.11, p.1077-1091. 1994.
- Razo-Flores, E., Luijten, M., Donlon, B., Lettinga, G. e Field, J. Biodegradation of selected azo dyes under methanogenic conditions. *Water Science and Technology*, v.36, n.6-7, p.65-72. 1997.
- Reddy, J. *Analytical Techniques in Monitoring the Environment*. Tirupathi, India: Student offset printers. 2000
- Rieger, P.-G., Meier, H.-M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T. e Knackmuss, H.-J. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *Journal of Biotechnology*, v.94, n.1, p.101-123. 2002.

- Robertson, D.E. e Steer, B.A. Recente progress in biocatalyst discovery and optimization. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.8, p.141-149. 2004.
- Robinson, T., Chandran, B. e Nigam, P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, v.29, n.8-9, p.575-579. 2001a.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. e Nigam, P. 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. 2001b.
- Russ, R., Rau, J. e Stolz, A. The Function of Cytoplasmic Flavin Reductases in the Reduction of Azo Dyes by Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, n.4, April 1, 2000, p.1429-1434. 2000.
- Sanchez, P.S., Sato, M.I.Z., Paschoal, C.M.R.B., Alves, M.N., Furlan, E.V. e Martins, M.T. Toxicity assessment of industrial effluents from S. Paulo state, Brazil, using short-term microbial assays. *Toxicity Assessment*, v.3, n.1, p.55-80. 1988.
- Silva, R.L.F.O.B., Souza, R.R., Santana, J.C.C. e Tambourgi, E.B. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.3, p.1-7. 2008.
- Silveira, E., Marques, P.P., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. *Optimization of industrial textile dye colour removal by Pseudomonas oleovorans*. 10th International Chemical and Biological Engineering Conference - Chempor 2008. Braga, Portugal. September 4-6, 2008, 2008. 2139-2144 p.
- Silveira, E., Marques, P.P., Santana, J.C.C., Lima-Filho, J.L., Mazzola, P.G., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Experimental design for decolourization of textile dye by *Pseudomonas oleovorans*. *Research and Reviews in Biosciences*, v.3, n.4, p.183-190. 2009a.
- Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.2, p.230-235. 2009b.
- Skjak-Braek, G. e Martinsen, A. Applications of some algal polysaccharides in biotechnology. In: Guiry, M.D. e Blunden, G. (Ed.). *Seaweed resources in Europe: uses and potential*. New York, NY: John Wiley & Sons Ltd., 1991. p.219-257

- Smidsrod, O. Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *J. Chem. Soc. Faraday Transact.*, v.57, p.263-274. 1974.
- Spadaro, J.T., Gold, M.H. e Renganathan, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, n.8, August 1, 1992, p.2397-2401. 1992.
- Spadaro, J.T., Isabelle, L. e Renganathan, V. Hydroxyl radical mediated degradation of azo dyes: evidence for benzene generation. *Environ. Sci. Technol.*, v.28, n.7, p.1389-1393. 1994.
- Spiess, A., Schlothauer, R.C., Hinrichs, J., Scheidat, B. e Kasche, V. pH gradients in immobilized amidases and their influence on rates and yields of beta-lactam hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, v.20, n.61-93, p.61. 1999.
- Staehelin, J. e Hoigne, J. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.*, v.16, n.10, p.676-681. 1982.
- Stolz, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.56, n.1, p.69-80. 2001.
- Talarposhti, A.M., Donnelly, T. e 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.
- Trevan, M. Techniques of immobilization. In: Trevan, M. (Ed.). *Immobilized enzymes. An introduction and applications in biotechnology*. Chichester, NY: Wiley, 1980. p.1-9
- Ulson De Souza, S.M.a.G., Forgiarini, E. e Ulson De Souza, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, v.147, n.3, p.1073-1078. 2007.
- Valent, G.U., Sato, M.I.Z., Cristina, M., Coelho, L.S., Coimbrão, C.A., Sanchez, P.S., Martins, M.T. e Renato Bonatelli, J. Monitoring Sao Paulo state rivers in brazil for mutagenic activity using the ames test. *Environmental Toxicology & Water Quality*, v.8, n.4, p.371-381. 1993.
- Van Der Burg, B. e Eijssink, V.G.H. Selection of mutations for increased protein stability. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v.13, p.333-337. 2002.

- Van Der Zee, F.P., Lettinga, G. e Field, J.A. Azo dye decolourisation by anaerobic granular sludge. *Chemosphere*, v.44, n.5, p.1169-1176. 2001.
- Van Der Zee, F.P. e Villaverde, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - A short review of bioreactor studies. *Water Research*, v.39, p.1425-1440. 2005.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tijhuis, L. e Heijnen, J.J. Biofilm structures. *Water Science and Technology*, v.32, n.8, p.35-43. 1995.
- Vanhulle, S., Trovaslet, M., Enaud, E., Lucas, M., Sonveaux, M., Decock, C., Onderwater, R., Schneider, Y.-J. e Corbisier, A.-M. Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, n.3, p.337-344. 2008.
- Wang, B.-E., Hu, Y.-Y., Xie, L. e Peng, K. Biosorption behavior of azo dye by inactive CMC immobilized *Aspergillus fumigatus* beads. *Bioresource Technology*, v.99, n.4, p.794-800. 2008.
- Welham, A. The theory of dyeing (and the secret of life). *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, v.116, n.5-6, p.140-143. 2000.
- Wesenberg, D., Buchon, F. e Agathos, S.N. Degradation of dye-containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula dussenii*. *Biotechnology Letters*, v.24, n.12, p.989-993. 2002.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. e Agathos, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, v.22, p.161-187. 2003.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F. e Williams, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, v.13, p.19-50. 1995.
- Will, R., Ishikawa, Y. e Leder, A. *Chemical Economics Book: Synthetic Dyes*. Menlo Park, USA: SRI Chemical & Health Business Services. 2000
- Willmott, N.J. *The use of bacteria-polymer composites for the removal of colour from reactive dye effluents*. (Ph.D.). University of Leeds, UK, 1997.

- Wong, C.-H. e Whitesides, G.M. Enzymes in synthetic organic chemistry. In: Baldwin, J.E., Williams, R.M. e Bäckvall, J.-E. (Ed.). *Tetrahedron organic chemistry series*. Amsterdam, The Netherlands: Pergamon, v.12, 1994. p.41-130
- Xu, Y., Lebrun, R.M.E., Gallo, P.-J. e Blond, P. Treatment of Textile Dye Plant Effluent by Nanofiltration Membrane. *Separation Science and Technology*, v.34, n.13, p.2501 - 2519. 1999.
- Yang, C., Suidan, M.T., Zhu, X. e Kim, B.J. Comparision of a single-layer and multi-layer rotating drum biofilters for VOC removal. *Environ. Prog.*, v.22, n.2, p.87-94. 2003.
- Yang, F.-C. e Yu, J.-T. Development of a bioreactor system using an immobilized white rot fungus for decolorization. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.16, n.1, p.9-11. 1996.
- Yang, H. e Wright, J.R. Calcium alginate. In: Kühtreiber, W.M., Lanza, R.P. e Chick, W.L. (Ed.). *Cell encapsulation technology and therapeutics*. Boston, MA: Birkhäuser, 1999. p.79-89
- Yang, Q., Tao, L., Yang, M. e Zhang, H. Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. *Journal of Environmental Sciences*, v.20, n.1, p.105-108. 2008.
- Yesiladali, S., Pekin, G., Bermek, H., Arslan-Alaton, İ., Orhon, D. e Tamerler, C. Bioremediation of Textile Azo Dyes by *Trichophyton rubrum* LSK-27. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.22, n.10, p.1027-1031. 2006.
- Yu, J., Wang, X. e Yue, P.L. Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains. *Water Research*, v.35, n.15, p.3579-3586. 2001.
- Zhang, F.-M., Knapp, J.S. e Tapley, K.N. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, n.1-2, p.48-53. 1999.
- Zheng, Z., Levin, R.E., Pinkham, J.L. e Shetty, K. Decolorization of polymeric dyes by a novel *Penicillium* isolate. *Process Biochemistry*, v.34, p.31-37. 1999.
- Zhu, H., Bilgin, M. e Snyder, M. Proteomics. *Annual Review of Biochemistry*, v.72, n.1, p.783-812. 2003.

Zimmermann, T., Kulla, H.G. e 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.

Zollinger, H. *Color Chemistry – Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes Pigments*. New York, NY: VCH. 1987

5 Manuscrito Apresentado no XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química

*Este capítulo apresenta a biossorção de corantes azos em efluentes contaminados com corantes têxteis. Quatro cepas de *Pseudomonas* foram testadas, *P. aeruginosa* e *P. putida* do Departamento de Antibióticos da UFPE, e *P. cepacia* e *P. oleovorans* do CBMAI da Unicamp. Três corantes dispersos (Disperse Orange 30, Disperse Red 167 e Disperse Blue 165), três corantes ácidos (Acid Yellow 256, Acid Red 57 e Acid Blue 324) e alaranjado de metila foram usados para a seleção dos microorganismos.*

Disperse Blue 165 Contaminated Textile Effluent Decolourization by Biosorption in *Pseudomonas*

E. Silveira^{1,*}; P. P. Marques²; J. L. Lima-Filho²; E. B. Tambourgi¹; A. L. F. Porto³

¹School of Chemical Engineering - Unicamp, Campinas - SP - Brasil

²LIKA – UFPE, Recife – PE – Brasil

³DMFA/Cenapesq – UFRPE, Recife – PE – Brasil

*Telephone: (19) 3521-3900 – Fax: (19) 3521-1389 – Email:

silveiraedgar@gmail.com

Abstract

Azo dyes, which are aromatic compounds with one or more –N=N– groups, constitute the largest class of synthetic commercial dyes, been the textile industry the largest consumer of these dyes. The azo compounds are xenobiotic in nature, with only one natural azo compound reported so far. Thus they expected to be recalcitrant to biodegradation. Under certain environmental conditions, many azo dyes can be mineralized, thus leading to decolourization of contaminated effluent. This work reports the *Pseudomonas* biosorption of azo dye in contaminated textile effluent. Four *Pseudomonas* strains were used, *P. aeruginosa* and *P. putida* from the Antibiotics Institute – UFPE, and *P. cepacia* and *P. oleovorans* from CBMAI-Unicamp. Three disperse dyes (Disperse Orange 30, Disperse Red 167, and Disperse Blue 165); three acid dyes (Acid Yellow 256, Acid Red 57, and Acid Blue 324), one azo (Methyl Orange), and one diazo (Fast Red Violet Salt) were used for microorganisms' selection. The microorganisms were streaked in Minimal Mineral Medium agar plates containing 1 g L⁻¹ dye, and the strains which displayed decolourized haloes were stocked in cryotubes containing glycerol 10% (v/v) and glass beads for further use. The pre-selected strains were grown into tubes, containing Nutrient Broth with approximately 50 mg L⁻¹ dye, each tube were inoculated with a single bead and incubated for 48 hours at 28 °C unless otherwise mentioned. Dye decolourization was detected on an UV-Vis spectrophotometer at its λ_{max} using supernatant after centrifugation. The colour removal was reported as decolourization (%) = $(A_i - A_f)/A_i \times 100$. Each experiment was performed as three parallel experiments. All residues were previously treated or stocked for further delivery to a treatment facility. Among all four species tested, *P. cepacia* has shown no growth at all on

dye contained plates, although, *P. aeruginosa*, *P. oleovorans*, and *P. putida* showed considerable growth. Since it was not possible to determine which, among the three strains, showed better decolourization on plates, a second selection on tubes were performed. After 48 hours of incubation, almost all dyes tested could be removed. Even though Methyl Orange dye could be removed up to $97.6\% \pm 2.03$ by *P. aeruginosa*, all three strains removed Disperse Blue 165 near to 40%. But, instead of only removing, it seemed to mineralise the remaining disperse dye, leading to formation of a blue precipitated.

Keywords: Dyes, Decolourization, *Pseudomonas*

5.1 Introduction

Azo dyes are characterized by the presence of one or more $-N=N-$ (azo) bonds and used in products such as textile, leather and food stuff (Patel e Suresh, 2008). In 1994 estimates, the world production of dyes was around one million tons, of which more than 50% were azo dyes (Stolz, 2001; Pandey *et al.*, 2007). These dyes are designed to be resistant to light, water and oxidizing agents and therefore difficult to degrade once released into aquatic systems (Park *et al.*, 2007).

Many dyes are visible in water at concentration as low as 1 mg l^{-1} . Textile processing wastewaters with dye contents in the range of $10\text{-}200 \text{ mg l}^{-1}$ are highly coloured (Pandey *et al.*, 2007). There are dyes which are recalcitrant and toxic substances, they are resistant to biological degradation, not being easily degraded in wastewater treatment plants (Ulson De Souza *et al.*, 2007).

Azo compounds are xenobiotic in nature; only one natural azo compound (4-4' dihydroxy azo benzene) has been reported so far (Gill e Strauch, 1984). Thus they can be expected to be recalcitrant to biodegradation. It is generally observed that dyes resist biodegradation in conventional activity sludge treatment units (Stolz, 2001). It is known that several microorganisms, including fungi, bacteria, yeast and algae can decolorize and even completely mineralize many azo dyes under certain environmental conditions.

This work reports the selection of *Pseudomonas* to the dyes decolourization, as well as the colour removal of Disperse Blue 165 dyes by biosorption in *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Microorganisms

The used microorganisms were obtained from the Antibiotics Institute – IA/UFPE, collection, and from the Brazilian Collections of Environmental and Industrial's Microorganisms – CBMAI/Unicamp, previously identified as *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. oleovorans* and *P. putida*.

5.2.2 Chemicals

The dyes used were classified as Disperse Orange 30, Disperse Red 167, Disperse Blue 165, Acid Yellow 256, Acid Red 57, Acid Blue 324, Methyl Orange and Fast Red Violet Salt. All the others reagents were analytical grade.

5.2.3 Qualitative Plate Detection of Dyes Degrading Microorganisms

The microorganisms were streaked on plates and then incubated for 96 hours with different dyes as sole source of carbon in Minimal Basal Medium (NaCl 7 mg l⁻¹; CaCl₂ 2H₂O 4 mg l⁻¹; MgSO₄ 7H₂O 2 mg l⁻¹; bacteriological agar 3 g l⁻¹; and dye 1 g l⁻¹), and pH adjusted to 7.0.

5.2.4 Quantitative Tube Detection of Dyes Degrading Microorganisms

The microorganisms were inoculated in nutrient broth containing dye 50 mg l⁻¹ in static conditions (anoxic) and free of light. After 48 hours of growth, the percentage of colour removal was calculated based on each dye tested.

5.2.5 Dyes Decolourization under Submerge Cultures

A pre-culture in late exponential or early stationary phase were inoculated in tubes containing nutrient broth, where were realized the Methyl Orange degradation and Direct Blue 165 biosorption experiments.

5.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization

The samples from the decolourization cultures were collected and analysed following the methodology described by Chen (2002) as follows:

1. OD_{600nm} of the sample mixtures without centrifugation;
2. OD_{600nm} of sample supernatant after centrifugation for 10 minutes at 10,000 g; and,
3. OD_{λmax} of sample supernatant after centrifugation.

The biomass produced was determined by subtracting the value obtained on the first step from the value obtained on second. Colour removal efficiency was determined by the following equation:

$$\text{Decolourization} = \frac{A_{\lambda, \text{initial}} - A_{\lambda, \text{final}}}{A_{\lambda, \text{initial}}} \quad (15)$$

in which $A_{\lambda, \text{initial}}$ is the absorbance before the decolourization process and $A_{\lambda, \text{final}}$ is the value obtained on the third step. Each decolourization value is a mean of three parallel experiments.

5.3 Results and Discussion

5.3.1 *Pseudomonas* Qualitative Selection

The *Pseudomonas* selection was realized through visualization of growth on plates containing azo dyes as sole carbon source and mineral basal supplement. Since these types of dyes are extensively used by the textile industries, and so one of the major source of textile industries' effluents contamination (Asad *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008), eight dyes were tested. Table 8 shows the ability of for different *Pseudomonas* strains to grow on plates containing dyes as sole carbon source.

Table 8 - *Pseudomonas* Growth in Plates

Dyes	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>P. putida</i>
Methyl Orange	+	-	+	+
AY256	-	-	+	-
AB324	+	-	-	-
AR57	+	-	+	+
DO30	-	-	+	+
DR167	-	-	+	-
DB165	+	-	+	+
FRVS	-	-	-	-

+ = visible growth; - = no visible growth

P. cepacia was the only strain which did not show any capacity to use dyes as energy source. However, the other three strains, *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* and *P. putida*, were capable to assimilate the dyes as carbon source, producing small haloes around the colonies. Barrangan *et al.* (2007) described that some *Pseudomonas* strains showed continued growth

after 192 hours of incubation. All the dyes studied were oxidized on plates where promoted substantial colony growth.

Lucas *et al.* (2006) described the dye decolourization on plates by yeast, with the development of cream coloured colonies. The colour presented by the cultures is probably a result of a step of bioaccumulation previous to the biodegradation one. Similar results were observed by other studies (Chen *et al.*, 2003; Yu e Wen, 2005). This step should have been avoided by the strains tested, since only in three out of eight studied dyes (Disperse Blue 165, Disperse Orange 30 and Disperse Red 167) the *Pseudomonas* colonies showed to be coloured as well as the halo production.

The presented colonies colour, as in cellular pellets, even though they do not give any precise elucidation of the colour removal rate, they provide, at least partially, some information about the decolorizing ability from the studied strains (Yu e Wen, 2005).

5.3.2 *Pseudomonas* Quantitative Selection

Due to lack of precise results, which lead to a better choice of the strain and dye to the continuity of this study, it was proposed a quantitative analysis of the dyes decolourization. Then, the colour removal rate of each strain could be accessed and quantified, and doing so, one can select the strain which has the best decolorizing ability.

Barrangan *et al.* (2007) observed that all three studied microorganism, *Enterobacter* sp., *Morganella* sp. e *Pseudomonas* sp., were not capable to grow in liquid medium using to dye as sole carbon source or supplemented only with glucose. The growth was only observed when the medium was composed by peptone, meat extract and urea.

Bacterial degradation of azo dyes is often an enzymatic reaction linked to anaerobiosis, because it is inhibited by oxygen that is in competition with the azo group as the electron receptor of the reduced electron carrier, i.e. NADH (Banat *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003). In contrast, bacterial reduction under anaerobic conditions is relatively unspecific with regard to the azo compounds involved, and is, therefore, of more use for the removal of colour in azo dye wastewater (Stolz, 2001; Pearce *et al.*, 2003).

Since *P. cepacia* did not show any significative growth at the qualitative selection, it was not used further in the submerse cultures, as well as the Fast Red Violet salt. Figure 12 describes the results obtained in the decolorization of seven out of eight tested dyes (50 mg l⁻¹) by the three *Pseudomonas* species in anoxic conditions.

First, it was observed that *P. Aeruginosa* was the specie which removed more colour of the methyl orange, reaching a colour removal rate bigger than 97%. However, *P. Oleovorans* showed to be more versatile, since it was capable of remove the colour of six out of seven dyes tested, in opposition to four out of eight of *P. aeruginosa* and *P. putida*.

It was not possible to determine the colour removal of Acid Yellow 256 dye. This problem was due to its maximum spectrum, which was over the culture medium spectrum, so it was impossible to quantify its colour removal and leading to systematic errors.

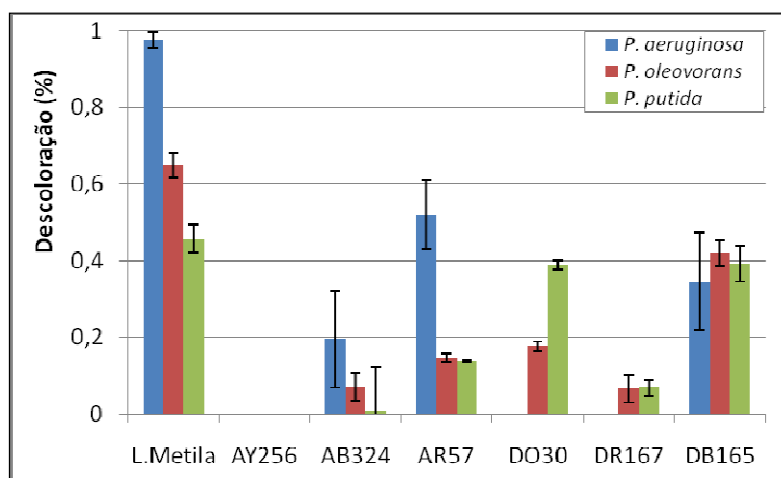


Figure 12 - Strains Qualitative Selection

The Disperse Orange 30, Disperse Red 167 and Disperse Blue 165 dyes showed low colour removal, though they seemed to be mineralized, since it was possible to visualise a precipitated formation on the tube bottom. Khera *et al.* (2005) observed that strains isolated from soil and textile wastewater sludge, which showed low colour removal, usually as low as 40%, were bioaccumulative.

Figure 13 shows to colour removal of Disperse Blue 165 by *P. oleovorans*, which was capable of remove more than 40% of the dye colour.

The bioaccumulation process is directly associated with the biomass production. Sani & Banarjee (1999) observed an increase in *Kurthia* sp. biomass concentration mutually with the increase of crystal violet, magenta and green malachite colour removal, three triphenylmethane dyes and it should be some dependency between the dye structure and its bioaccumulation.



Figure 13 - *P. oleovorans* Disperse Blue 165 colour removal.

5.4 Conclusion

We conclude that it is possible to remove colour from disperse dyes by *Pseudomonas* strains, although some attention should be given to the biomass production since it is directly related to the bioaccumulation process.

5.5 Acknowledgements

The authors would like to thank Fapesp, Capes and CNPq for the financial support.

5.6 References

- Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Sarbolouki, M.N. e Dastgheib, S.M.M. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology*, v.98, n.11, p.2082-2088. 2007.
- Banat, M.I., Nigam, P., Singh, D. e Marchant, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, v.58, p.217-227. 1996.
- Barragan, B.E., Costa, C. e Carmen Marquez, M. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments*, v.75, n.1, p.73-81. 2007.
- Chen, K.-C., Wu, J.-Y., Liou, D.-J. e Hwang, S.-C.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.101, n.1, p.57-68. 2003.

- Gill, M. e Strauch, R.J. Constituents of *Agaricus xanthodermus* Genevier: the first naturally endogenous azo compound and toxic phenolic metabolites. *Zeitschrift fur Naturforschung C: A Journal of Biosciences*, v.39c, p.1027-1029. 1984.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. e Chimni, S.S. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, v.67, n.1, p.55-61. 2005.
- Kim, S.-Y., An, J.-Y. e Kim, B.-W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. *Dyes and Pigments*, v.76, n.1, p.256-263. 2008.
- Lucas, M.S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J.A. e Dias, A.A. Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.51-55. 2006.
- Pandey, A., Singh, P. e Iyengar, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, n.2, p.73-84. 2007.
- Park, C., Lee, M., Lee, B., Kim, S.-W., Chase, H.A., Lee, J. e Kim, S. Biodegradation and biosorption for decolorization of synthetic dyes by *Funalia troglia*. *Biochemical Engineering Journal*, v.36, n.1, p.59-65. 2007.
- Patel, R. e Suresh, S. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dye by *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, v.99, n.1, p.51-58. 2008.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R. e Guthrie, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v.58, p.179-196. 2003.
- Sani, R.K. e Banerjee, U.C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, n.7, p.433-437. 1999.
- Stolz, A. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.56, n.1, p.69-80. 2001.
- Ulson De Souza, S.M.a.G., Forgiarini, E. e Ulson De Souza, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, v.147, n.3, p.1073-1078. 2007.

Yu, Z. e 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.

*6 Manuscrito Publicado no Periódico
International Biodeterioration and
Biodegradation, v. 63, pp. 230-235.*

*Este capítulo apresenta a seleção de quatro cepas de *Pseudomonas* com a habilidade de remover a cor de corantes têxteis industriais. As quatro cepas foram testadas contra 14 corantes comerciais utilizados por indústrias têxteis.*

Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization

Silveira, E.^{1,2,3}; Marques, P.P.²; Silva, S.S.²; Lima-Filho, J.L.²; Porto, A.L.F.³; Tambourgi, E.B.^{1,*}

¹School of Chemical Engineering - State University of Campinas, Unicamp – P.O. Box 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brazil

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA – Federal University of Pernambuco, UFPE – Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil

³DMFA/Cenapesq – Federal Rural University of Pernambuco, UFRPE – Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil

* Tel: +551935213952 Fax: +551935213894 E-mail: eliamtam@feq.unicamp.br

Abstract

Pigment is the first contaminant to be recognised in bodies of water and wastewater. Besides the aesthetic problem, dyes obstruct light and reduce oxygen mass transfer. This paper describes the selection of *Pseudomonas* strains with the ability to remove colour from textile industrial dyes. Four *Pseudomonas* species were tested against 14 commercial industrial dyes. *P. cepacia* exhibited no growth at all on plates containing dyes (1 g·l⁻¹), whereas *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* and *P. putida* exhibited considerable growth. Decolourization in a liquid culture revealed that *P. oleovorans* is more viable for decolourizing textile dyes, as it achieved over 80% colour removal for two of the 14 dyes studied; it also proved to be more tolerant to high dye concentrations.

Keywords: textile dyes; *Pseudomonas*; decolourization; plate selection; colour removal rate

6.1 Introduction

There are more than 100,000 commercially available dyes with over 7 x 10⁷ tons of dyestuff produced annually worldwide (Robinson *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2005). In Brazil alone, 26,500 tons are produced (Ulson De Souza *et al.*, 2007). These dyes are widely used in a number of industries, such as textiles, food, cosmetics and paper printing, with the textile industry the largest consumer of dyes (Pandey *et al.*, 2007).

Pigment is the first contaminant recognised in wastewater and besides the aesthetic problem; dyes obstruct light penetration and oxygen transfer in bodies of water (Banat *et al.*, 1996; Khalid *et al.*, 2008; Patel e Suresh, 2008). Without adequate treatment, dyes are stable and can remain in the environment for an extended period of time (Dos Santos *et al.*, 2007). Some dyes and their degradation products are carcinogenic and mutagenic in nature (Pandey *et al.*, 2007). In the metropolitan area of Sao Paulo, Brazil, 75% of wastewaters from textile industries have demonstrated the most positive mutagenic responses among different types of industrial effluents analysed (Umbuzeiro *et al.*, 2005).

A number of physical and chemical methods have been suggested for the treatment of dye-contaminated wastewater, but such methods are not widely used due to the high cost and secondary pollution that can be generated by the excessive use of chemicals (Jadhav *et al.*, 2007). Alternative, biodegradation systems of colour removal through the use of bacteria have been shown to be highly effective (Pearce *et al.*, 2003). The lower cost of treatment and amenability to scale up are among the merits of biological methods (Dafale *et al.*, 2008).

Environmental biotechnology is constantly expanding its efforts in the biological treatment of dye-contaminated wastewaters. Although numerous microorganisms can decolourize such dyes, only a few are able to mineralise these compounds into CO₂ and H₂O (Junghanns *et al.*, 2008). The identification of good dye-decolourizing species requires a screening method (Lucas *et al.*, 2008). Useful species should be able to degrade most industrially used dyes. *Pseudomonas* is a wide bacterial genus used for decolourization studies, and several works describes its use (Zimmermann *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 2001; El-Naggar *et al.*, 2004; Ben Mansour *et al.*, 2007; Kalme *et al.*, 2007).

The aim of the present study was to select a *Pseudomonas* strain capable of decolourizing industrial textile dyes. Four *Pseudomonas* species were evaluated under anoxic conditions against fourteen industrial textile dyes.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Microorganisms

The microorganisms were obtained from the collections of Antibiotics Institute of the Federal University of Pernambuco and the Brazilian Collection of Industrial and Environmental Microorganisms (CBMAI) of the State University of Campinas, previously

identified as *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *P. cepacia* (ATCC 25608), *P. oleovorans* (CBMAI 703) and *P. putida* (ATCC 17514).

The microorganisms were preserved in cryotubes containing glass beads and 10% glycerol (v/v). Each cryotube was loaded from the same initial culture and had an average of 30 beads. It was thus possible to use the same cell generation for all experiments.

6.2.2 Dyes and Reagents

The textile dyes were obtained from the kind permission of Clariant of Brazil (Sao Paulo, Brazil). As they are for commercial use, the commercial names will be omitted in this study. The dyes received the following codenames: B15 (C.I. 13390); B19 (C.I. 11005); B31 (C.I. 20460); B36 (C.I. 11825); B54 (C.I. 26360); B69 (C.I. 12210); B86 (C.I. 26400); R34 (C.I. 14710); R90 (C.I. 11110); R91 (C.I. 18800); Y15 (C.I. 13950); Y79 (C.I. 13065); and Y87 (C.I. 22910). Methyl orange (C.I. 13025) was used as a standard dye. All other reagents are of analytical grade.

6.2.3 Culture Conditions

For each experiment, an Erlenmeyer flask containing 20 ml of Nutrient Broth (meat extract 3 g·l⁻¹ and peptone 5 g·l⁻¹) was inoculated with a single glass bead from the same cryotube and incubated at the maintenance temperature for each microorganism (28 °C for *P. cepacia*, *P. oleovorans*, and *P. putida* or 37 °C for *P. aeruginosa*) for 24 hours when an early stationary phase or final exponential phase was reached.

6.2.4 Screening of Decolourization Strain

The strains cultivated in a liquid culture were streaked on plates and incubated for 96 hours with different dyes as the single carbon source (1 g·l⁻¹) in a Minimal Mineral Medium, MMM, (NaCl 7 mg·l⁻¹; CaCl₂·2H₂O 4 mg·l⁻¹; MgSO₄·7H₂O 2 mg·l⁻¹; and bacteriological agar 3 g·l⁻¹) and the pH adjusted to 7.0.

6.2.5 Decolourization Cultures

The liquid medium for decolourization experiments was that described in Section 6.2.3 and also contained 50 mg·l⁻¹ of dye, unless otherwise mentioned. The dyes were filter-sterilised on a 0.2 µm filter (Millipore, USA) prior to addition to the sterile culture medium. 1 ml of fresh 24-hour-old cultures (approx. 0.312 g·l⁻¹ of dry weight of cells) was added to 10 ml sterile liquid medium in a 20 ml test tube. The tubes were incubated under

static anoxic conditions away from light. Control experiments were performed using the same medium without micro-organisms or dyes.

6.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization

The samples from the decolourization cultures were collected and analysed following the methodology described by Chen (2002). As all samples contained biomass and dye, concentration of biomass (first and second step) and dye (third step) were evaluated as follows:

- 1) OD_{600nm} of the sample mixtures without centrifugation: $OD_{600nm}^{X+dye} = OD_{600nm}^{dye} + OD_{600nm}^X$
- 2) OD_{600nm} of sample supernatant (sup) after centrifugation for 10 minutes at 10,000 g:
 $OD_{600nm}^{sup} = OD_{600nm}^{dye}$ and,
- 3) $OD_{\lambda_{max}}$ of sample supernatant after centrifugation: $OD_{\lambda_{max}}^{sup} = OD_{\lambda_{max}}^{dye}$

The biomass produced was determined by subtracting the value obtained on the first step from the value obtained on second. Colour removal efficiency was determined by the following equation:

$$Decolourization = \frac{A_{\lambda,initial} - A_{\lambda,final}}{A_{\lambda,initial}} \quad (16)$$

in which $A_{\lambda,initial}$ is the absorbance before the decolourization process and $A_{\lambda,final}$ is the value obtained on the third step. Each decolourization value is a mean of three parallel experiments.

6.2.7 Scanning Electron Microscopy

Samples of *Pseudomonas oleovorans* before and after decolourization were centrifuged (10,000 g x 10 min), and were fixed in glutaraldehyde 2% (v/v) and formaldehyde 4% (v/v) at room temperature. The samples were then post-fixed with osmium tetroxide 1% plus potassium ferrocyanide 0.8% and tannic acid 1%, dehydrated in graded ethanol, critical point-dried in CO₂. The samples were then dehydrated in an ethanol series, transferred to propylene oxide, air-dried, mounted on aluminium stubs with double-sided tape (Scotch™), coated with gold in sputter system in a high vacuum chamber and examined in a Jeol JSM 5600LV at an acceleration voltage of 10 kV and a working distance of 8 mm.

6.3 Results

6.3.1 Screening of Decolourizing Strains

In a preliminary study, *Pseudomonas* selection was carried out through the visualisation of colony growth on plates containing MMM and industrial textile dyes as the sole carbon source. Table 9 displays the ability of four *Pseudomonas* strains to grow on agar plates with industrial dyes as the sole carbon source.

P. cepacia was the only strain that did not show any growth on agar plates, whereas the other three strains, *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* and *P. putida*, were able to assimilate dyes as an energy source. The three strains produced little white decolourization haloes around the colonies. *P. putida* was able to assimilate nine of the 14 dyes tested; *P. aeruginosa* was able to assimilate 10 of the dyes, and *P. oleovorans* was able to assimilate 13 of the dyes.

The *Pseudomonas* strains that were able to grow on the plates exhibited creamy white colonies in 11 of the dyes tested. In only dyes (B19, B69, and R90), the *Pseudomonas* colonies exhibited colour accumulation, presenting coloured colonies simultaneously with the decolourization halo production.

Table 9 - *Pseudomonas* growth on plates with dye as sole carbon source

Dyes	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>P. putida</i>
Methyl Orange	+	-	+	+
Y87	-	-	+	-
B86	+	-	-	-
R91	+	-	+	+
B19	-	-	+	+
R90	-	-	+	-
B69	+	-	+	+
B31	+	-	+	+
B36	+	-	+	+
Y15	+	-	+	-
R34	+	-	+	+
B15	+	-	+	+
Y79	-	-	+	-
B54	+	-	+	+

+ = visible growth; - = no visible growth

6.3.2 Decolouration Cultures

As *P. cepacia* exhibited no significant growth on the plates, this strain was no longer used in the liquid cultures. Figure 14 shows the results of decolourization of the 14 dyes by the *Pseudomonas* strains under anoxic conditions.

P. aeruginosa achieved the highest colour removal rate, removing over 97% of the colour from the standard dye (methyl orange). However, *P. oleovorans* proved to be the most versatile strain in this study, as it was capable of removing colour in the liquid cultures from 12 of the dyes tested, compared to 10 dyes for *P. aeruginosa* and *P. putida*. It was not possible to determine the colour removal from Y79 and Y87, probably because their maximum absorbance spectrums overlapped the medium spectrum.

P. aeruginosa removed over 90% of the colour from B15 and as much as 79% from B31. *P. putida* was only able to remove 71% of the colour from B15. *P. oleovorans* removed 93% of the colour from B15 and as much as 82% from B31. There was low colour removal from B19, B69 and R90 by all three strains tested in liquid cultures; however, they seemed to be mineralised, as observed by the formation of a coloured precipitate at the base of the tube.

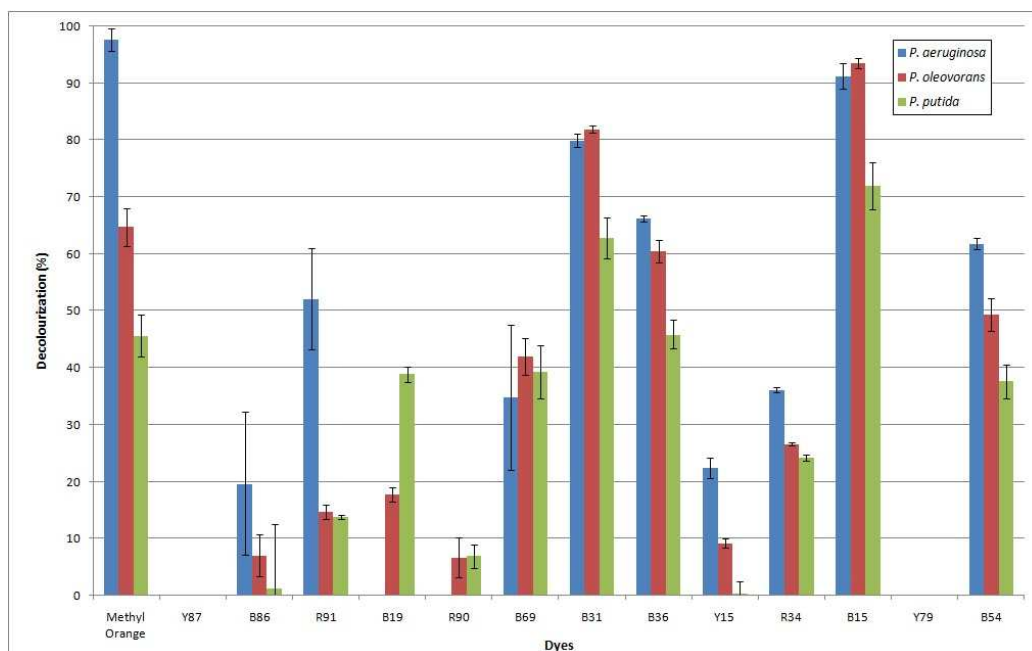


Figure 14 - Decolourization of dyes ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) in liquid cultures after 48 hours of incubation with its standard deviation.

6.3.3 Time-dependent Decolourization

To clarify the characteristics of the decolourization of industrial dyes by the three strains, a time-dependent decolourization curve for Methyl Orange ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) were studied. Figure 15 displays the time profile for Methyl Orange decolourization by *P. aeruginosa*, *P. oleovorans* and *P. putida*. There was no decolourization by any of the three strains in the first 24 hours. Only biomass production occurred in this period.

P. aeruginosa achieved over 98% decolourization after 48 hours, compared to *P. oleovorans*, which only achieved 76% after 54 hours. *P. putida* exhibited a latency period of 12 hours longer than the other strains. *P. putida* seemed to have a bioaccumulation step prior to the decolourization of Methyl Orange, since in its 12-hour latency period; the cell pellets were slightly orange. *P. aeruginosa* and *P. oleovorans* exhibited no change in the colour of the cell pellets throughout the time course of Methyl Orange decolourization.

6.3.4 Effect of Industrial Dye Concentration

To assess the maximum colour removal ability of *P. aeruginosa* and *P. oleovorans* for industrial dyes, the two strains were tested against different concentrations of B15 dye for 48 hours. Figure 16 displays colour removal from the B15 dye based on its initial concentration.

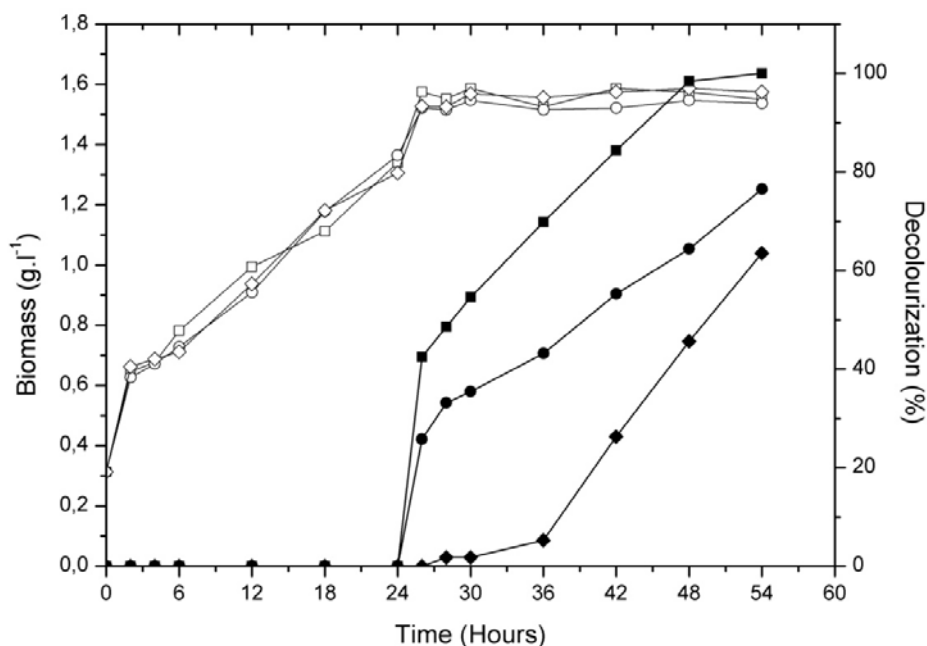


Figure 15 - Decolourization of Methyl Orange by *Pseudomonas*. *Pseudomonas aeruginosa* biomass production (□) and decolourization (■); *P. oleovorans* biomass production (○) and decolourization (●); and *P. putida* biomass production (◇), and decolourization

Both strains were able to decolourize B15 well at concentrations lower than 30 mg.l⁻¹, reaching 98% decolourization by for *P. oleovorans* and 94% for *P. aeruginosa*. Above this concentration, however, dye decolourization by *P. aeruginosa* decreased quickly;

at $70 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ only 50% decolourization was achieved. *P. oleovorans* was able to remove over 90% of dye colour at concentrations lower than or equal to $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ and up to 76% at $90 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of initial dye concentration.

6.3.5 Scanning Electron Microscopy

Scanning Electron Microscopy was performed to evaluate the bioaccumulation by the strains for some of the dyes tested. Figure 17 displays cell samples that adsorbed the B69 dye and the dye free cultures. The adsorbing cells exhibited more affinity to osmium tetroxide when compared with non-adsorbing cells, which led to higher conductivity in the SEM. The B69 dye was partially mineralised by *Pseudomonas oleovorans* and the remaining dyes seemed to involve all the cells in the medium completely.

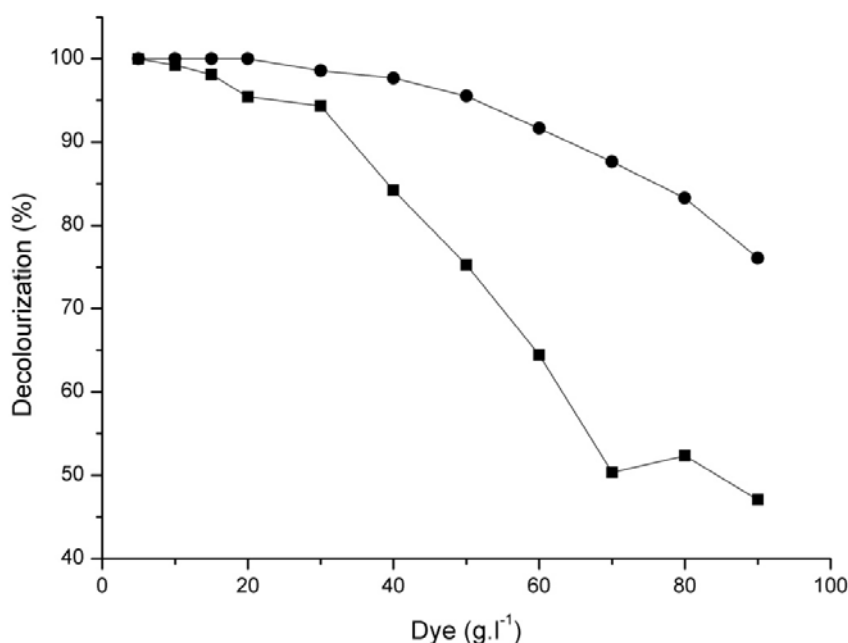


Figure 16 - Decolourization of B15 from its initial concentration. *Pseudomonas aeruginosa* (■) and *P. oleovorans* (●).

6.4 Discussion

Since dyes are extensively used in textile industries and are therefore a major source of industrial effluent contamination (Asad *et al.*, 2007; Jadhav *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008), 14 different dyes were tested. Barrangan *et al.* (2007) describes *Pseudomonas* strains with

continuous growth after 192 hours of incubation. In the present study, all 14 dyes were oxidised on plates, where they promoted substantial colony growth in just 96 hours.

Colour removal from industrial dyes can be performed by micro-organisms in two ways: bioaccumulation, in which dyes adsorb into the cell wall of the micro-organism and thus are dependent on biomass and mass transfer effects in the medium; and biodegradation, in which the dyes are oxidised by the enzymatic system of the micro-organism. Lucas *et al.* (2006) describes decolourization on plates by yeasts, with the development of cream-coloured colonies. The presence of colour in the colonies is probably due to bioaccumulation prior to biodegradation. Similar results have been described by other researchers (Chen *et al.*, 2003; Yu e Wen, 2005). This step must have been avoided for most of the dyes used in the present work, as the *Pseudomonas* colonies exhibited colour accumulation together with the decolourization halo production for only three of the 14 dyes tested (B19, B69 and R90). Although it does not provide any precise elucidation on the colour removal rate, the colour in the colonies at least partially furnishes information on the decolourization ability (whether bioaccumulative or biodegradative) of the micro-organisms studied (Yu e Wen, 2005).

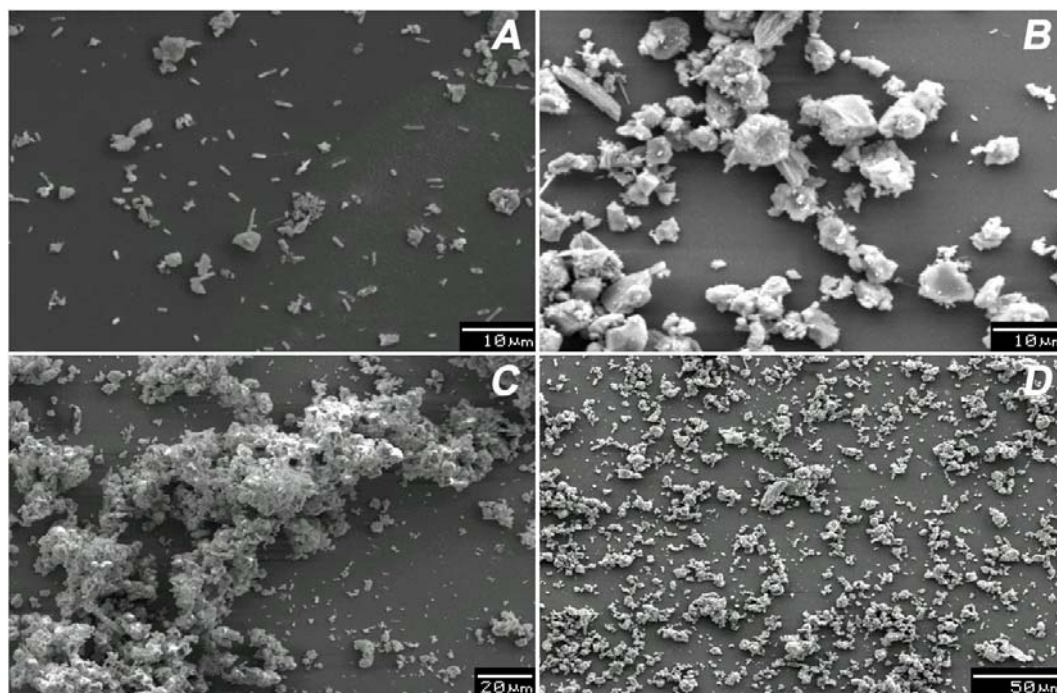


Figure 17 - A) *P. oleovorans* from dye-free medium, X1,700 ; B) Mineralization of B69 dye by *P. oleovorans*, X1,700; C) Mineralization of B69 dye by *P. oleovorans*, X650; D) Mineralization of B69 dye by *P. oleovorans*, X430.

While the screening decolourizing strains only qualitatively elucidates which strains could use industrial dyes as an energy source, no assessment could be performed regarding which strains have the best capacity. Thus, a quantitative selection in liquid cultures was proposed and in doing so, the colour removal rate for each strain could be accessed and quantified, and the selection of the strain with the best decolourization ability could be performed.

Barrangan *et al.* (2007) studied three micro-organisms (*Enterobacter* sp., *Morganella* sp. and *Pseudomonas* sp.) both separately and in combination and found that none were capable of growing in a liquid medium using dye as the sole carbon source or supplemented with glucose. Growth only occurred when the liquid medium was supplemented with peptone, yeast extract and urea. Indeed, *Pseudomonas* growth for colour removal in a liquid medium usually requires complex organic sources, such as yeast extract, peptone or a combination of complex carbon sources and carbohydrates (Chen *et al.*, 2003; Khehra *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2007).

Bacterial degradation of dyes is often an enzymatic reaction linked to anaerobiosis (Banat *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003). Thus, the bacterial reduction of dyes under anaerobic or anoxic conditions is non-specific to the kind of dye involved (Pearce *et al.*, 2003). Therefore, *Pseudomonas* degradation of industrial dyes under anoxic conditions is non-specific and, as observed, can remove colour from a wide range of industrial dyes.

Khehra *et al.* (2005) found that strains isolated from soil or sludge from textile dye waste that exhibited low colour removal (usually below 40%) were bioaccumulative. The bioaccumulation process is directly linked to biomass production. Thus, in order to promote better dye colour removal, there is a need for greater biomass production. The results of the SEM demonstrate that colour removal from the B69 dye is biomass dependent, as all the biomass produced seemed to be attached to the mineralised dye. Sani and Banerjee (1999) found an increase in *Kurthia* sp. biomass concentration mutually with an increase in crystal violet, magenta and malachite colour removal, which are three triphenylmethane dyes and must have some dependency between the dye structure and its bioaccumulation.

P. putida exhibited a latency period in the decolourization of methyl orange; the strain began to decolourize the dye only after 12 hours of the decolourization process. On the other hand, the decolourization process in *P. aeruginosa* and *P. oleovorans* probably began with the decrease in a less recalcitrant carbon source in the liquid medium, i.e. peptone and

meat extract. When the liquid medium becomes less concentrated through the bacterial consumption of nutrients, the degradation of the dye begins.

Micro-organism dye decolourization can be by adsorption or biodegradation. Thus, the membrane adsorption can be evaluated by a simple cell pellet inspection. Cells that become highly coloured do so due to dye adsorption and those that preserve their original colour do so as a result of biodegradation (Yu e Wen, 2005). *P. putida* seems to have a bioaccumulation step prior to decolourization. In the first 12 hours of its decolourization process, the strain became slightly orange, suggesting that it has a bioaccumulation step.

Kumar *et al.* (2007) states that there was no previous accumulation in Direct Blue 15 decolourization by their bacterial consortium. Likewise, *P. aeruginosa* and *P. oleovorans* exhibited no change in cell colour throughout the process, as their cell pellets remained creamy white throughout the process. This suggests that, for these two strains, if there was an initial bioaccumulation step, the dye reduction rate was too efficient for the accumulation to be noticed.

P. oleovorans proved more tolerant to the B15 dye, achieving a colour removal rate over 70% from an initial concentration of 90 mg·l⁻¹ of dye. In contrast, *P. aeruginosa* only reached a similar decolourization rate at around 50 mg·l⁻¹ of initial dye, indicating lower decolourization capacity and less tolerance to industrial dyes. There is a great variety of published studies addressing different dye concentrations of synthetic effluents, with concentrations ranging from 0.022 mg·l⁻¹ (Chen *et al.*, 2007) to 5,000 mg·l⁻¹ (Chang e Kuo, 2000). As many dyes are visible in water in concentrations as low as 1 mg·l⁻¹ and processing textile effluents have concentrations ranging from 10 to 200 mg·l⁻¹ (Pandey *et al.*, 2007), it is necessary to assess to maximum capacity of *Pseudomonas* for the removal of textile dyes.

An increase in dye concentration leads to a decrease in cell growth, which must be the result of dye toxicity causing the inhibition of metabolic activities. Azo dyes generally contain one or more sulfonic acid groups in the aromatic rings, which may act as detergents, thereby inhibiting the growth of the micro-organisms (Asad *et al.*, 2007). Such dyes may affect DNA synthesis, as it has also been reported that dyes are inhibitors of nucleic acid synthesis or cell growth (Chen *et al.*, 2003).

The results obtained with *P. aeruginosa* are similar to those described by Kalme *et al.* (2007) in their work with *P. desmolyticum*. However, a wider concentration range

(50 to 250 mg·l⁻¹) was tested and there was a longer incubation time (up to 72 hours) in the present study. This suggests that both *P. aeruginosa* and *P. oleovorans* tend to continue to degrade dyes if exposed for a longer period of time. Furthermore, *P. oleovorans* has a cultivation temperature of 28 °C, unlike *P. aeruginosa*, which is maintained at 37 °C. Kim *et al.* (2008) found that the colour removal rate increases with an increase of temperature, which makes the use of *P. oleovorans* even more promising for the industrial process of colour removal.

6.5 Conclusion

The ever increasing legislation restrictions regarding effluent discharges, combined with their toxicity, carcinogenicity and mutagenicity, makes dye contamination both an environmental problem as well as a public health problem. Among the four *Pseudomonas* species tested, *P. oleovorans* proved to be a promising tool for removing colour from industrial textile effluents contaminated with dyes. Further work should be performed to investigate environmental conditions that can optimize colour removal from industrial dyes.

6.6 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Fapesp, Capes and CNPq for financial support; and Clariant of Brazil for the dyes provided.

6.7 References

- Akhtar, S., Khan, A.A. e Husain, Q. Potential of immobilized bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere*, v.60, n.3, p.291-301. 2005.
- Asad, S., Amoozegar, M.A., Pourbabaee, A.A., Sarbolouki, M.N. e Dastgheib, S.M.M. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technology*, v.98, n.11, p.2082-2088. 2007.
- Banat, M.I., Nigam, P., Singh, D. e Marchant, R. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, v.58, p.217-227. 1996.
- Barragan, B.E., Costa, C. e Carmen Marquez, M. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments*, v.75, n.1, p.73-81. 2007.

- Ben Mansour, H., Corroler, D., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir, L. e Mosrati, R. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: Acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. *Food and Chemical Toxicology*, v.45, n.9, p.1670-1677. 2007.
- Chang, J.-S., Chou, C., Lin, Y.-C., Lin, P.-J., Ho, J.-Y. e Hu, T.L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, v.35, n.12, p.2841-2850. 2001.
- Chang, J.-S. e Kuo, T.-S. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresource Technology*, v.75, p.107-111. 2000.
- Chen, B.-Y. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. *Process Biochemistry*, v.38, p.437-446. 2002.
- Chen, C.-C., Liao, H.-J., Cheng, C.-Y., Yen, C.-Y. e Chung, Y.-C. Biodegradation of crystal violet by *Pseudomonas putida*. *Biotechnology Letters*, v.29, n.3, p.391-396. 2007.
- Chen, K.-C., Wu, J.-Y., Liou, D.-J. e Hwang, S.-C.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.101, n.1, p.57-68. 2003.
- Dafale, N., Rao, N.N., Meshram, S.U. e Wate, S.R. Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium - Biostimulation and halo tolerance. *Bioresource Technology*, v.99, n.7, p.2552-2558. 2008.
- Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J. e 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.
- El-Naggar, M.A., El-Aasar, S.A. e Barakat, K.I. Bioremediation of crystal violet using air bubble bioreactor packed with *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Research*, v.38, n.20, p.4313-4322. 2004.
- Jadhav, J.P., Parshetti, G.K., Kalme, S.D. e Govindwar, S.P. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Chemosphere*, v.68, n.2, p.394-400. 2007.
- Junghanns, C., Krauss, G. e Schlosser, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology*, v.99, n.5, p.1225-1235. 2008.

- Kalme, S.D., Parshetti, G.K., Jadhav, S.U. e Govindwar, S.P. Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Bioresource Technology*, v.98, n.7, p.1405-1410. 2007.
- Khalid, A., Arshad, M. e Crowley, D. Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.78, n.2, p.361-369. 2008.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. e Chimni, S.S. Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, v.67, n.1, p.55-61. 2005.
- Kim, S.-Y., An, J.-Y. e Kim, B.-W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. *Dyes and Pigments*, v.76, n.1, p.256-263. 2008.
- Kumar, K., Devi, S.S., Krishnamurthi, K., Dutta, D. e Chakrabarti, T. Descolorization and detoxification of Direct Blue-15 by a bacterial consortium. *Bioresource Technology*, v.98, p.3168-3171. 2007.
- Lucas, M., Mertens, V., Corbisier, A.M. e Vanhulle, S. Synthetic dyes decolourisation by white-rot fungi: Development of original microtitre plate method and screening. *Enzyme and Microbial Technology*, v.42, n.2, p.97-106. 2008.
- Lucas, M.S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J.A. e Dias, A.A. Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.51-55. 2006.
- Pandey, A., Singh, P. e Iyengar, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, n.2, p.73-84. 2007.
- Patel, R. e Suresh, S. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dye by *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*, v.99, n.1, p.51-58. 2008.
- Pearce, C.I., Lloyd, J.R. e Guthrie, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v.58, p.179-196. 2003.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. e Nigam, P. 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.

- Sani, R.K. e Banerjee, U.C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, n.7, p.433-437. 1999.
- Ulson De Souza, S.M.a.G., Forgiarini, E. e Ulson De Souza, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, v.147, n.3, p.1073-1078. 2007.
- Umbuzeiro, G.D.A., Freeman, H.S., Warren, S.H., De Oliveira, D.P., Terao, Y., Watanabe, T. e Claxton, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v.60, n.1, p.55-64. 2005.
- Yu, Z. e 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.
- Zimmermann, T., Kulla, H.G. e 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.

*7 Manuscrito Publicado no Periódico
Research and Reviews in Biosciences, v.3
pp. 183-195.*

*Este capítulo apresenta a otimização das condições dos parâmetros ambientais na remoção de cor por *Pseudomonas oleovorans*, via planejamento experimental. O primeiro planejamento experimental, fracionário (2^{n-2}), foi realizado para selecionar os parâmetros mais significativos, e o segundo planejamento, completo (2^4), foi então realizado.*

Experimental Design for decolourization of textile dye by *Pseudomonas oleovorans*

Silveira, E.^{1,*}; Marques, P.P.²; Santana, J.C.C.³; Lima-Filho, J.L.⁴; Mazzola, P.G.⁵; Porto, A.L.F.⁶; Tambourgi, E.B.⁷

¹School of Chemical Engineering - State University of Campinas, Unicamp – P.O. Box 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brazil. E-mail: silveiraedgar@gmail.com

²LIKA – Federal University of Pernambuco, UFPE – Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil. E-mail: petruspm@hotmail.com

³Ninth of July University, Uninove, R. Vergueiro, 235/249, 01504-001, São Paulo-SP, Brazil. E-mail: jccsantana@yahoo.com.br

⁴LIKA – Federal University of Pernambuco, UFPE – Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil. E-mail: joseluiz60@gmail.com

⁵Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Unicamp – P.O. Box 6111, 13083-970, Campinas-SP, Brazil. E-mail: pmazzola@fcm.unicamp.br

⁶DMFA/Cenapesq – Federal Rural University of Pernambuco, UFRPE – Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil. E-mail: analuporto@yahoo.com.br

⁷ School of Chemical Engineering - State University of Campinas, Unicamp – P.O. Box 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brazil. E-mail: eliamtam@feq.unicamp.br

* Tel: +551935213952 Fax: +551935213894 E-mail: silveiraedgar@gmail.com

Abstract

The present study describes the optimization of environmental conditions in colour removal by *Pseudomonas oleovorans* of an industrial textile dye. The first, a factorial design (2^{n-2}) was performed to screen the most significant parameters and the second one, a full experimental design (2^4) was then carried out. Decolourization of the industrial dye was negatively influenced by tube volume and dye concentration, which is probably related to the maximal capacity of the strain to decolourize azo dyes. The decolourization process showed to be time-dependent. The best conditions for dye decolourization by *Pseudomonas oleovorans* based on the experimental design and economic factors were agitation speed, 0 RPM, pH 8.5, temperature 32 °C, 25% of tube volume, initial culture size of 0.16 g·l⁻¹, dye concentration of

50 mg L⁻¹. Under such conditions, a near total decolourization (95.4%) was achieved after 32 hours.

Keywords: decolourization; industrial dye; *Pseudomonas oleovorans*; experimental design; optimization.

7.1 Introduction

There are over 100,000 commercially available dyes with over 7×10^7 tons of dyestuff produced annually worldwide (Robinson *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2005). In Brazil alone, 26,500 tons are produced (Ulson De Souza *et al.*, 2007). These dyes are widely used in a number of industries, such as textiles, food, cosmetics and paper printing, with the textile industry the largest consumer of dyes (Pandey *et al.*, 2007).

Considerable attention has been given to issues associated with the presence of coloured compounds in aqueous wastewater generated from textile industries. Colour is the first contaminant recognised in wastewater, however in addition to the aesthetic problem, the dyes obstruct light penetration and oxygen transfer in bodies of water. Without an adequate treatment, dyes are stable and can remain in the environment for an extended period of time (Silveira *et al.*, 2009).

Currently, the most popular methods of colour removal from wastewaters involve physical and chemical processes that can be costly and usually involve the formation of a concentrated sludge that creates a secondary, highly significant disposal problem (Chang e Lin, 2000). Alternative, biodegradative systems based on colour removal using whole bacterial cells have been shown to be highly effective (Pearce *et al.*, 2003).

Environmental biotechnology is constantly expanding efforts in the biological treatment of dye-contaminated wastewaters. Although numerous microorganisms are capable of decolourizing dyes, only a few are able to mineralise these compounds into CO₂ and H₂O (Junghanns *et al.*, 2008). Under aerobic conditions, azo dyes are not easily metabolized (Robinson *et al.*, 2001). However, under anaerobic conditions, several bacterial strains, including *Pseudomonas oleovorans*, can enzymatically reduce the azo bond in the dye molecule to produce colourless by-products (Silveira *et al.*, 2009).

The statistical design of experiments is a widely used methodology in upstream and downstream processing (Kammoun *et al.*, 2008; Khosravi-Darani e Zoghi, 2008; Porto *et al.*, 2008), which differs from the classical optimization methods. The further method includes single factor variation, maintaining other factors constant. This method is not suitable for multifactor optimization not only because it is time-consuming but also because it is unable to detect the true optimum due to the interaction between factors (Kammoun *et al.*, 2008).

In order to avoid multifactorial problems, the statistical design of experiments is used. These designs require a relatively small number of runs per factors allowing the identification of the most important variables and optimum ranges, as well as the experimental verification of this identified optimum, the designs can also indicate a promising direction for further experiments (Barros-Neto *et al.*, 2001; Lim e Lee, 2008).

The application of experimental design and response surface methodology (RSM) in textile effluent treatment processes can lead to improved decolourization, reduced process variability, time and overall costs. Additionally the factor influencing the experiments can be identified, optimized and possible synergic or antagonistic interactions that may exist between factors can be evaluated (Tavares *et al.*, 2009). This work describes the optimization of environmental conditions for the decolourization of industrial dye by *Pseudomonas oleovorans* in submerge cultures.

7.2 Materials and Methods

7.2.1 Microorganisms

The microorganism was obtained from the Brazilian Collection of Industrial and Environmental Microorganism (CBMAI) of the University of Campinas, previously identified as *Pseudomonas oleovorans* (CBMAI 703).

The microorganism was preserved in cryotubes containing glass beads and glycerol 50% (v/v). Each cryotube was loaded from the same initial culture and had an average of 30 beads. Thus, it was possible to use the same cell generation for all experiments (Silveira *et al.*, 2009).

7.2.2 Dyes and Reagents

Textile dye was obtained with the kind permission of Clariant of Brazil (Sao Paulo, Brazil). As the dye is for commercial use, the commercial name has been omitted in this

study, receiving the following codename: B15 (C.I. 13390). The dye was filter-sterilised on a 0.2 μm filter (Millipore, USA) prior to addition to sterile culture medium. All other reagents were of analytical grade.

7.2.3 Pre-Culture Conditions

For each experiment, an Erlenmeyer flask containing 20 ml of Nutrient Broth (meat extract 3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and peptone 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) was inoculated with a single glass bead from the same cryotube and incubated at 28 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h when an early stationary phase or final exponential phase was reached.

7.2.4 Statistical Design of Experiments

Optimization of the decolourization condition was firstly performed by a fractional statistical design of experiments (2^{n-2}), and the studied variables are listed in Table 10. According to the results obtained, a second statistical design of experiments (2^n) was performed aiming the best decolourization conditions.

All the experiments were performed in anoxic conditions (without aeration). The second experimental design was performed with an inoculum concentration of 0.16 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and a reactor volume of 25%. The studied variables of the second design are listed in Table 11. The results obtained were analysed in Statistica 7.0 (Statsoft, Inc., USA) statistical package (Barros-Neto et al., 1995; 2001).

Table 10 - Studied parameters on decolourization under submerge culture (2^{n-2})

Variables	Levels		
	-1	0	+1
Dye Concentration (mg l^{-1})	30	50	70
Agitation (RPM)	0	75	150
Initial pH	6.0	7.0	8.0
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	27	32	37
Time (hours)	36	48	60
Volume (%)	25	50	75
Inoculum (mg l^{-1})	0.16	0.32	0.48

7.2.5 Decolourization Cultures

The decolourization cultures were performed in 500 ml screw-topped bottles, containing 125 ml of Nutrient Broth (meat extract 3 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, peptone 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and adjusted pH = 8.5) supplemented with 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of dye, and inoculated with 10 ml of fresh

24-hours-old cultures (approx. 0.16 g·l⁻¹ of dry weight of cells). The bottles were incubated under static anoxic conditions away from light at 32 °C for 36 hours. Control experiments were performed using the same medium without microorganisms or dyes.

Tabela 11 - Studied parameters on decolourization under submerge culture (2ⁿ)

Variables	Levels		
	-1	0	+1
Dye Concentration (mg l ⁻¹)	40	55	70
Time (hours)	24	36	48
Temperature (°C)	24	28	32
Initial pH	7.5	8.0	8.5

7.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization

The sample from the decolourization cultures were collected and analysed following the methodology described previously (Silveira *et al.*, 2009). As all samples contained biomass and dye, biomass concentration (first and second step) and dye (third step) were evaluated as follows:

- 1) OD_{600nm} of sample mixtures without centrifugation: $OD_{600nm}^{X+dye} = OD_{600nm}^{dye} + OD_{600nm}^X$;
- 2) OD_{600nm} of sample supernatant (sup) after centrifugation for 10 minutes at 10,000 g: $OD_{600nm}^{sup} = OD_{600nm}^{dye}$; and,
- 3) OD_{609nm} of sample supernatant after centrifugation: $OD_{609nm}^{sup} = OD_{609nm}^{dye}$.

The biomass produced was determined by subtracting the value obtained on the first step from the value obtained on the second. Colour removal efficiency was determined by the following equation:

$$Decolourization = \frac{A_{\lambda initial} - A_{\lambda final}}{A_{\lambda initial}} \quad (17)$$

in which $A_{\lambda initial}$ represented the absorbance before the decolourization process and $A_{\lambda final}$ the value obtained during the third step. Each decolourization value was a mean of three parallel experiments.

Decolourization was also determined by wavescan, which was performed in an Ultrospec 3000 (GE Healthcare, USA). Samples were scanned from 240 to 790 nm to

measure the colour removal and aromatic compounds degradation by *Pseudomonas oleovorans*, culture medium without industrial dye was used as blank.

7.3 Results and Discussion

7.3.1 Factorial Experimental Design (2^{7-2})

The responses obtained from the 35 runs of the factorial experimental design (2^{7-2}), and the summarizations of significance of the variables are listed in Table 12 and 13, respectively. Tube volume and dye concentration were the variables which suffered the greatest influence, showing negative responses; inoculum concentration showed a negative response as well, though not as high as the former variables. On the other hand, time, pH value and temperature showed a positive effect over the decolourization process of the industrial dye studied. Agitation showed a positive effect as well, though not significant.

The results for biomass production within the decolourization process showed that the temperature was the most influenced variable with a negative effect, as well as the concentration of inoculum. The pH value and e reactor volume showed a positive significant effect. Time, dye concentration and agitation showed no significance upon biomass production, and only the former variable had a positive effect.

Agitation had not shown significant increase during the decolourization process, and therefore was not studied any further in this work. The concentration of inoculum was fixed at $0.16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, as well as the tube volume, which was fixed at 25% based on the theory by Umbuzeiro *et al.* (2005) and Chen *et al.* (2003) in which the decrease of decolourization based on the volume and the dye concentration should be explained by the rate between overall dye mass presented in the medium and the initial biomass presented, which leads to protein production inhibition, due to dyes genotoxicity, or to the aromatic rings presented in the dye, which may affect the DNA synthesis and therefore inhibit cell growth.

7.3.2 Full Experimental Design (2^4)

The responses obtained from 19 runs of the second experimental design (2^4), and the summarizations of the significance of variables are listed in table 14 and 15, respectively. In this set of experiments, the temperature was the most influencing variable, with a positive effect over dye decolourization; time and pH also showed positive effects upon the decolourization process. Dye concentration was the only parameter which presented a

negative effect, however all the parameters studied showed statistically significant values at a 95% confidence level.

Table 12 - Conditions and Results of the 2^{7-2} -factorial experimental design selected for industrial dye decolourization

Run	temp ^a	pH	dye ^b	agit ^c	vol ^d	time ^e	Inoc ^f	Decolour ^g	Biomass ^h
1	27	8	30	150	25	60	0.16	96.62	0.107
2	27	8	70	0	75	60	0.48	69.65	0.106
3	27	6	70	150	25	60	0.16	90.59	0.168
4	27	6	70	0	25	36	0.48	72.88	0.123
5	27	6	30	150	75	36	0.48	83.88	0.149
6	27	6	70	0	75	36	0.16	54.62	0.181
7	27	8	70	150	25	36	0.48	79.02	0.199
8	27	6	70	150	75	60	0.48	66.80	0.129
9	27	6	30	0	25	60	0.48	89.48	0.240
10	27	6	30	0	75	60	0.16	93.15	0.205
11	27	6	30	150	25	36	0.16	93.24	0.181
12	27	8	30	0	75	36	0.48	84.75	0.246
13	27	8	30	0	25	36	0.16	88.13	0.224
14	27	8	70	0	25	60	0.16	95.34	0.263
15	27	8	30	150	75	60	0.16	94.88	0.327
16	27	8	70	150	75	36	0.16	67.01	0.289
17*	32	7	50	75	50	48	0.32	89.01	0.089
18*	32	7	50	75	50	48	0.32	88.84	0.086
19*	32	7	50	75	50	48	0.32	88.45	0.085
20	37	8	30	150	25	36	0.16	94.31	0.088
21	37	6	30	150	75	60	0.16	90.44	0.100
22	37	8	70	0	25	36	0.48	95.68	0.075
23	37	6	70	150	75	36	0.16	52.85	0.178
24	37	8	30	150	75	36	0.48	89.67	0.088
25	37	8	30	0	25	60	0.48	98.36	0.101
26	37	6	70	150	25	36	0.48	94.39	0.102
27	37	6	70	0	75	60	0.48	62.13	0.091
28	37	8	30	0	75	60	0.16	96.43	0.089
29	37	6	70	0	25	60	0.16	98.10	0.066
30	37	6	30	0	25	36	0.16	95.85	0.085
31	37	8	70	150	25	60	0.16	97.67	0.073
32	37	6	30	150	25	60	0.48	96.14	0.043
33	37	8	70	0	75	36	0.16	79.45	0.089
34	37	6	30	0	75	36	0.48	78.09	0.084
35	37	8	70	150	75	60	0.48	73.79	0.082

^atemperature (°C); ^bdye concentration (mg·l⁻¹); ^cagitation (RPM); ^dvolume (%); ^etime (hours); ^finoculum concentration (g·l⁻¹); ^gdecolourization (%); ^hbiomass (g·l⁻¹); * central point repetitions

All the variables studied presented a significant effect over biomass production. The temperature and process time were the variables which appeared to be more significant for biomass production, although pH and dye concentration showed to be significant as well.

Temperature also influenced biomass production negatively; this could be a result of the change from natural temperature for *P. oleovorans* incubation (Silveira *et al.*, 2009). The decrease in temperature in this case was quite important based on economical issues, when decolourization was performed at temperatures near 28-32 °C; there was no need to warm the medium prior to the decolourization process.

Table 13 - Estimated effects of studied parameters (t distribution)

Parameter	Decolourization (%)	Biomass ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	46.5218 ^a	-141.763 ^a
Initial pH	52.6789 ^a	24.6371 ^a
Dye ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	-129.685 ^a	-9.5515 ^a
Agitation (RPM)	4.1846	0.3984
Volume (%)	-144.89 ^a	27.569 ^a
Time (hours)	63.5059 ^a	-18.7553 ^a
Inoculum ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	-23.3211 ^a	-406087 ^a

^aStatistically significant values (at the 95% confidence level)Table 14 - Conditions and Results of the 2^4 – experimental design selected for industrial dye decolourization

Runs	Time ^a	Dye ^b	pH	Temp ^c	Decolour ^d	Biomass ^e
1	24	40	7.5	24	45.06	0.106
2	24	40	7.5	32	73.01	0.169
3	24	40	8.5	24	51.77	0.162
4	24	40	8.5	32	80.68	0.226
5	24	70	7.5	24	43.35	0.103
6	24	70	7.5	32	55.27	0.164
7	24	70	8.5	24	50.26	0.145
8	24	70	8.5	32	66.49	0.212
9*	36	55	8.0	28	69.26	0.204
10*	36	55	8.0	28	69.45	0.201
11*	36	55	8.0	28	69.75	0.200
12	48	40	7.5	24	57.82	0.140
13	48	40	7.5	32	85.77	0.274
14	48	40	8.5	24	75.15	0.224
15	48	40	8.5	32	85.69	0.304
16	48	70	7.5	24	50.78	0.145
17	48	70	7.5	32	87.78	0.292
18	48	70	8.5	24	61.10	0.258
19	48	70	8.5	32	90.50	0.348

^atime (hours); ^bdye concentration ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$); ^ctemperature ($^{\circ}\text{C}$); ^ddecolourization (%);^ebiomass ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$); * central point repetitions

In many systems, the rate of colour removal increases with temperature, within a defined range depending on the system. The temperature required to produce the maximum rate of colour removal tends to correspond to the optimum cell culture growth temperature (Chang *et al.*, 2001), in present case 28-32 $^{\circ}\text{C}$.

Culture time positively affected dye decolourization suggesting that the medium dissolved oxygen, as well as the available oxygen within the tube, exerting a limiting role at the beginning of the decolourization process, as the oxygen competes with the azo bound as

an electron receptor. Once extinct, and when the redox potential was reached, the effective dye decolourization began (Bromley-Challenor *et al.*, 2000).

Table 15 - Estimated effects of studied parameters (t distribution)

Parameter	Decolourization (%)	Biomass (g•l ⁻¹)
Time (hours)	130.2372 ^a	83.82709 ^a
Dye (mg•l ⁻¹)	-50.0103 ^a	7.445959 ^a
pH	63.55008 ^a	58.36671 ^a
Temperature (°C)	192.1682 ^a	84.78786 ^a

^aStatistically significant values (at the 95% confidence level)

During the cell growth stage, the oxygen present would have a significant effect upon the physiological characteristics of cells. During the dye reduction stage, if there is any oxygen dissolved in the cell environment, the oxygen would inhibit the dye reduction mechanism. This could be caused as the electrons released from the electron donors by the cells would preferentially used to reduce oxygen rather than dyes (Yoo *et al.*, 2001).

The pH results suggest that coloured wastewaters should be buffered to enhance colour removal. Biological reduction of the dyes can result in an increase in the pH due to the release of aromatic amines from the metabolism of dyes, which is more basic than the original dye (Willmott, 1997). Chang *et al.* (2001) found that the dye reduction rate increased nearly 2.5-fold as the pH was raised from 5.0 to 7.0, whereas the rate became insensitive to pH in a range from 7.0 to 9.5.

Dye concentration can also influence the efficiency of colour removal through a combination of factors including dye toxicity at high concentrations, and the ability of the enzymes involved in the process to recognise the substrate efficiently at very low concentrations. Indeed, the kinetic model that governs the process efficiency of colour removal of dyes by whole bacterial cells can be described using a single-site binding model, such as the Michaelis-Menten Model:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (18)$$

where; v is the observed velocity of the reaction at a given substrate concentration $[S]$, $V_{\max}$ is the maximum velocity at a saturating concentration of the substrate and K_m is the Michaelis constant (Hsueh e Chen, 2007).

Wuhrmann *et al.* (1980) observed that after a rapidly reduction of colour, the rate of colour removal decreased more rapidly than would be predicted by a first order reaction. This should be attributed to the initial dye adsorption and mass transport within the biomass (Silveira *et al.*, 2009). It has also been observed that the higher the dye concentration, the longer the time required to totally remove colour (Sani e Banerjee, 1999).

7.3.3 Response Surface Methodology

To identify an optimum within the range of variables a Response Surface Methodology (RSM) was established to propose the minimization of the number of experiments (Weuster-Botz, 2000). Figure 18 shows the response surface graphic obtained as a function of time and temperature over the decolourization rate. A considerable increase in the decolourization of 1.4-fold was observed with the increase of temperature from 24 to 32 °C, as well as an increase of 1.27-fold with the increase of time. The overall increase of the entire process was over 2-fold.

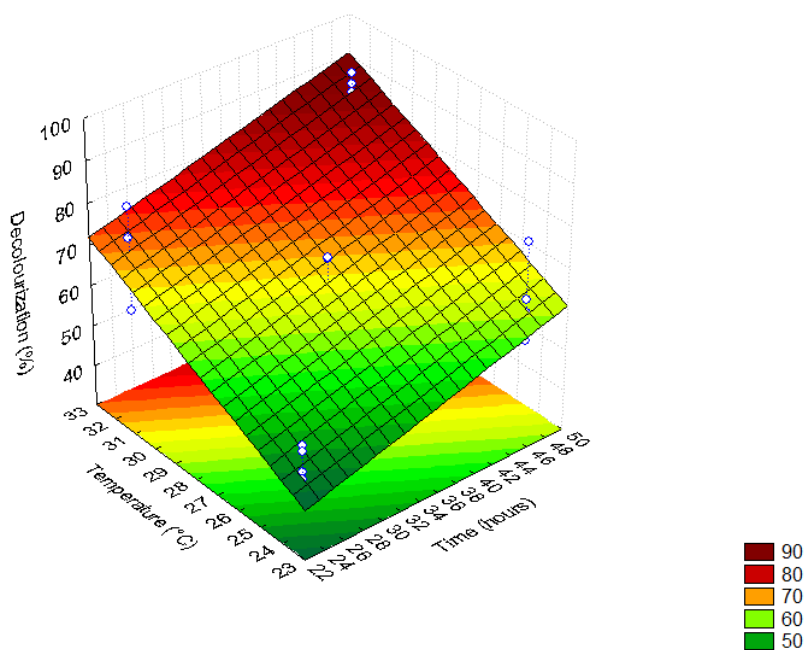


Figure 18 - Response Surface of decolourization of B15 dye as a function of temperature and time

According to Weuster-Botz (2000), the success of a statistical experimental design for optimization of a process depends on the randomly correct choice of variable ranges. Figure 19 shows the decolourization pattern as a function of time and pH value (figure 2a), as

a function of time and dye concentration (figure 2b), as a function of temperature and pH value (figure 2c) and as a function of temperature and dye concentration (figure 2d). There was a slight increase in the decolourization with the increase of pH value, and also an increase of decolourization rate as dye concentration decreased. The main objective of RSM was to determine the optimum conditions for the system or to determine a region that satisfied operating specifications (Mohana *et al.*, 2008).

7.3.4 Decolourization Process of Optimized Cultures

Figure 20 shows the *Pseudomonas oleovorans*' decolourization profile before and after optimization of conditions. Before condition optimization the process took over 48 hours to achieve a decolourization of over 95% (colour removal of $45 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), and after optimization this decolourization was achieved after only 36 hours.

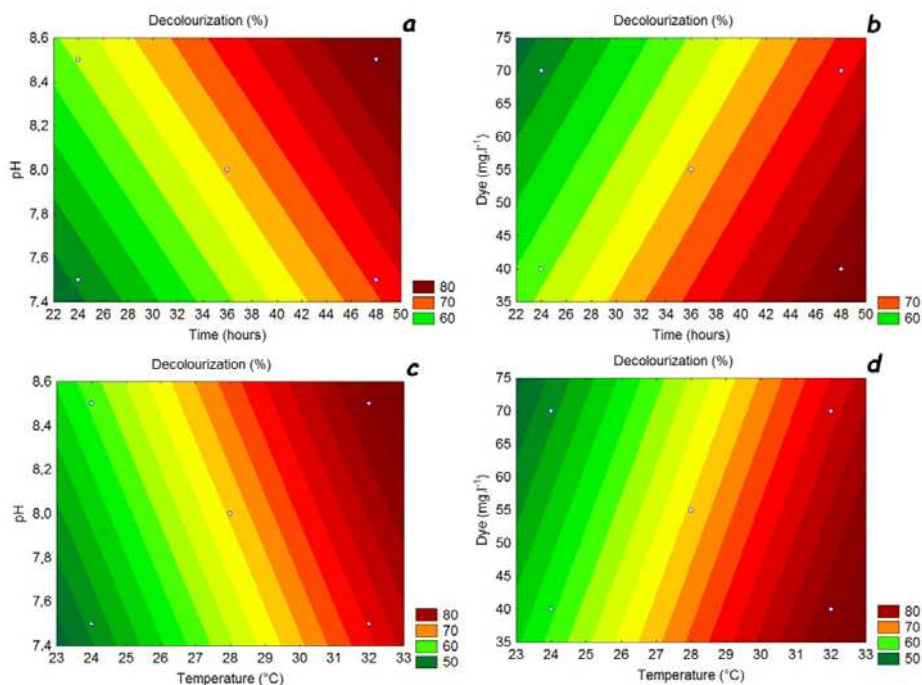


Figure 19 - a) Decolourization as a function of time and pH value; b) Decolourization as a function of time and dye concentration; c) Decolourization as a function of temperature and pH value; and d) Decolourization as a function of temperature and dye concentration

UV-Vis scan (240-790 nm) of supernatant at different time intervals is presented in Figure 21. The authors observed that the absorbance (609 nm) was constantly reduced along the 36 hours of decolourization process; also a reduction in the UV spectrum within the process was also observed.

According to Brand & Eglinton (1965), the strong absorbance at 200-300 nm of a solution is consistent for aromatic amines. Pearce *et al.* (2008) described the decolourization of pigments by *Shewanella* strain J18 143, in which there was a reduction of its $\lambda_{\max}$ and an increase in UV spectrum, suggesting the formation of high quantity of aromatic amines.

The formation of aromatic amines resulting from decolourization is a common problem originated from the biological degradation of dyes. Ulson De Souza *et al.* (2007) suggested that biological treatment should be considered as a pre-treatment, requiring a post-treatment for the removal of organic compounds (i.e. aromatic amines) remaining in the effluent. This should not be a concern with *Pseudomonas oleovorans* decolourization of dyes, as an almost complete removal of UV spectrum was observed.

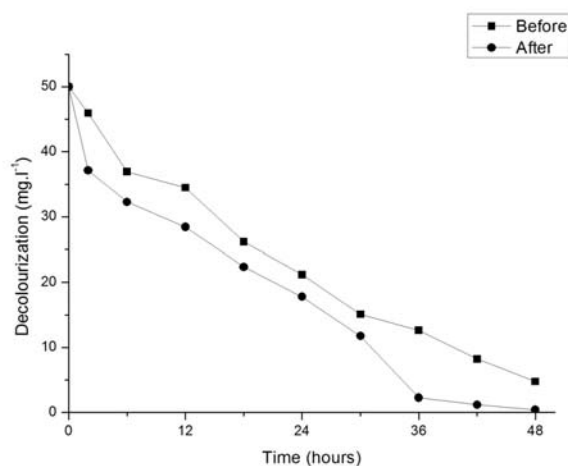


Figura 20 - Decolourization profile before (initial pH 6.5; 37°C; inoculum concentration 0.32 g.l⁻¹; reactor volume 50%; agitation speed 0 rpm) and after the optimization.

7.4 Conclusion

P. oleovorans showed to be a good decolourizing tool for treatment of dyes, and the design of experiments along with RSM seems to be an adequate methodology to optimize the colour removal and dye degradation. The use of RSM improved decolourization process efficiency in 2-fold, and not only the dye chromophore group dye was reduced, but the aromatic amines as well. The best conditions for dye decolourization based on RSM and economic factors were pH 8.5, temperature 32 °C, 25% of tube volume, an initial culture size of 0.16 g.l⁻¹, and dye concentration of 50 mg.l⁻¹ in static anoxic conditions.

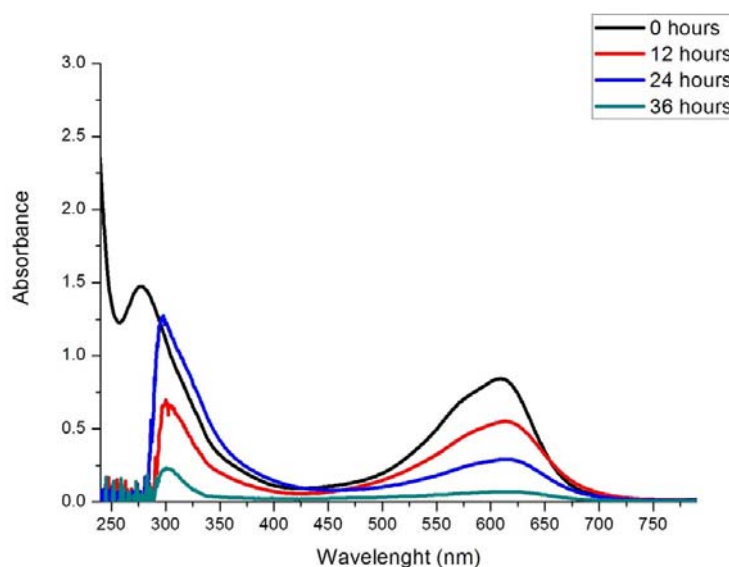


Figure 21 - B15 dye's wvescan along the decolourization process

7.5 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Fapesp for financial support; and Clariant of Brazil for the dyes provided.

7.6 References

- Akhtar, S., Khan, A.A. e Husain, Q. Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere*, v.60, n.3, p.291-301. 2005.
- Barros-Neto, B., Scarminio, I.S. e Bruns, R.E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: EDUNICAMP. 1995
- Barros-Neto, B., Scarminio, I.S. e Bruns, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: EDUNICAMP. 2001
- Brand, J.C.D. e Eglinton, G. *Applications of spectroscopy to organic chemistry*. London: Oldbourne Press. 1965
- Bromley-Challenor, K.C.A., Knapp, J.S., Zhang, Z., Gray, N.C.C., Hetheridge, M.J. e Evans, M.R. Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Water Research*, v.34, n.18, p.4410-4418. 2000.

- Chang, J.-S., Chou, C., Lin, Y.-C., Lin, P.-J., Ho, J.-Y. e Hu, T.L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research*, v.35, n.12, p.2841-2850. 2001.
- Chang, J.S. e Lin, Y.C. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol. Prog.*, v.16, n.6, p.979-985. 2000.
- Chen, K.-C., Wu, J.-Y., Liou, D.-J. e Hwang, S.-C.J. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.101, n.1, p.57-68. 2003.
- Hsueh, C.-C. e Chen, B.-Y. Comparative study on reaction selectivity of azo dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Journal of Hazardous Materials*, v.141, n.3, p.842-849. 2007.
- Junghanns, C., Krauss, G. e Schlosser, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology*, v.99, n.5, p.1225-1235. 2008.
- Kammoun, R., Naili, B. e Bejar, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for [alpha]-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*, v.99, n.13, p.5602-5609. 2008.
- Khosravi-Darani, K. e Zoghi, A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane bagasse: Experimental design for citric acid production. *Bioresource Technology*, v.99, n.15, p.6986-6993. 2008.
- Lim, J.H. e Lee, J.S. A statistical design and analysis illustrating the interactions between key experimental factors for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.322, n.1-3, p.155-163. 2008.
- Mohana, S., Shrivastava, S., Divecha, J. e Madamwar, D. Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology*, v.99, n.3, p.562-569. 2008.
- Pandey, A., Singh, P. e Iyengar, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, n.2, p.73-84. 2007.
- Pearce, C.I., Guthrie, J.T. e Lloyd, J.R. Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143. *Dyes and Pigments*, v.76, n.3, p.696-705. 2008.

- Pearce, C.I., Lloyd, J.R. e Guthrie, J.T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, v.58, p.179-196. 2003.
- Porto, T.S., Medeiros E Silva, G.M., Porto, C.S., Cavalcanti, M.T.H., Neto, B.B., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Porto, A.L.F. e Pessoa Jr, A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v.47, n.4, p.716-721. 2008.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. e Nigam, P. 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.
- Sani, R.K. e Banerjee, U.C. Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, n.7, p.433-437. 1999.
- Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.2, p.230-235. 2009.
- Tavares, A.P.M., Cristóvão, R.O., Loureiro, J.M., Boaventura, R.a.R. e Macedo, E.A. Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase. *Journal of Hazardous Materials*, v.162, n.2-3, p.1255-1260. 2009.
- Ulson De Souza, S.M.a.G., Forgiarini, E. e Ulson De Souza, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, v.147, n.3, p.1073-1078. 2007.
- Umbuzeiro, G.D.A., Freeman, H.S., Warren, S.H., De Oliveira, D.P., Terao, Y., Watanabe, T. e Claxton, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, v.60, n.1, p.55-64. 2005.
- Weuster-Botz, D. Experimental design for fermentation media development: Statistical design or global random search? *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.90, n.5, p.473-483. 2000.
- Willmott, N.J. *The use of bacteria-polymer composites for the removal of colour from reactive dye effluents*. (Ph.D.). University of Leeds, UK, 1997.

Wuhrmann, K., Mechsner, K. e Kappeler, T. Investigation on rate-determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.9, n.4, p.325-338. 1980.

Yoo, E.S., Libra, J. e Adrian, L. Mechanism of Decolorization of Azo Dyes in Anaerobic Mixed Culture. *Journal of Environmental Engineering*, v.127, n.9, p.844-849. 2001.

8 Manuscrito Enviado ao XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química

*Este capítulo apresenta a descoloração de
corante industrial por *P. oleovorans* em cultura submersa Fed-Batch.*

Descoloração do Corante Industrial B15 por *Pseudomonas oleovorans* em Fermentação por Fed-Batch

Silveira, E.¹, Marques, P.P.², Porto, A.L.F.³, Tambourgi, E.B.⁴

¹Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
e-mail: silveiraedgar@gmail.com

²Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
e-mail: petruspm@gmail.com

³Universidade Federal Rural de Pernambuco, DMFA
e-mail: analuporto@yahoo.com.br

⁴Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química
e-mail: eliaam@feq.unicamp.br

Resumo

Este trabalho descreve a descoloração de corante industrial por *P. oleovorans* em cultura submersa em Fed-Batch. Os corantes industriais utilizados foram cedidos pela Clariant do Brasil (São Paulo, Brasil). Como os mesmos são de uso comercial, os corantes receberam a seguinte codificação: B15 (C.I. 13390); B31 (C.I. 20460); B54 (C.I. 26360); B86 (C.I. 26400); R91 (C.I. 18800); e Y87 (C.I. 22910). Para cada experimento, um frasco de 500 ml com tampa rosqueada, contendo 160 ml de Caldo Nutriente foram inoculados com 0,16 g.l⁻¹ de uma cultura em fase estacionária inicial ou fase exponencial final, e incubada a 32 °C, suplementada com 50 mg.l⁻¹ de corante a cada 24 horas. Os resultados demonstram que após 216 horas do processo de descoloração foi possível remover mais de 347 mg.l⁻¹ de corante do meio. Estes resultados sugerem que com a descoloração em Fed-Batch ocorre um aumento de mais de 50% na produtividade em relação ao processo convencional de descoloração.

Palavras-chave: Descoloração, Corantes azo, *Pseudomonas*, fed-batch.

8.1 Introdução

Existem mais de 100.000 corantes disponíveis comercialmente com mais de 7×10^7 toneladas de insumos produzidos anualmente no mundo (Akhtar *et al.*, 2005), das quais 26.500 toneladas são produzidas somente no Brasil (Silveira *et al.*, 2009a).

As indústrias têxteis são uma das indústrias que mais consomem água no mundo. A água é o único carregador eficiente de corantes e outros compostos utilizados para os processos de coloração. Em média uma indústria têxtil consome de 100.000 a 150.000 litros de água por tonelada de material têxtil tratado (Li e Guthrie, 2010).

Sem o tratamento adequado, os corantes têxteis podem permanecer no meio ambiente por um longo período de tempo (Bafana *et al.*, 2009). Apesar dos métodos químicos integrados, i.e. oxidação, radiação, reagente de Fenton, aparentar serem viáveis para o tratamento de efluentes, os métodos biológicos devem ser utilizados preferencialmente quando considerado os custos e vantagens técnicas (Yu *et al.*, 2010).

A biotecnologia ambiental está constantemente expandindo esforços no tratamento biológico de efluentes contaminados com corante. Embora inúmeros microrganismos sejam capazes de descolorir corantes, apenas poucos são capazes de mineralizar em CO_2 e H_2O (Junghanns *et al.*, 2008).

Em condições aeróbicas, os corantes azos não são facilmente metabolizados (Robinson *et al.*, 2001). Contudo, em condições anaeróbicas, várias espécies de bactéria, incluindo a *Pseudomonas oleovorans*, podem reduzir enzimaticamente as ligações azo na molécula de corante e produzir subprodutos incolores (Silveira *et al.*, 2009a; Silveira *et al.*, 2009b).

Este trabalho descreve a descoloração de corante industrial por *P. oleovorans* em cultura submersa em Fed-Batch.

8.2 Materiais e Métodos

8.2.1 Microrganismos

As amostras utilizadas foram obtidas da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) da Universidade Estadual de Campinas, previamente identificadas como (CBMAI 703).

8.2.2 Conservação dos Microrganismos

Os microrganismos foram preservados em criotubos contendo miçangas de vidro e glicerol a 10%. Cada criotubo foi inoculado a partir da mesma cultura inicial e continha em média 25 a 30 miçangas de vidro, possibilitando assim a utilização da mesma geração de células em todos os experimentos.

8.2.3 Meio de Cultura para Adaptação dos Microrganismos

Uma miçanga de vidro foi inoculada em Erlenmeyer contendo 20 mL de caldo nutriente (extrato de carne 3 g l⁻¹; e peptona 5 g l⁻¹), e incubada na temperatura ótima de cada microrganismo (28 ou 37 °C) por 24 horas, tempo necessário para que a cultura atinja o fim da fase exponencial ou início da fase estacionária.

8.2.4 Corantes

Os corantes têxteis utilizados foram doados pela Clariant do Brasil (São Paulo, Brasil) e tendo em vista que os mesmos são de uso comercial da empresa, seus nomes e estrutura molecular serão omitidos ao longo do trabalho. Aos corantes utilizados, foram determinadas siglas de identificação, as quais estão listadas a seguir: B15; B31; B54; B86; R91; e Y87.

8.2.5 Descoloração de Corantes por Cultivo Submerso

Uma pré-cultura em fase exponencial final, ou em fase estacionária inicial foi inoculada em garrafas de 500 ml contendo caldo nutritivo contendo 50 mg·l⁻¹ do corante estudado. Os corantes utilizados foram esterilizados por filtração, em filtro de 0,2 µm (Millipore, USA), antes da sua adição em meio de cultura estéril.

A descoloração foi realizada em fermentação estática, pH inicial de 8,5, 32 °C, 25% de volume total do reator e cultura inicial com densidade óptica de 0,500 D.O. (aproximadamente 0,16 g·l⁻¹) como descrito previamente (Silveira *et al.*, 2009a).

8.2.6 Descoloração de Corantes em *Fed-Batch*

Após o procedimento descrito no item 8.2.5, as culturas foram alimentadas com uma solução concentrada de corante, com o intuito de retomar a concentração de corante inicial. A alimentação foi realizada sempre que a concentração do corante contido no meio de cultura atingisse valores menores iguais a 3,6 mg·l⁻¹.

8.2.7 Determinação do Crescimento Celular e da Descoloração

As amostras das culturas de decoloração coletadas foram analisadas de acordo com a metodologia descrita por (Silveira *et al.*, 2009b):

- a) Quantificação da absorbância da amostra a 600 nm;
- b) Centrifugação por 10 minutos a 13.000 g a 4 °C, e o sobrenadante livre de células quantificado a sua absorbância a 600 nm; e
- c) Quantificação do sobrenadante livre de células a no espectro máximo de absorbância do corante utilizado ($\lambda_{\text{máx}}$).

A quantidade de biomassa produzida foi determinada subtraindo o valor de **b** do valor obtido em **a**. A relação entre a densidade ótica a 600 nm ($D.O_{600\text{nm}}$) e a concentração de biomassa é de $D.O_{600\text{nm}} 1,000 \approx 0,32 \text{ g l}^{-1}$ de peso seco celular.

A eficiência de decoloração foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Descoloração(\%)} = \frac{A_{\lambda, \text{inicial}} - A_{\lambda, \text{final}}}{A_{\lambda, \text{inicial}}} \times 100 \quad (19)$$

onde, $A_{\lambda, \text{inicial}}$ é a absorbância inicial e $A_{\lambda, \text{final}}$ é a absorbância final do sobrenadante livre de células.

8.3 Resultados e Discussão

8.3.1 Descoloração de Corantes em Cultivo Submerso

Baseado nas descobertas descritas previamente por Silveira *et al.* (2009a), foi realizada decoloração de efluentes contendo corantes em cultivo submerso. A figura 22 descreve o crescimento da *P. oleovorans* durante a decoloração de cinco corantes.

Foi observado que dos cinco corantes utilizados, apenas o B31 apresentou o comportamento semelhante à decoloração do corante B15 (figura 23). Os outros quatros corantes utilizados, B54, B86, R91 e Y87 apresentaram remoção da cor proporcional à produção de biomassa, indicando a possibilidade de esta dependência ser devida a adsorção do corante a biomassa.

Segundo Mou *et al.* (1991), a bioadsorção de moléculas de corante na superfície celular aparenta ser um processo rápido e geralmente se completa em questões de horas. Grupamentos aminas, carboxilas, tióis e fosfatos presentes na parede celular são responsáveis pela ligação com as moléculas (Bayramoglu *et al.*, 2006).

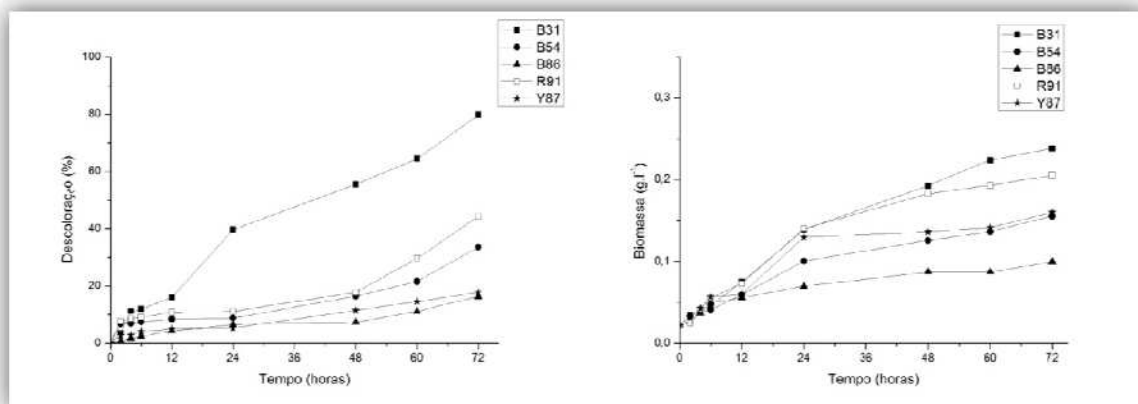


Figura 22 - Perfis de descoloração e produção biomassa de *Pseudomonas oleovorans*

A adsorção de uma substância de uma fase para a superfície de outra em um sistema leva a uma distribuição da substância definida termodinamicamente entre as fases em equilíbrio. Esta distribuição é descrita melhor pelas isotermas de Langmuir e Freundlich, onde claramente há uma dependência da produção de biomassa e remoção de cor (Kaushik e Malik, 2009).

A figura 23 descreve o crescimento microbiano, juntamente com a descoloração do corante B15 de acordo com o tempo, e a Figura 24 mostra a varredura de comprimento de onda realizada em diversos pontos da descoloração do corante citado.

De acordo com Pearce *et al.* (2008), a capacidade de redução de corantes consiste na capacidade da célula de reduzir as ligações azo ($-N=N-$) ou a forma cetoidrazona intermediária ($-N-NH-$). Os resultados apresentados sugerem que a *Pseudomonas oleovorans* não só é capaz de reduzir a ligação azo, como também é capaz de degradar os compostos aromáticos presentes no meio de descoloração.

A descoloração de corantes azos em condições anaeróbicas já foi descrita extensivamente (Carlieel *et al.*, 1996; Chinwetkitvanich *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008), entretanto, pouco é visto sobre a total biodegradação dos mesmos. A degradação dos compostos aromáticos oriundos da biodegradação de corantes é geralmente associada com a citotoxicidade e genotoxicidade destes (Ulson De Souza *et al.*, 2007; Vanhulle *et al.*, 2008).

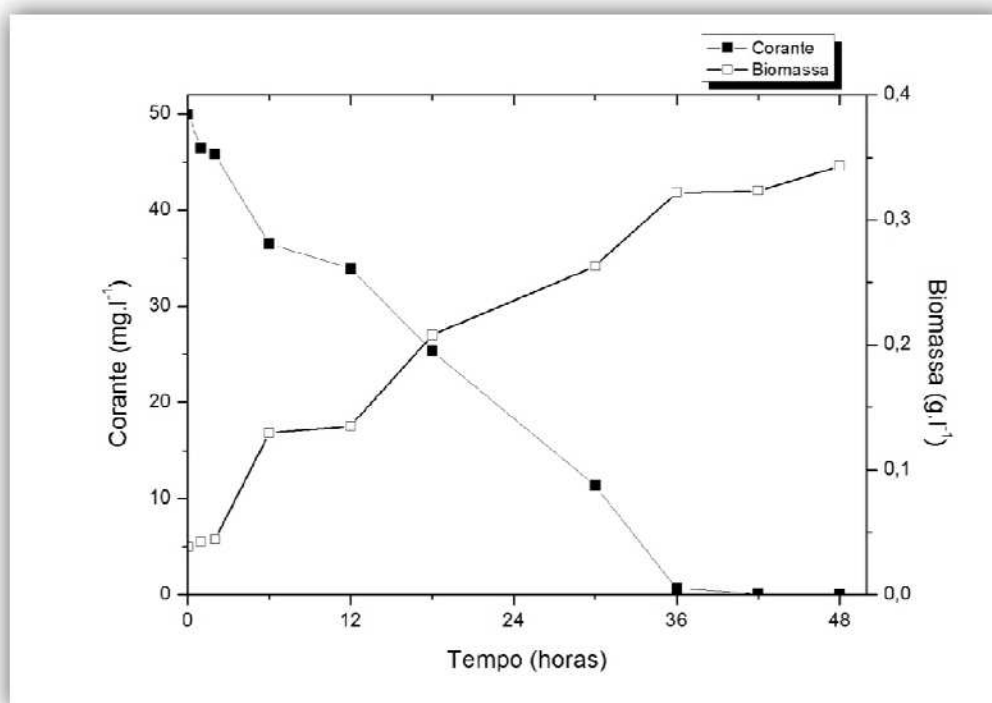


Figura 23 - Descoloração do corante B15 por *Pseudomonas oleovorans*

8.3.2 Descoloração de Corantes em *Fed-Batch*

A figura 25 mostra a descoloração do corante B15 em cultivo submerso alimentado, onde a alimentação foi realizada seis vezes, e ao final das 216 horas de cultivo, foi capaz de observar capacidade de descoloração pelo microrganismo.

Observa-se ainda que haja dois comportamentos distintos no padrão de descoloração pela *P. oleovorans*. O primeiro é compreendido pelo crescimento celular, onde há uma baixa taxa de descoloração (aproximadamente $1,39 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). Já o segundo comportamento é compreendido entre as alimentações do reator, onde a taxa de descoloração é mais elevada (aproximadamente $2,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Estes comportamentos distintos devem-se, provavelmente a fisiologia celular, onde em um primeiro momento, toda a maquinaria celular está sendo voltada para a o consumo de uma fonte de carbono alternativa e mais recalcitrante. Em um segundo momento, com toda a maquinaria celular pronta, é mais simples para as células consumirem o corante como fonte única de carbono.

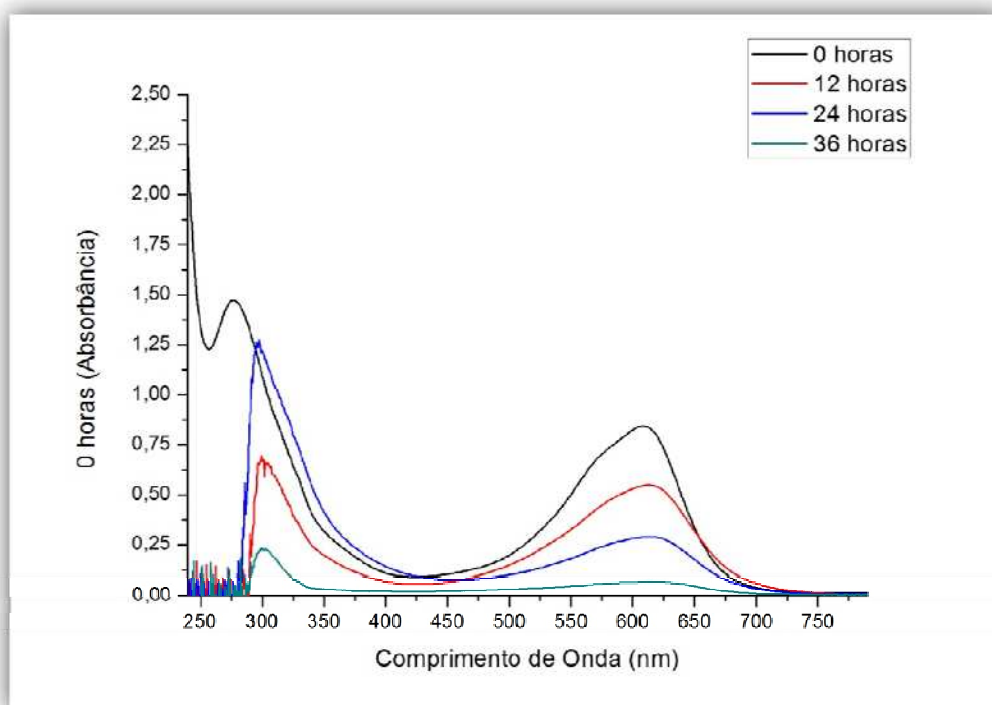


Figura 24 - Varredura de comprimento de onda do corante B15 após o processo de descoloração

Zhang *et al.* (1999) descreveram a utilização de um reator *Fed-Batch* de leito fluidizado contendo micélios de um basidiomiceto não identificado, onde o mesmo micélio foi reutilizado em nove ciclos de descolorização.

Por outro lado, Chang & Lin (2000) descreveram a descoloração de Vermelho Reativo 22 por uma cepa de *Pseudomonas luteola*, onde o corante foi alimentado no reator independente da eliminação total do corante no meio. Esta estratégia possibilitou uma maior taxa de descoloração pelas células de *P. luteola*, entretanto a descoloração de corantes sofre inibição pelo substrato, com isso, levando a descoloração incompleta no final do processo.

No entanto, a única vantagem apresentada pelos processos acima descritos foi o aumento da concentração de corante no meio, diferente da descoloração por *P. oleovorans*, onde ainda a um aumento significativo na taxa de remoção de cor, mesmo que menor que a taxa da *P. luteola*, é possível observar a total remoção de cor.

8.4 Conclusão

A descoloração do corante B15 é normalmente seguida de sua biodegradação, onde, além da redução de cor, há também a biodegradação dos compostos fenólicos oriundos da

descoloração de corantes. Conclui-se também que a descoloração do corante supracitado pode atingir uma descoloração total de $350 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ quando em cultivo por *fed-batch*.

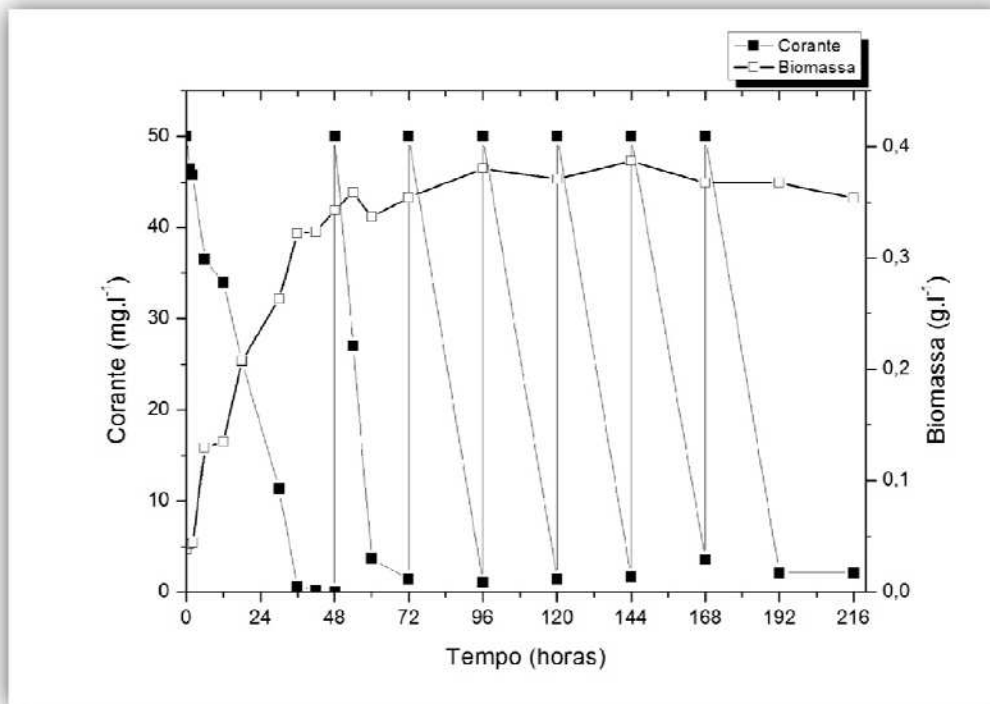


Figura 25 - Descoloração do corante B15 em Fed-Batch

8.5 Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a FAPESP pelo apoio financeiro, e a Clariant do Brasil pela cessão dos corantes utilizados.

8.6 Referências Bibliográficas

- Bayramoglu, G., Çelik, G. e Arica, M.Y. Biosorption of reactive blue 4 dye by native and treated fungus *Phanerocheate chrysosporium*: batch and continuous flow system studies. *Journal of Hazardous Materials*, v.137, n.3, p.1689-1697. 2006.
- Brand, J.C.D. e Eglinton, G. *Applications of spectroscopy to organic chemistry*. London: Oldbourne Press. 1965
- Carlieel, C.M., Barclay, S.J. e Buckley, C.A. Treatment of exhausted reactive dyebath effluent using anaerobic digestion: Laboratory and full-scale trials. *Water SA*, v.22, n.3, p.225-233. 1996.

- Chang, J.S. e Lin, Y.C. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol. Prog.*, v.16, n.6, p.979-985. 2000.
- Chinwetkitvanich, S., Tuntolvest, M. e 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.
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Xiang, X., Yu, H., Tian, C. e Song, Z. Correlation of anaerobic biodegradability and the electrochemical characteristic of azo dyes. *Biodegradation*, v.17, n.4, p.341-346. 2006.
- Kaushik, P. e Malik, A. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environment International*, v.35, n.1, p.127-141. 2009.
- Kim, S.-Y., An, J.-Y. e Kim, B.-W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. *Dyes and Pigments*, v.76, n.1, p.256-263. 2008.
- Mou, D.-G., Lim, K.K. e Shen, H.P. Microbial agents for decolorization of dye wastewater. *Biotechnology Advances*, v.9, n.4, p.613-622. 1991.
- Pearce, C.I., Guthrie, J.T. e Lloyd, J.R. Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143. *Dyes and Pigments*, v.76, n.3, p.696-705. 2008.
- Silveira, E., Marques, P.P., Santana, J.C.C., Lima-Filho, J.L., Mazzola, P.G., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Experimental design for decolourization of textile dye by *Pseudomonas oleovorans*. *Research and Reviews in Biosciences*, v.3, n.4, p.183-190. 2009a.
- Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.2, p.230-235. 2009b.
- Ulson De Souza, S.M.a.G., Forgiarini, E. e Ulson De Souza, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, v.147, n.3, p.1073-1078. 2007.
- Vanhulle, S., Trovaslet, M., Enaud, E., Lucas, M., Sonveaux, M., Decock, C., Onderwater, R., Schneider, Y.-J. e Corbisier, A.-M. Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, n.3, p.337-344. 2008.

Zhang, F.-M., Knapp, J.S. e Tapley, K.N. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, n.1-2, p.48-53. 1999.

? Manuscrito a ser Enviado ao Periódico

Journal of Hazardous Materials

*Este capítulo apresenta a degradação complete
de um corante azo industrial em efluente sintético por *Pseudomonas oleovorans* em
um reator anóxico contendo células imobilizadas em espumas de poliuretano.*

Decolourization of Industrial Azo Dye in an Anoxic Reactor by PUF Immobilized *Pseudomonas oleovorans*

Silveira, E.^{1,*}; Marques, P.P.¹; Macedo, A.C.¹; Mazzola, P.G.²; Porto, A.L.F.³; Tambourgi, E.B.¹

¹School of Chemical Engineering - State University of Campinas, Unicamp – P.O. Box 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brazil.

²Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Unicamp – P.O. Box 6111, 13083-970, Campinas-SP, Brazil.

³DMFA/Cenapesq – Federal Rural University of Pernambuco, UFRPE – Dois Irmãos, 52171-900, Recife-PE, Brazil.

* Tel: +551935213952 Fax: +551935213894 E-mail: silveiraedgar@gmail.com

Abstract

This work reports the full degradation of an azo dye in a synthetic effluent by *Pseudomonas oleovorans* immobilized in Poly Urethane Foam (PUF). For each fed-batch experiment, a screw-top vessel containing 160 ml of Nutrient Broth was inoculated with 0.16 g l⁻¹ of fresh culture, and incubated at 32°C and supplemented with 50 mg l⁻¹ of dye every 24 hours. Then, the *P. oleovorans* were immobilized in PUF and inoculated in an anoxic reactor. The results showed that at fed-batch conditions, the *P. oleovorans* was capable of remove 50 mg of dye in 192 hours. However, when the decolourization was performed in an anoxic reactor, it was capable of full degradation of 25 mg of dye in only 24 hours.

Keywords: PUF; Immobilization; Anoxic Reactor; Azo Dye; *Pseudomonas*

9.1 Introduction

There are over than 100,000 commercially available dyes with more than 7 x10⁷ tons of dyestuff produced annually worldwide (Robinson *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2005). In Brazil alone, 26,500 are produced per year (Ulson De Souza *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2009a). These dyes are widely used in a number of industries, such as textiles, food,

cosmetics and paper printing, with the textile industry the largest consumer of dyes (Pandey *et al.*, 2007).

Considerable attention has been given to issues associated with the presence of coloured compounds in aqueous wastewater generated from textile industries. Given that water is the only efficient carrier for the dyes and other compounds that are used in the dyeing and finishing processes. An average textile finishing company uses 100,000 – 150,000 liters of water per ton of textile material treated (Li e Guthrie, 2010).

Colour is the first contaminant to be recognised in wastewater, however in addition to the aesthetic problem, the dyes obstruct light penetration and oxygen transfer in bodies of water. Without an adequate treatment, dyes are stable and can remain in the environment for an extended period of time (Silveira *et al.*, 2009b).

Currently, the most popular methods of colour removal from wastewaters involve physical and chemical process that can be costly and usually involve the formation of a concentrated sludge that creates a secondary, highly significant disposal problem (Chang e Kuo, 2000). Though integrated chemical methods seem to be feasible for the treatment of such wastewater, biological methods should be used preferably considering cost and technical advantages (Yu *et al.*, 2010).

Environmental biotechnology is constantly expanding efforts in the biological treatment of dye-contaminated wastewaters. Although numerous microorganisms are capable of decolourizing dyes, only a few are able to mineralise these compounds into CO₂ and H₂O (Junghanns *et al.*, 2008). Under aerobic conditions, azo dyes are not easily metabolized by bacteria (Robinson *et al.*, 2001). However, under anaerobic conditions, several bacterial strains, including *Pseudomonas oleovorans*, can enzymatically reduce the azo bonds in the dye molecule to produce colourless by-products (Silveira *et al.*, 2009b).

Several research papers have reported the results of combined anaerobic-aerobic bioreactor treatment of azo dye-containing wastewaters (O'niell *et al.*, 1999; Sponza e Isik, 2002; Kapdan *et al.*, 2003; Khehra *et al.*, 2006; Isik e Sponza, 2008). Even though, the colour removal is mainly associated with the anaerobic stage, whereas further decolourization in the aerobic stage is usually limited to a few extra percents (Van Der Zee e Villaverde, 2005). According to Minke and Rott (2002), a two-stage anaerobic-aerobic colour removal process

was 70% higher than that of a one-stage aerobic treatment process. So, it is reasonable to assume that anaerobic colour removal is mainly due to azo dye reduction.

This work reports the decolourization of an industrial azo dye by PUF immobilized *Pseudomonas oleovorans* under an anoxic reactor.

9.2 Materials and Methods

9.2.1 Microorganism

The microorganism was obtained from the Brazilian Collection of Industrial and Environmental Microorganism (CBMAI) of the University of Campinas, previously identified as *Pseudomonas oleovorans* (CBMAI 703).

The microorganism was preserved in cryotubes containing glass beads and 50% glycerol (v/v). Each cryotube was loaded from the same initial culture and had an average of 30 beads. Thus, it was possible to use the same cell generation for all experiments (Silveira *et al.*, 2009b).

9.2.2 Dyes and Reagents

Textile dye was obtained with the kind permission of Clariant of Brazil (Sao Paulo, Brazil). As the dye is for commercial use, the commercial name has been omitted in this study, receiving the following codename: B15 (C.I. 13390). The dyes were filter-sterilised on a 0.2 µm filter (Millipore, USA) prior to addition to sterile culture medium. All other reagents were of analytical grade.

9.2.3 Pre-Culture Conditions

For each experiment, an Erlenmeyer flask containing 20 ml of Nutrient Broth (meat extract 3 g l⁻¹ and peptone 5 g l⁻¹) was inoculated with a single glass bead from the same cryotube and incubated at 28 °C for 24 h when an early stationary or a final exponential phase was reached.

9.2.4 Dye Decolourizing Cultures

Decolourization was performed in static conditions in 500 ml screw-topped bottles, containing 125 ml of Nutrient Broth (adjusted pH = 8.5) supplemented with 50 mg l⁻¹ of dye, and inoculated with 10 ml of fresh 24-hours-old cultures (approx. 0.16 g l⁻¹ of dry weight of cells). The bottles were incubated under static anoxic conditions away from light at 32 °C for

36 hours. Control experiments were performed using the same medium without microorganisms or dyes (Silveira *et al.*, 2009a).

9.2.5 Dye Decolourization in Fed-Batch Cultures

After the decolourization, the cultures were fed with a dye concentrated solution, aiming to regain the initial dye concentration. The feed was performed every time the dye concentration reached values below 3.6 mg l⁻¹.

9.2.6 Determination of Cell Growth and Decolourization

The sample from the decolourization cultures were collected and analysed following the methodology described previously (Silveira *et al.*, 2009b). As all samples contained biomass and dye, biomass concentration (first and second step) and dye (third step) were evaluated as follows:

- 1) OD_{600nm} of sample mixtures without centrifugation: $OD_{600nm}^{X+dye} = OD_{600nm}^{dye} + OD_{600nm}^X$;
- 2) OD_{600nm} of sample supernatant (sup) after centrifugation for 10 minutes at 10,000 g:
 $OD_{600nm}^{sup} = OD_{600nm}^{dye}$; and,
- 3) OD_{609nm} of sample supernatant after centrifugation: $OD_{609nm}^{sup} = OD_{609nm}^{dye}$.

The biomass produced was determined by subtracting the value obtained on the first step from the value obtained on the second. Colour removal efficiency was determined by the following equation:

$$Decolourization = \frac{A_{\lambda initial} - A_{\lambda final}}{A_{\lambda initial}} \quad (20)$$

in which $A_{\lambda initial}$ represented the absorbance before the decolourization process and $A_{\lambda final}$ the value obtained during the third step. Each decolourization value was a mean of three parallel experiments.

Decolourization was also determined by wavescan, which was performed in an Ultrospec 3000 (GE Healthcare, USA). Samples were scanned from 240 to 790 nm to measure the colour removal and aromatic compounds degradation by *Pseudomonas oleovorans*, culture medium without industrial dye was used as blank.

9.2.7 Cell Immobilization in PUF

Pseudomonas oleovorans' cells from an early stationary or a final exponential phase were centrifuged at 10,000 g for 10 minutes and then immobilized in polyurethane foam (PUF). The PUF was cut in 1 cm³ cubes, washed in distilled water and autoclaved twice and dried in oven at 37 °C. About 9×10^9 cells in culture medium were added to screw-topped bottles containing the PUF cubes.

The content of the bottles was mixed in a magnetic stirrer for two hours. The bottles were incubated in an orbital shaker for one hour at 140 RPM and then incubated under static conditions for another two hours. At last, the dye was add to the culture medium and then incubated at the conditions described elsewhere (Silveira *et al.*, 2009a).

9.2.8 Anaerobic Plug Flow Reactor

A jacketed glass column with an effective volume of 140 ml, with an internal diameter of 3 cm and a height of 20 cm was used as the reactor (figure 26). The column was autoclaved and dried at 37 °C before each run.

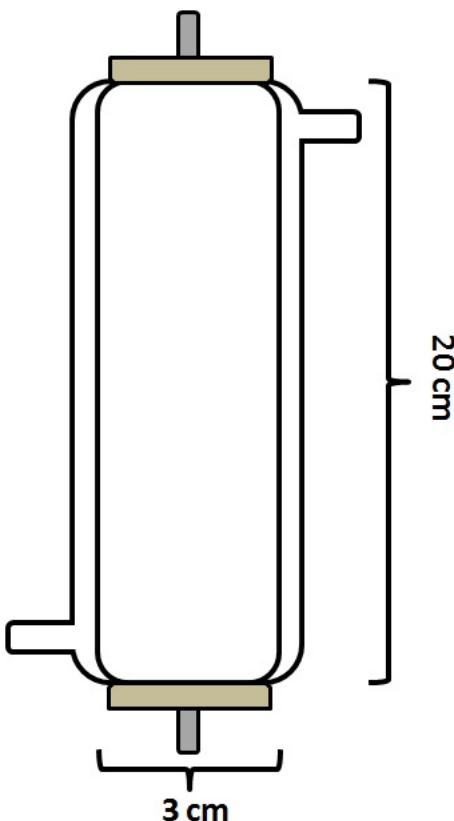


Figure 26 - The schematic of the column used for industrial dye decolourization

Rubber corks were perforated for silicon tubing passage used for the column's inlet and outlet. Temperature was controlled using a water bath with water cycling, where the water flow was performed in counter-current according to the effluent flow. The column was packed with a PUF cylinder with a main diameter of 3 cm and 19 cm height.

9.2.9 Reactor Operation

The experiments were conducted after the immobilization of *Pseudomonas oleovorans* on PUF. The immobilization within the column was performed after inoculation 20 ml of fresh culture (approx. 9×10^9 cells) diluted in 100 ml of Nutrient Broth at 200 cm/h and sealed overnight at 32°C.

The reactor was fed with synthetic effluent at a linear velocity of 15 cm/h, and at this rate, no cell wash-out was observed. At given linear velocity, the hydraulic residence time (HRT) was approximately 2 hours. The reactor outlet was connected with the feed vessel to provide the dilution of the feed along the process time. The feed was stocked in a 1 litre bottle.

9.2.10 Synthetic Effluent

The composition of the synthetic effluent was B15 industrial dye 25 mg l⁻¹; soluble starch 1000 mg l⁻¹; acetic acid 150 mg l⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 280 mg l⁻¹; NH₄Cl 230 mg l⁻¹; KH₂PO₄ 67 mg l⁻¹; MgSO₄ • 7H₂O 40 mg l⁻¹; CaCl₂ • 2H₂O 22 mg l⁻¹; FeCl₃ • 6H₂O 5 mg l⁻¹; yeast extract 200 mg l⁻¹; NaCl 150 mg l⁻¹; NaHCO₃ 1000 mg l⁻¹; and 1 ml l⁻¹ of trace elements solution (ZnSO₄ • 7H₂O 10 mg l⁻¹; MnCl₂ • 4H₂O 100 mg l⁻¹; CuSO₄ • 5H₂O 392 mg l⁻¹; CoCl₂ • 6H₂O 248 mg l⁻¹; NaB₄O₇ • 10H₂O 177 mg l⁻¹; and NiCl • 6H₂O 20 mg l⁻¹).

9.2.11 Scanning Electronic Microscopy

Samples of PUF before and after *Pseudomonas oleovorans* immobilization were fixed in 2% glutaraldehyde (v/v) and 4% formaldehyde (v/v) at room temperature. The samples were then post-fixed with 1% osmium tetroxide plus 0.8% potassium ferrocyanide and 1% tannic acid, dehydrated in graded ethanol, critical point-dried in CO₂. The samples were then dehydrated in an ethanol series, transferred to propylene oxide, air-dried, mounted on aluminium stubs with double-sided tape (ScotchTM), coated with gold in sputter system in a high vacuum chamber and examined in a Jeol JSM 5600LV at an acceleration voltage of 8 kV and a working distance of 8 mm.

9.3 Results

9.3.1 Time-dependent and Fed-Batch Cultures

The fed-batch decolourization was carried out for 216 hours, and the result is shown in figure 27, which describes the decolourization of B15 dye in Fed-Batch. It was also observed that the biomass reached equilibrium after 42 hours. After 192 hours *Pseudomonas oleovorans* was able to decolourize up to 50 mg of dye, in this time bacterial fatigue was not observed.

It was also observed a total decolourization of B15 dye, performed in only 36 hours in the first run, and substantial cell growth occurred along this first run. However, the cells did not seem to absorb the dye, since the centrifuged biomass showed no characteristics of absorption, remaining creamy white within the process.

It was also observed that there were two distinct behaviours patterns onto the decolourization fed-batch process by *P. oleovorans*. The first one was related to the cell growth, where there was a low decolourization rate (approx. $1.39 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The second one was presented along with the reactor feeding, where the decolourization rate was raised (approx. $2.08 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

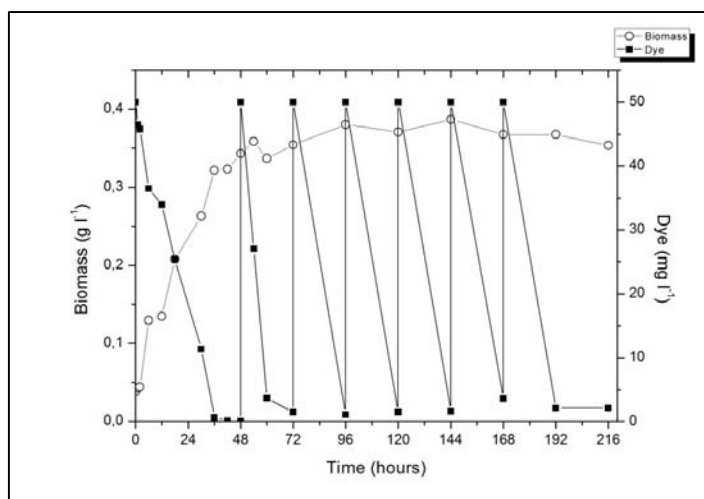


Figure 27 - Decolourization of B15 dye in Fed-Batch

9.3.2 Immobilization of *Pseudomonas oleovorans* in PUF

Pseudomonas oleovorans was firstly immobilized in PUF cubes of 1 cm^3 , and after the immobilization process, the bacterial decolourization capacity was measured. Figure 28

shows the decolourization patter of non-immobilized cells and immobilized cells with re-cycles.

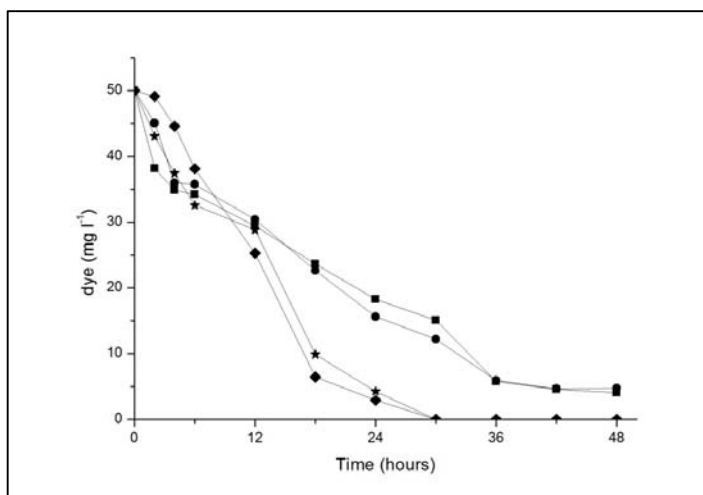


Figure 28 - Decolourization of B15 dye by: ■ – Non-Immobilized cells; and Immobilized cells ● – 1st run; • - 2nd run; and □ - 3rd run.

Along with the decolourization process, and also during the beginning of each decolourization cycle, was possible to observe some colour adsorption by the foam. Although at the end of each run the support regained its original colour. It was also observed that after the first run, the decolourization process time was reduced by 6 hours on the following runs.

Figure 29 shows the scanning electronic microscopy (SEM) of polyurethane foam (PUF) containing *Pseudomonas oleovorans* cells. PUF was chosen as support due to its high porosity, inert nature, easy access and low cost. The PUF polyhedral structure can be observed in figure 29a and 29b, which provide a considerable large surface area to *Pseudomonas oleovorans* biofilm development (figure 29e).

9.3.3 Reactor Decolourization Process

The column packing with PUF cubes gave a non-ideal behaviour, in which was observed formation of channelling and stagnant zones within the reactor. Based on that, the reactor was packed with a PUF cylinder, which could fill all inner space of the reactor, thus giving ideal reactor behaviour. The figure 30 shows the reactor before and after the decolourization process, and figure 31 shows the decolourization pattern along the process time.

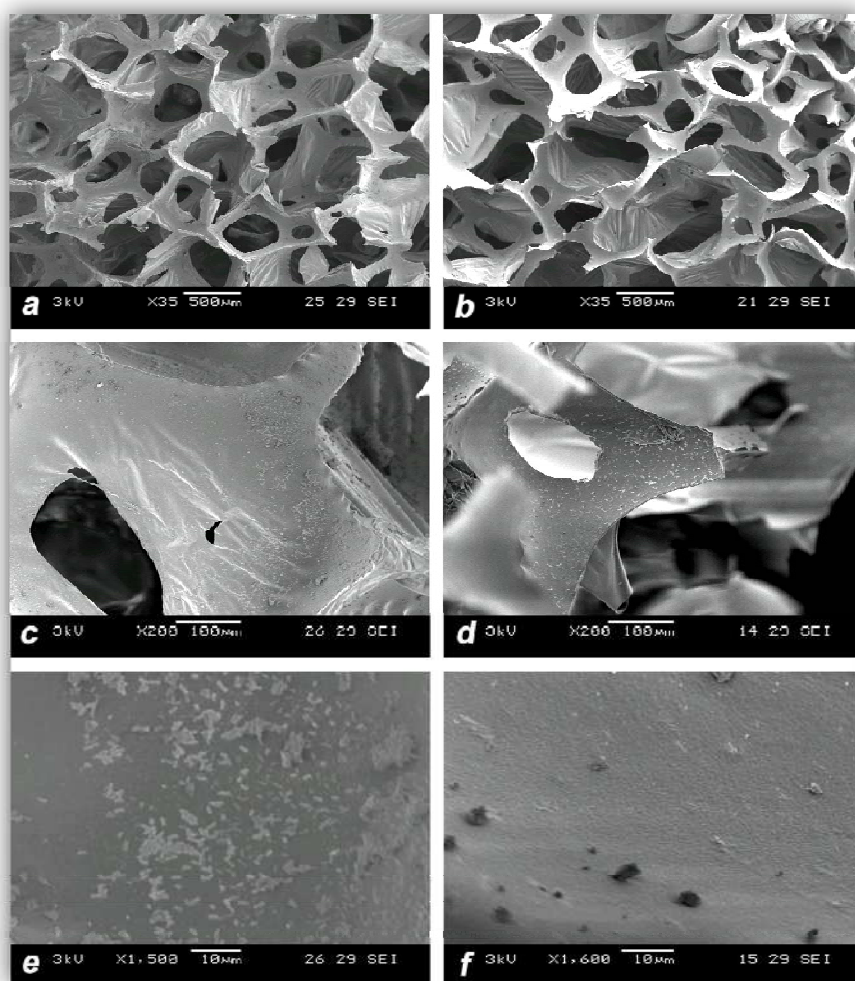


Figure 29 - Scanning Electronic Microscopy of immobilized cells in Polyurethane Foam (PUF). a – PUF cross section after immobilization; b – PUF cross section before immobilization; c – PUF surface after immobilization; d – PUF surface before immobilization; e – PUF cross section surface containing immobilized with *P. oleovorans*; f – PUF cross section surface before immobilization with *P. oleovorans*.

It was observed that besides it used a lower concentration than the ones used on batch and fed-batch reactors, 25 mg l⁻¹ in the anoxic reactor and 50 mg l⁻¹, the reactor was able to decolourize a higher mass of dye per cycle. In view of the fact that the reactor could process 1 litter of effluent, and also the process time was reduced 6-fold.

Figure 32 shows the wavescan in several times along the decolourization of the effluent treated by the anoxic reactor packed with *P. oleovorans* immobilized in PUF. It was observed that apart from the colour reduction, noticed in the wavelength between 400 and 790 nm, there was a drastic reduction in the 200 and 350 nm range.

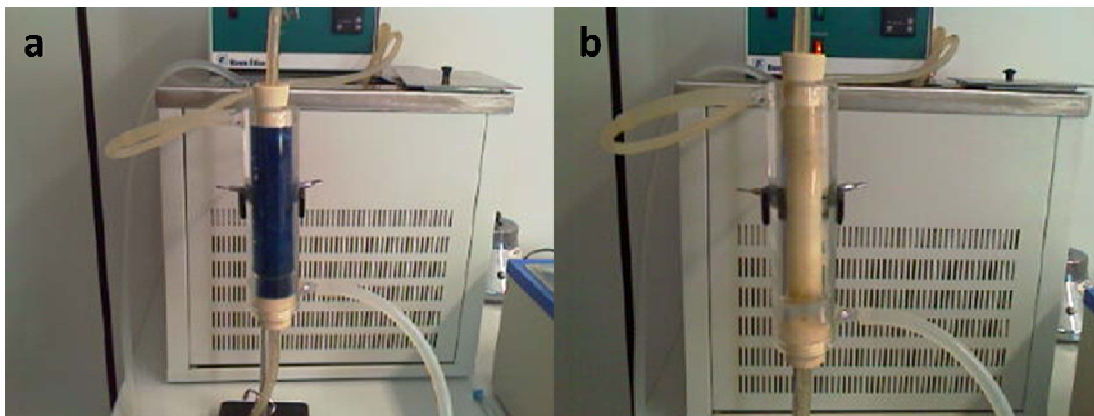


Figure 30 - Anoxic reactor packed with PUF cylinder. a – before; and b – after the decolourization

9.4 Discussion

Azo dyes decolourization under anaerobic conditions has been described extensively (Carlieel *et al.*, 1996; Chinwetkitvanich *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008); however, little is described about total dye degradation. The behaviour present with the fed-batch decolourization suggests that the cells were adapting during the first cycle, in which the cell machinery was adapting to consume an alternative and more recalcitrant carbon source. At the second cycle and on, where all the cell machinery already ready for the process, it was simpler to the cell to consume the dye as sole carbon source.

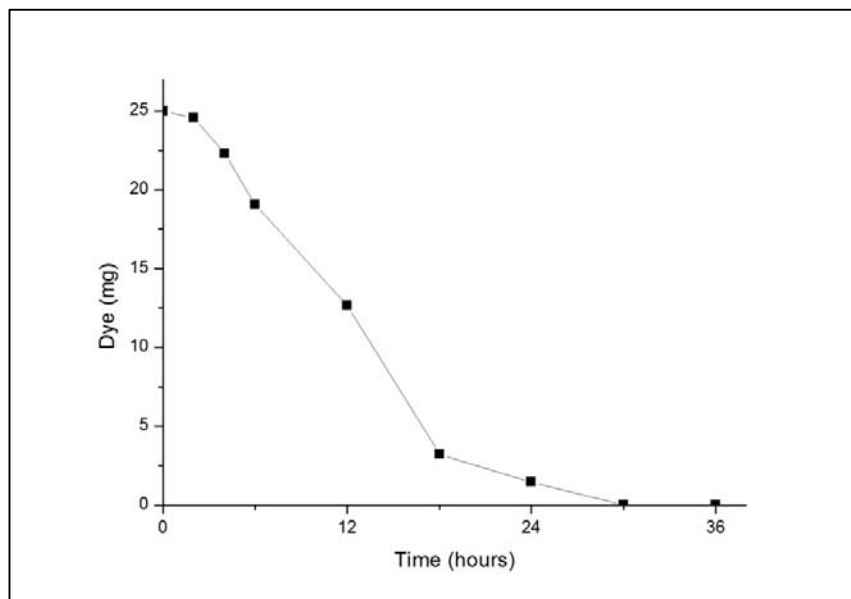


Figura 31 - B15 Dye Degradation Pattern by *Pseudomonas oleovorans* immobilized in PUF in an anoxic reactor

Zhang *et al.* (1999) described the use of a fed-batch reactor in a fluidized bed containing white-rot fungus where the fungus was reused during nine cycles of decolourization. Besides, Chang & Lin (2000) described the decolourization of Reactive Red 22 by a *Pseudomonas luteola* strain in fed-batch, in which the dye was fed in the reactor without the total elimination of the initial dye.

This strategy resulted in a higher decolourization rate by *P. luteola*, however, the dye decolourization should undergo with substrate inhibition, leading to an incomplete decolourization at the final process. Nevertheless, the only advantage presented by the processes described previously were the increase dye concentration on the effluent. The decolourization performed by *P. oleovorans* has a significant increase of colour removal rate, and it was possible to achieve total colour removal.

Several researches describes the immobilization of microorganisms in Poly-Urethane Foam (PUF), but it is mainly faced the immobilization of bacterial consortium (Khehra *et al.*, 2006), semi-solid fungal fermentation (Susla *et al.*, 2007), and fungi in submersed cultures (Casieri *et al.*, 2008). Khehra *et al.* (2006) described an anoxic-aerobic sequential bioreactor using a bacterial consortium immobilized in PUF where it was capable of reach complete decolourization of an synthetic effluent containing 100 mg l⁻¹ of Acid Red 88 dye.

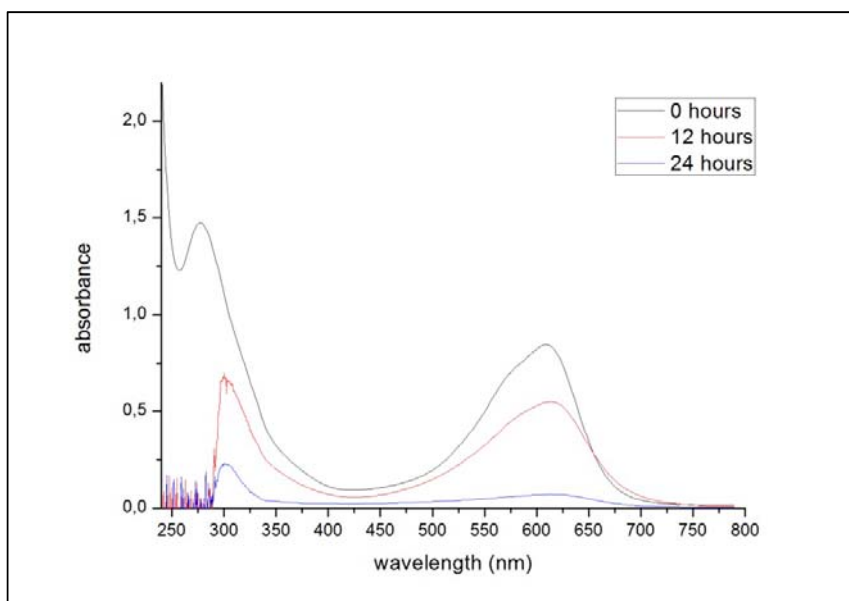


Figura 32 - Synthetic effluent wavescan along the decolourization process in the anoxic reactor

Decolourization of much more mass of dye diluted in medium by *P. oleovorans* is possible since by increasing the period of process time, further decolourization should be achieved (Silveira *et al.*, 2009a). Furthermore, the microscopy results diverge from the ones described by Kim *et al.* (2003) and by Khehra *et al.* (2006) on the biofilm formation, probably due to the previously treatment prior to the microscopy.

According to Sharma *et al.* (2004), a Plug Flow Reactor is capable of decolourize synthetic effluent contaminated with dyes with a hydraulic retention time (HRT) of 23 hours. Although, the results obtained showed that with a decreased HRT, approx. 2 hours, it was possible to decolourize dyes since the reactor are connected with recycle.

The recycle, in other words, the outlet flow return to the feed inlet should be done by two reasons: (a) to preserve the media while it was not totally converted to the desired product; and/or (b) to increase the process yield (Missen *et al.*, 1999). With the recycle, it was possible to reach a decolourization higher than 95% without the need of a sequential reactor.

Khehra *et al.* (2006) described the use of an anoxic-aerobic sequential bioreactor, which reached Acid Red 88 full decolourization. However, it was used a four bacterial consortium (*Bacillus cerus*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescence* and *Stenotrophomonas acidaminiphila*) at the process, as well as the need to a second reactor to reach full dye degradation and its by-products.

The colour removal in several sequential reactors is associated basically with by the anaerobic stage, where the further decolourization in the aerobic stage is normally limited to a few percents (Van Der Zee e Villaverde, 2005). Minke and Rott (2002) described that two stage decolourization (anaerobic and aerobic) was 70% higher than a single aerobic stage. The results showed that a second aerobic stage is not necessary, since *P. oleovorans* was capable of decolourize the synthetic effluent in only one stage.

According to Peace *et al.* (2008), the dye reduction capacity consist basically at the cellular ability to reduce azo bonds ($-N=N-$) or its intermediary ketohidrazone ($-N-NH-$). The results presented suggests that *P. oleovorans* is not only capable of reduce azo bonds, but is also capable of degrade aromatic compounds presented at the effluent.

According to Brand and Eglinton (1965), the strong absorbance at 200-300 nm of a solution is consistent for aromatic amines. The formation of aromatic amines resulting from decolourization is a commom problem originated from biological treatment of dyes (Ulson De

Souza *et al.*, 2007). Pearce *et al.* (2008) described the decolourization of pigments by *Shewanella* strain J18 143, in which there was a reduction of its $\lambda_{\max}$ and an increase in the UV spectrum, suggesting the formation of high quantity of aromatic amines.

Ulson de Souza *et al.* (2007) suggested that biological treatment should be considered as a pre-treatment, requiring a post-treatment for the removal of organic compounds (i.e. aromatic amines) remaining in the effluent. This should not be a concern with *P. oleovorans* degradation of industrial dyes, as an almost complete removal of UV spectrum was observed.

9.5 Conclusion

The ever increasing legislation restrictions regarding effluent disposal, combined with their toxicity, carcinogenicity and mutagenicity, makes dye contamination both an environmental problem as well as a public health problem. The immobilization of *Pseudomonas oleovorans* along with its use in fed-batch reactors as well as in an anoxic reactor is a promising green technology to the decolourization of dye contaminated effluents, since it was possible to achieve full degradation of industrial dye in a short period of time. Further work should be performed aiming the scale up of this process.

9.6 Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Fapesp for financial support; and Clariant of Brazil for the dyes provided.

9.7 References

- Akhtar, S., Khan, A.A. e Husain, Q. Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent. *Chemosphere*, v.60, n.3, p.291-301. 2005.
- Brand, J.C.D. e Eglinton, G. *Applications of spectroscopy to organic chemistry*. London: Oldbourne Press. 1965
- Carlieel, C.M., Barclay, S.J. e Buckley, C.A. Treatment of exhausted reactive dyebath effluent using anaerobic digestion: Laboratory and full-scale trials. *Water SA*, v.22, n.3, p.225-233. 1996.

- Casieri, L., Varese, G., Anastasi, A., Prigione, V., Svobodová, K., Filippello Marchisio, V. e Novotný, Č. Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes by immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*. *Folia Microbiologica*, v.53, n.1, p.44-52. 2008.
- Chang, J.-S. e Kuo, T.-S. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresource Technology*, v.75, p.107-111. 2000
- Chang, J.S. e Lin, Y.C. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnol. Prog.*, v.16, n.6, p.979-985. 2000.
- Chinwetkitvanich, S., Tuntolvest, M. e 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.
- Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Xiang, X., Yu, H., Tian, C. e Song, Z. Correlation of anaerobic biodegradability and the electrochemical characteristic of azo dyes. *Biodegradation*, v.17, n.4, p.341-346. 2006.
- Isik, M. e Sponza, D.T. Anaerobic/aerobic treatment of a simulated textile wastewater. *Separation and Purification Technology*, v.60, n.1, p.64-72. 2008.
- Junghanns, C., Krauss, G. e Schlosser, D. Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. *Bioresource Technology*, v.99, n.5, p.1225-1235. 2008.
- Kapdan, I.K., Tekol, M. e Sengul, F. Decolorization of simulated textile wastewater in an aerobic-aerobic sequential treatment system. *Process Biochemistry*, v.38, p.1031-1037. 2003.
- Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. e Chimni, S.S. Biodegradation of azo dye C.I. Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor. *Dyes and Pigments*, v.70, n.1, p.1-7. 2006.
- Kim, S.-Y., An, J.-Y. e Kim, B.-W. The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process. *Dyes and Pigments*, v.76, n.1, p.256-263. 2008.

- Kim, S., Park, C., Kim, T.-H., Lee, J. e Kim, S.-W. COD reduction and decolorization of textile effluent using a combined process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.95, n.1, p.102-105. 2003.
- Li, T. e Guthrie, J.T. Colour removal from aqueous solutions of metal-complex azo dyes using bacterial cells of *Shewanella* strain J18 143. *Bioresource Technology*, v.101, n.12, p.4291-4295. 2010.
- Minke, R. e Rott, U. Untersuchungen zur innerbetrieblichen anaeroben Vorbehandlung stark farbiger Abwasser der Textilveredelungsindustrie. *Wasser Abwasser*, v.143, n.4, p.320-328. 2002.
- Missen, R.W., Mims, C.A. e Saville, B.A. *Introduction to Chemical Reaction Engineering and Kinetics*. New York: John Wiley & Sons. 1999.
- O'niell, C., Hawkes, F.R., Esteves, S., Hawkes, D.L. e Wilcox, S. Anaerobic and aerobic treatment of a simulated textile effluent. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v.74, n.10, p.993-999. 1999.
- Pandey, A., Singh, P. e Iyengar, L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.59, n.2, p.73-84. 2007.
- Pearce, C.I., Guthrie, J.T. e Lloyd, J.R. Reduction of pigment dispersions by *Shewanella* strain J18 143. *Dyes and Pigments*, v.76, n.3, p.696-705. 2008.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. e Nigam, P. 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.
- Sharma, D.K., Saini, H.S., Singh, M., Chimni, S.S. e Chadha, B.S. Biological treatment of textile dye Acid violet-17 by bacterial consortium in an up-flow immobilized cell bioreactor. *Letters in Applied Microbiology*, v.38, n.5, p.345-350. 2004.
- Silveira, E., Marques, P.P., Santana, J.C.C., Lima-Filho, J.L., Mazzola, P.G., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Experimental design for decolourization of textile dye by *Pseudomonas oleovorans*. *Research and Reviews in Biosciences*, v.3, n.4, p.183-190. 2009a.
- Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.2, p.230-235. 2009b.

- Sponza, D.T. e Isik, M. Decolorization and azo dye degradation by anaerobic/aerobic sequential process. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p.102-110. 2002.
- Susla, M., Novotny, C. e Svobodova, K. The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresource Technology*, v.98, n.11, p.2109-2115. 2007.
- Ulson De Souza, S.M.a.G., Forgiarini, E. e Ulson De Souza, A.A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *Journal of Hazardous Materials*, v.147, n.3, p.1073-1078. 2007.
- Van Der Zee, F.P. e Villaverde, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - A short review of bioreactor studies. *Water Research*, v.39, p.1425-1440. 2005.
- Yu, F.-B., Ali, S.W., Guan, L.-B., Li, S.-P. e Zhou, S. Bioaugmentation of a sequencing batch reactor with *Pseudomonas putida* ONBA-17, and its impact on reactor bacterial communities. *Journal of Hazardous Materials*, v.176, n.1-3, p.20-26. 2010.
- Zhang, F.-M., Knapp, J.S. e Tapley, K.N. Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, n.1-2, p.48-53. 1999.

10 Conclusões

Este capítulo traz as conclusões deste trabalho.

*Traz, portanto as conclusões para a degradação de corantes têxteis utilizando *P. oleovorans* como ferramenta.*

10 Conclusões

- Faz-se necessária a seleção de microrganismos para avaliar mais rapidamente quais as espécies capazes de metabolizar corantes sintéticos;
- Dentre as espécies testadas, a *Pseudomonas oleovorans* foi selecionada por ser a mais versátil na descoloração de corantes têxteis;
- As condições para a descoloração de corantes em cultivo submerso em cultura estática são: volume da cultura de 25%, 0,16 g l⁻¹ de concentração celular inicial, temperatura de 32°C e pH inicial de 8,5;
- A forma de remoção de cor pela *Pseudomonas oleovorans* é dependente da formula molecular dos corantes, podendo estes ser metabolizados ou mineralizados;
- A *Pseudomonas oleovorans* além de metabolizar os grupos cromóforos dos corantes, ainda é capaz de degradar os compostos fenólicos resultantes da descoloração;
- A *Pseudomonas oleovorans* é capaz de metabolizar uma quantidade de corante superior a 350 mg l⁻¹ em cultivo em *Fed-Batch*;
- A *Pseudomonas oleovorans* pode ser imobilizada tanto em gel de alginato, quanto em espumas de poliuretano, onde a descoloração total do corante testado é atingida em apenas 30 horas;
- A enzima responsável pela descoloração dos corantes é provavelmente uma azorredutase, a qual apresenta tamanho aproximado de 38 kDa;
- O reator *Plug Flow* foi capaz de processar 25 mg de corante em apenas 24 horas; e
- A redução do tempo total de processo, tendo em vista a massa de corante degradada, foi de seis vezes em relação ao cultivo em *fed-batch*.

11 Sugestões para Trabalhos Futuros

Este capítulo são apresentadas as sugestões para futuros trabalhos, fomentados a partir dos resultados oriundos deste trabalho.

11 Sugestões para Trabalhos Futuros

- Avaliação e identificação dos metabólitos produzidos durante a descoloração;
- Utilização de efluente têxtil industrial com aplicação em reator *Plug Flow*;
- Aumento de escala do reator;
- Estudos de cinética do reator; e
- Integração do reator com outro processo de descoloração, como irradiação com UV.

Anexos

O anexo deste trabalho traz a produção bibliográfica gerada durante este trabalho, bem como alguns dados importantes e relevantes a execução do mesmo.

A1 Produção Bibliográfica

A1.1 Artigos Publicados

- Silveira, E., Marques, P.P., Silva, S.S., Lima-Filho, J.L., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Selection of *Pseudomonas* for industrial textile dyes decolourization. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.63, n.2, p.230-235. 2009.
- Silveira, E., Marques, P.P., Santana, J.C.C., Lima-Filho, J.L., Mazzola, P.G., Porto, A.L.F. e Tambourgi, E.B. Experimental design for decolourization of textile dye by *Pseudomonas oleovorans*. *Research and Reviews in Biosciences*, v.3, n.4, p.183-190. 2009.
- Oliveira, P.A.; Rosa, J.M.; Silveira, E.; Levy, S.M.; Souza, R.R.; Tambourgi, E.B.; Santana, J.C.C. Aplicação de planejamento fatorial no estudo da biodegradação do Reactive Black 5. *Química Têxtil*, v. 97, p. 50-57, 2009.

A1.2 Trabalhos Apresentados em Congresso

- Silveira, E.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Tambourgi, E.B. *Pseudomonas* selection for decolourization of azo dyes contaminated textile effluent. In: *BioMicroWorld - International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, 2007, Sevilla. II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2007.
- Silveira, E.; Marques, P.P.; Lima-Filho, J.L.; Tambourgi, E.B.; Porto, A.L.F. Disperse Blue 165 contaminated textile effluent decolourization by biosorption in *Pseudomonas*. In: XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2008, Recife. Cobeq 2008, 2008.
- Silveira, E.; Marques, P.P.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Tambourgi, E.B. Seleção de *Pseudomonas* para descoloração de corantes têxteis. In: *I Workshop Internacional de Biotecnologia*, 2008, Recife. I Workshop Internacional de Biotecnologia, 2008.
- Silveira, E.; Marques, P.P.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Tambourgi, E.B. Optimization of industrial textile dye colour removal by *Pseudomonas oleovorans*. In: *10th International Chemical and Biological Engineering Conference*, 2008, Braga. Chempor 2008: Book of Abstracts, 2008.
- Silveira, E.; Marques, P.P.; Santana, J.C.C.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Tambourgi, E.B. Experimental design for decolourization of textile dye by *Pseudomonas oleovorans*. In:

International Conference on Biopartitioning and Purification, 2009, Uxbridge. 15th International Conference on Biopartitioning and Purification, 2009.

Silveira, E.; Marques, P.P.; Silva, S.S.; Santana, J.C.C.; Lima-Filho, J.L.; Tambourgi, E.B.; Porto, A.L.F. Improvement on decolourization of industrial dye by *Pseudomonas oleovorans* immobilized on Polyurethane Foam. In: *International Conference on Biopartitioning and Purification*, 2009, Uxbridge. 15th International Conference on Biopartitioning and Purification, 2009.

Oliveira, P.A.; Silveira, E.; Levy, S.M.; Souza, R.R.; Tambourgi, E.B.; Santana, J.C.C. Estudo de fatores que influenciam na biodegradação de corantes utilizados pela indústria têxtil. In: *Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2009, Natal. XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

A2 Proteômica

A análise proteômica foi realizada com o intuito de avaliar as alterações fenotípicas das células de *Pseudomonas oleovorans* frente à descoloração dos corantes têxteis. A figura 33 mostra o perfil da eletroforese bidimensional da *Pseudomonas oleovorans* após descoloração do corante B15.

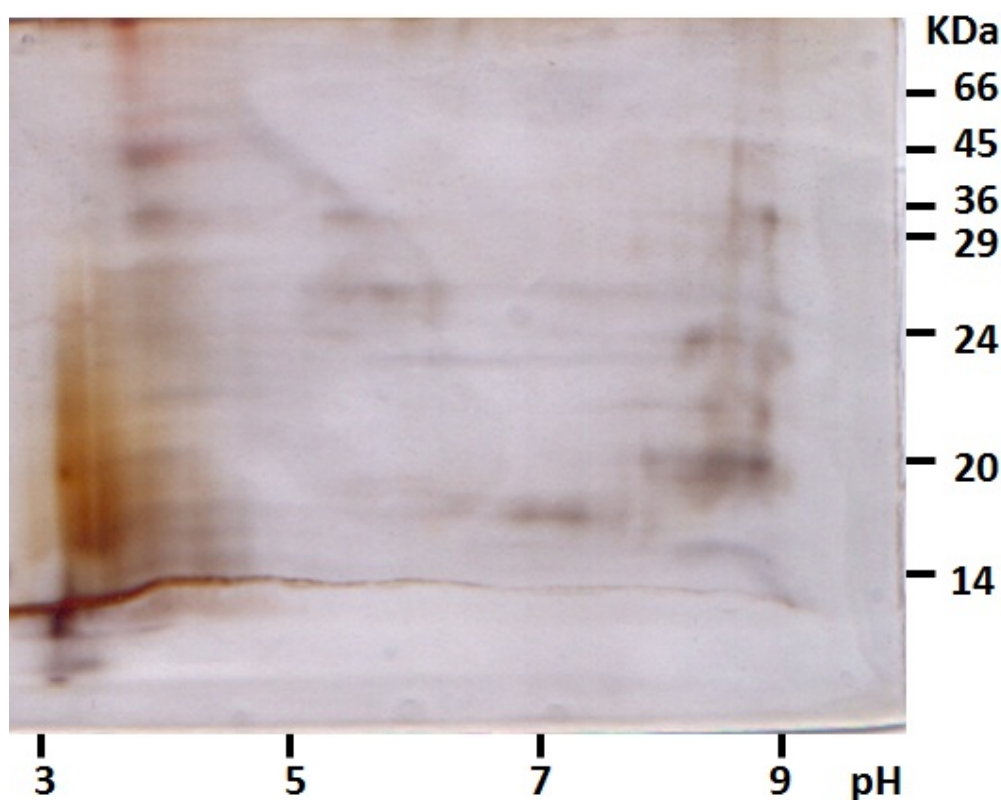


Figura 33 - Perfil de eletroforese bidimensional da *Pseudomonas oleovorans* após descoloração do corante B15. O gel foi obtido utilizando-se um pool de 125 µg de proteína total de células de *P. oleovorans* separadas por eletroforese bidimensional de 12,5% de poliacrilamida corado com nitrato de prata.

Observou-se que houve uma grande interferência dos contaminantes contidos na amostra durante a eletroforese bidimensional, visto que os *spots* não ficaram bem definidos, tanto com distorção vertical, quanto com distorção horizontal. O mesmo comportamento foi observado com as culturas crescidas sem adição dos corantes.

Segundo a GE Healthcare (2004), a precipitação das proteínas na amostra para remoção de substâncias interferentes é opcional. Porém na primeira dimensão, a focagem isoeletrica é extremamente sensível a impurezas iônicas. Estas impurezas não-proteicas na amostra podem interferir na separação, bem como na sua visualização no gel bidimensional.

Tendo em vista que esta interferência poderia ocorrer, uma etapa previa de precipitação foi realizada. Contudo, ainda assim ocorreu interferência dos contaminantes presentes na célula após a sua lise celular. Desta forma, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida para avaliação da influência dos contaminantes. A figura 34 mostra o perfil eletroforético das proteínas de *Pseudomonas oleovorans* antes e após a descoloração de efluente contendo o corante B15.

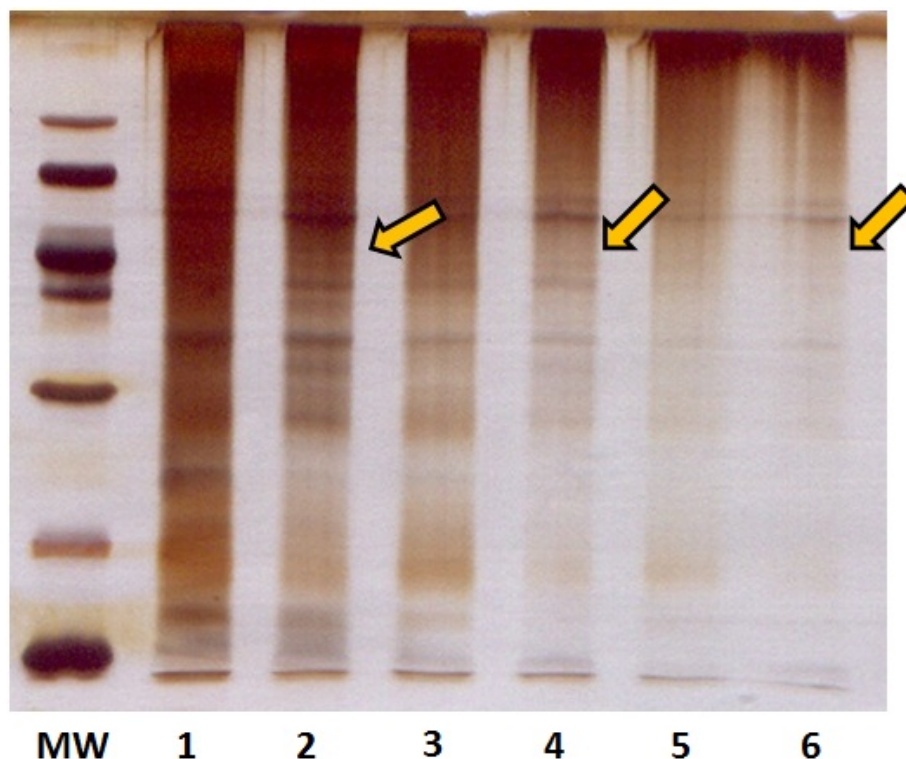


Figura 34 - SDS-PAGE da *Pseudomonas oleovorans* após descoloração do corante B15. MW – marcador molecular(66, 45, 36, 29, 24, 20, 14 KDa); 1 - 30 µg de proteínas de *P. oleovorans* sem adição de corantes; 2 - 30 µg de proteínas de *P. oleovorans* após descoloração do corante B15; 3 - 20 µg de proteínas de *P. oleovorans* sem adição de corantes; 4 - 20 µg de proteínas de *P. oleovorans* após descoloração do corante B15; 5 - 10 µg de proteínas de *P. oleovorans* sem adição de corantes; e 6 - 10 µg de proteínas de *P. oleovorans* após descoloração do corante B15.

Observou-se que tanto as amostras que foram expostas aos corantes, quanto às amostras sem a mesma exposição, apresentam contaminantes visíveis no gel de poliacrilamida. Estes contaminantes são responsáveis pelos rastros presentes do gel, os quais são, provavelmente, oriundos da parede celular, os quais são liberados e homogeneizados junto às proteínas durante a lise celular.

Contudo, devido às diluições efetuadas, foi possível minimizar a influencia dos contaminantes presentes. Desta forma, foi possível visualizar duas bandas de proteínas presentes no extrato protéico das células de *Pseudomonas oleovorans* (indicados pelas setas amarelas). Possivelmente estas bandas correspondem a enzimas azorredutases das *P. oleovorans*, com aproximadamente 38 KDa. Este resultado vai de encontro com os achados por Moutaouakkil *et al.*(2003), que purificaram a azoredutase de *Enterobacter agglomerans*, as quais são enzimas monoméricas de aproximadamente 28 KDa.

A3 Tempo de Residência do Reator Anóxico

Em decorrência dos resultados obtidos previamente para a descoloração de corantes em cultivo submerso, bem como para a descoloração em *fed-batch*, um reator em escala laboratorial foi desenhado (como descrito no item 6.9). Para avaliar o comportamento do reator frente à forma da espuma de poliuretano utilizada, foram realizados estudos de tempo de residência antes dos experimentos de descoloração.

A figura 35 mostra um esquema do reator empacotado com cubos de espumas de poliuretano medindo 1 cm^3 e sua curva de distribuição de tempo de residência; e a figura 36 mostra um esquema do reator empacotado com um cilindro de espuma de poliuretano medindo 3 cm de diâmetro e 19 cm de altura e sua curva de distribuição de tempo de residência.

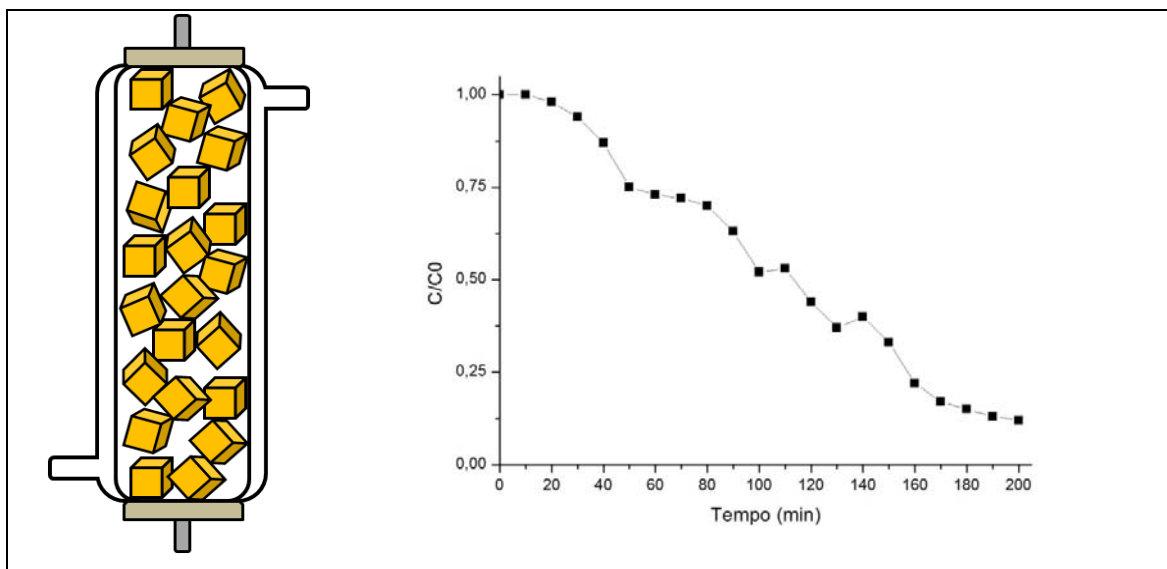


Figura 35 - Desenho esquemático da coluna empacotada com cubos de espuma de poliuretano e a curva de distribuição do tempo de residência.

Observou-se que quando a coluna foi empacotada com os cubos de espuma de poliuretano medindo 1 cm^3 , houve várias zonas de estagnação dentro da coluna, o que levou a um comportamento irregular da curva de distribuição do tempo de residência. O perfil da curva de distribuição indica que a coluna empacotada desta forma está longe do comportamento normal de um reator *Plug Flow*. O maior tempo para o escoamento total do traçador não significa que haveria um tempo maior de contato entre as moléculas de corante e as células imobilizadas na espuma.

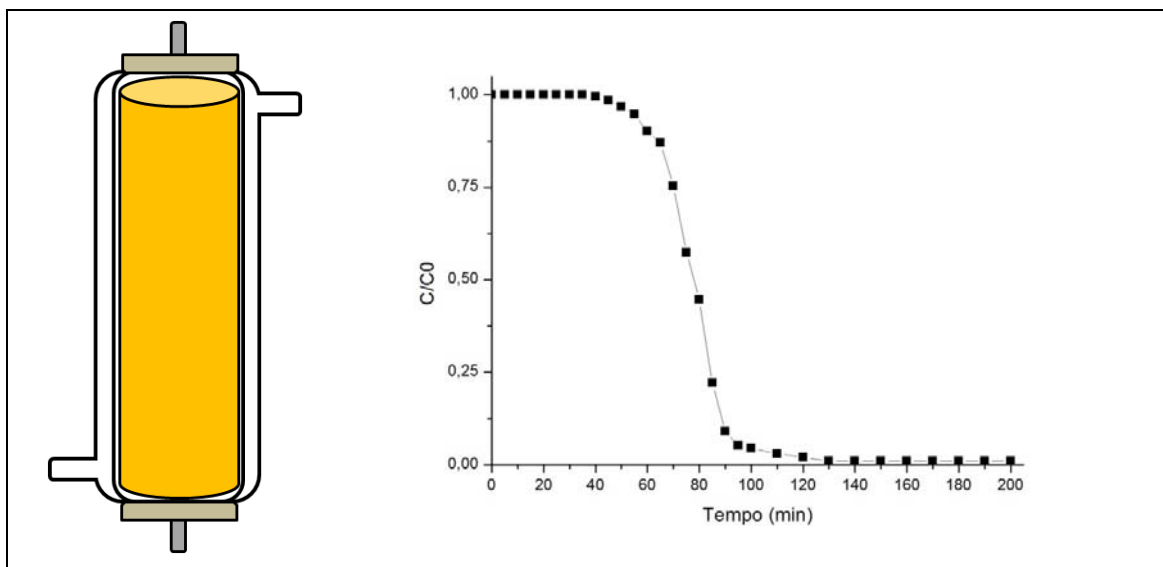


Figura 36 - Desenho esquemático da coluna empacotada com um cilindro de espuma de poliuretano e a curva de distribuição do tempo de residência.