

## DESCOLORAÇÃO DO CORANTE TÊXTIL ALARANJADO II USANDO UM CONSÓRCIO BACTERIANO

**Norma Suely Evangelista Barreto<sup>(1)\*</sup>**

Engenheira de Pesca pela Universidade Federal do Ceará, UFC. Mestre em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará. Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. Bolsista DCR CNPq/FUNCAP no Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, UFC.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rua das Oiticicas 130, Casa 18. Passaré – Fortaleza – CE – CEP: 60743-790 - Brasil - Tel: (85) 3242-6422 R.204 – E-mail: [nsevangalista@yahoo.com.br](mailto:nsevangalista@yahoo.com.br)

**Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira<sup>(2)</sup>**

Bióloga pela Universidade Federal do Ceará, UFC. Mestre em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará, UFC. Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo, USP. Professor Adjunto IV, no curso de Engenharia de Pesca, na Universidade Federal do Ceará. E-mail: [regine@labomar.ufc.br](mailto:regine@labomar.ufc.br)

**Galba Maria de Campos-Takaki<sup>(3)</sup>**

Doutora em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP. Coordenadora do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais. Coordenadora do Programa Institucional de Base para a Iniciação Científica pela Universidade Católica de Pernambuco, UNICAP. E-mail: [takaki@unicap.br](mailto:takaki@unicap.br)

### RESUMO

A descoloração do azo corante Alaranjado II (0,050 mM) foi realizada usando *Geobacillus stearothermophilus* (UCP 986) e *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 992), sob condições aeróbica e semi-aeróbica, por 48 h a 40°C. A cor remanescente, pH, biomassa, dosagem de proteínas totais, consumo de glicose e toxicidade foram monitorados em intervalos de 12 h. Nos ensaios com 24 h contendo *G. stearothermophilus*, remoção de 90% do corante foi observada. Após a adição de *P. aeruginosa*, a remoção total do corante ocorreu com 36 h. O pH do meio variou de 5,7 a 8,1 e a glicose foi consumida com 12 h. A glicose usada como fonte de energia inicial, favorece o processo de descoloração. A biomassa final foi de 2,54 g L<sup>-1</sup> e a absorção dos nutrientes foi observada pela diminuição no perfil protéico ao longo do cultivo. Bioensaios (CL<sub>50</sub>) usando *Selenastrum capricornutum* nas amostras descoloridas apresentaram uma toxicidade ao redor de 50%, no entanto, ao usar *Artemia salina* nenhuma toxicidade foi observada. A descoloração do azo corante Alaranjado II pelo consórcio bacteriano demonstrou ser um processo promissor no tratamento de amostras coloridas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Descoloração, *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, corante têxtil, detoxificação.

### INTRODUÇÃO

Os corantes sintéticos têm sido intensamente usados no setor têxtil e em tinturarias devido a fácil aplicação, baixo custo, firmeza e variedade de cores quando comparados aos corantes naturais (WONG & YUEN, 1996). Os azo corantes compreendem a maioria dos corantes têxteis produzidos, sendo comumente usados nas indústrias de impressão de papel, têxtil e cosméticos (CARLIELL *et al.*, 1995; PAJAGURU *et al.*, 2000).

Os compostos azo são caracterizados pela presença de uma ou mais ligações -N=N-, em associação com um ou mais sistemas aromáticos (WONG & YUEN, 1996). Acredita-se que cerca de 1000 mg/L de corantes esteja presente nos banhos de tingimento e devido à solubilidade na água (SESHADRI *et al.*, 1994) cerca de 40% do composto não é fixado durante o processo de tingimento, sendo então liberado para o ambiente (MANU & CHAUDHARI *et al.*, 2002). A maioria destes compostos é altamente resistente ao ataque microbiano e conseqüentemente, de difícil remoção nos efluentes, quando tratados por processos biológicos convencionais, a exemplo do lodo ativado (GE *et al.*, 2004).

Atualmente, a aplicação de consórcios bacterianos tem sido de grande interesse por parte da comunidade científica, principalmente, na elaboração de novas metodologias com aplicação de novos microrganismos. A

atividade catabólica dos microrganismos em consórcios se complementa e interações sintróficas presentes nestas comunidades pode conduzir a completa mineralização dos azo corantes (PEARCE *et al.*, 2003).

A degradação bacteriana de compostos azo é frequentemente iniciada sob condições anaeróbicas por uma via de transformação enzimática que envolve a quebra da ligação azo, através de enzimas azoredutases que utilizam a coenzima reduzida NADH como doadora de elétrons (ZIMMERMANN *et al.*, 1982). Contudo, o processo de descoloração anaeróbica apresenta como principal desvantagem a produção de aminas aromáticas, consideradas mutagênicas e carcinogênicas (KUDLICH *et al.*, 1999). Os azo corantes, no entanto, podem sofrer completa mineralização numa etapa aeróbica posterior através de enzimas não específicas, com hidroxilação e fissão do anel aromático (O'NEILL *et al.*, 2000).

Baseado nisso, um consórcio bacteriano utilizando *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986 e *Pseudomonas aeruginosa* UCP 992 foi realizado para avaliar a descoloração e biodegradação do azo corante Alaranjado II, sob condições aeróbicas e microaerofílicas.

## MATERIAIS E MÉTODOS

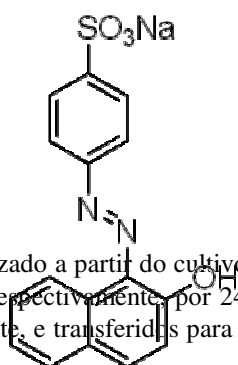
**Microrganismos:** foram utilizadas duas espécies bacterianas, *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986, isolado de efluente de lodo têxtil na indústria Suape Têxtil, Pernambuco, Brasil e *Pseudomonas aeruginosa* UCP 992, pertencente ao Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, NPCIAMB, UNICAP, PE. Os isolados foram mantidos em meio Agar nutriente a 4°C.

**Condições de cultivo:** o pré-inóculo mantido por 12 h de cada microrganismo foi cultivado em 50 mL de caldo Luria Bertani (LB) em frascos Erlenmeyers de 125 mL de capacidade e incubados sob agitação orbital de 150 rpm a 40°C. Em seguida, um inóculo de 1% do cultivo de *G. stearothermophilus* foi transferido para frascos Erlenmeyers com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL do meio LB com a seguinte composição (g L<sup>-1</sup>): triptona 10, extrato de levedura 5 e NaCl 10, adicionado de glicose 0,5 (KONISHI *et al.*, 1997), pH 7,0 ± 0,2. Após o inóculo, foi acrescido o corante Alaranjado II, na concentração final de 0,050 mM. Os frascos foram mantidos sob agitação de 75 rpm por 24 h a 40°C. Em seguida, um inóculo de 1% de *P. aeruginosa*, foi adicionado ao meio, e os frascos deixados em repouso por 12 h e posteriormente submetidos à nova agitação (12 h). Alíquotas do sobrenadante nos intervalos de 12, 24, 36 e 48 h foram retiradas para o monitoramento da cor, pH, consumo de glicose e dosagem de proteínas. Ao final de cada tempo, a biomassa era centrifugada a 4.000 rpm por 15 min. a 4°C e posteriormente submetida a liofilização para determinação do peso seco. Frascos controle sem o microrganismo foram mantidos nas mesmas condições. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sob condições controladas.

**Ensaio com o corante:** o corante Alaranjado II (C.I. 15510) do tipo azo reativo, foi adquirido da Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). O Alaranjado II apresenta absorvância máxima a 485 nm (Figura 1). A descoloração do azo corante foi monitorada no comprimento de onda máxima do sobrenadante após centrifugação (10.000 g por 8 min.), usando espectrofotômetro UV-VIS (Espectronic Gênesis modelo 2). A eficiência na remoção da cor foi expressa pela relação do percentual de descoloração da concentração inicial do corante.

Remoção da cor (%) =  $\frac{(A) - (B)}{(A)} \times 100$ , onde (A) indica a absorvância do caldo não inoculado e (B) indica a absorvância residual do caldo.

Figura 1: Estrutura química do azo corante Alaranjado II.



**Atividade fenoloxidase:** o teste foi realizado a partir do cultivo de *G. stearothermophilus* e *P. aeruginosa* em caldo LB a temperatura de 45 e 35°C, respectivamente, por 24 h. Em seguida discos de cinco milímetros de diâmetro foram removidos, assepticamente, e transferidos para o centro de placas de Petri contendo 20 mL do

meio Agar LB contendo ácido tânico e gálico (0.5%). A confirmação positiva no teste foi observada através de uma zona de coloração marrom escuro ao redor dos discos (HARKIN & OBST, 1973). Placas sem o ácido tânico e gálico também foram utilizadas como controle negativo. Para testar a atividade de enzimas no líquido metabólico livre de células, após a descoloração, discos de oxidase da SENSOBIODISC/CECON<sup>®</sup> foram adicionados em tubos de ensaio contendo 2 mL da amostra. A positividade do teste foi observada através da coloração rósea do meio.

**Determinação do pH, consumo de glicose e proteínas totais:** o pH do líquido metabólico livre de células foi medido utilizando um pHmetro Orion, modelo 310. O consumo de glicose foi determinado no líquido metabólico livre de células através de kit comercial (Labtest<sup>®</sup>). A dosagem de glicose consiste no método enzimático colorimétrico glicose-oxidase usando uma solução padrão de glicose (100 mg dL<sup>-1</sup>) e medido espectrofotometricamente a 505 nm. A determinação do consumo de proteínas foi realizada usando o método colorimétrico do Biureto (kit Labtest<sup>®</sup>), com leitura de absorbância a 545 nm.

#### Testes de Toxicidade:

*Selenastrum capricornutum*: o teste de toxicidade foi realizado usando a alga verde de água doce *Selenastrum capricornutum* (adquirida na coleção de culturas de algas da EMBRAPA, Jaguariúna/São Paulo, Brasil) (REGINATTO, 1998). Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo diferentes concentrações (2,5, 5,0, 10 e 26 mL) da amostra teste, meio mineral e a alga (inóculo - 10<sup>6</sup> cels mL<sup>-1</sup> / 72 h / Aa 0,160 a 680 nm). Ensaios controle e branco também foram realizados. Todos os frascos foram incubados a 24°C e expostos sob agitação constante (100 rpm) à luz fluorescente branca, para assegurar o crescimento exponencial das algas. Após 72 h, a densidade da alga foi medida através da fluorescência da clorofila das algas, usando fluorímetro modelo F-4500 (Hitachi), para determinação da CL<sub>50</sub>. Os ensaios foram realizados em triplicata e o volume final do teste era de 30 mL.

*Artemia salina*: a toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* foi determinada apenas pela porcentagem de morte dos organismos em relação ao seu número total (10 larvas), na presença de diferentes concentrações da amostra teste, por 24 h (MEYER *et al.*, 1982). O método consistiu em avaliar a morte das larvas de *A. salina* (cistos de camarão disponíveis em lojas de alimentos para peixes), cultivando-os em diferentes concentrações (17, 33, 67 e 83%) da amostra teste diluídas em 5 mL de água do mar artificial (38 g L<sup>-1</sup> de sal marinho). Após 24 h era feita a contagem dos organismos sobreviventes, determinando-se a dose limite do poluente (CL<sub>50</sub>). Os experimentos foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### DESCOLORAÇÃO DO CORANTE

No presente estudo, um consórcio bacteriano combinado contendo *G. stearothermophilus* (UCP 986) e *P. aeruginosa* (UCP 992), mantidos numa sequência agitação-reposo-agitação foi realizado a fim de descolorir o azo corante Alaranjado II. A taxa de descoloração do corante é mostrada na Figura 2.

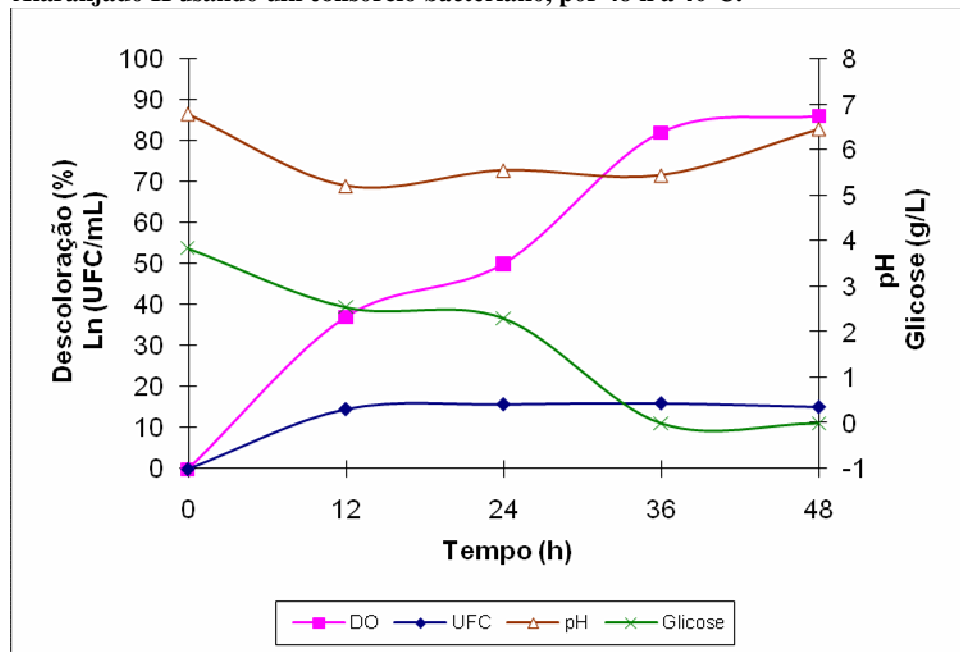
Com 12 h de cultivo, mais de 50% do corante já havia sido removido. Neste intervalo, (cultivo apenas com *G. stearothermophilus*) o processo de descoloração ocorreu em parte por biosorção, visto que a biomassa foi prontamente colorida. Segundo CHEN (2002), o acúmulo do corante, pode indicar toxicidade crônica às células, onde a bioacumulação (para degradação ou armazenamento) é uma condição necessária a sobrevivência da célula. Ainda nestas condições, a biomassa celular apresentou um rendimento de 2,54 g L<sup>-1</sup>. Após o período de 24 h, apenas 10% do corante remanescente permanecia no meio, indicando que a agitação moderada não afetou o processo de descoloração, contribuindo ainda para aumentar a biomassa celular. Neste intervalo de tempo, a descoloração ocorreu apenas por degradação, visto que a biomassa se apresentava incolor. Nos frascos controle, sem a adição do microrganismo, não houve alteração na cor.

Embora, os azo corantes tenham sido considerados como não sendo biodegradáveis por bactérias, sob condições aeróbicas (NIGAM *et al.*, 1996), devido a inibição da enzima azoreductase pelo oxigênio (CHEN, 2002), alguns compostos azo, têm sido relatados como sendo reduzidos sob condições aeróbicas ou microaerofílicas (NACHIYAR & RAJKUMAR, 2003)

No intervalo de tempo em que os frascos foram mantidos sob repouso (24 – 36 h) e *P. aeruginosa* foi adicionada ao meio, descoloração total e rendimento celular máximo de 5,35 g L<sup>-1</sup> foi observando. A etapa

final (sob agitação) teve como objetivo eliminar a presença de possíveis compostos facilmente oxidáveis, formados durante a etapa de repouso. Nestas condições, os microrganismos já apresentavam uma fase de declínio (biomassa  $4,77 \text{ g L}^{-1}$ ), provavelmente devido à escassez de nutrientes (Figura 2).

**Figura 2: pH, consumo de glicose, peso seco e descoloração do azo corante Alaranjado II usando um consórcio bacteriano, por 48 h a  $40^\circ\text{C}$ .**



A aplicação de consórcios na descoloração de corantes têxteis tem sido bastante promissora, porque os microrganismos podem agir sinergicamente em uma variedade de corantes e misturas de corantes, sendo degradados principalmente, por co-metabolismo (WATANABE & BAKER, 2000).

Alguns parâmetros foram analisados para análise do crescimento: faixa de pH, consumo de glicose e dosagem protéica. O pH diminuiu com 12 h (5,7), tendendo a faixa alcalina ao final do cultivo (8,1). A diminuição inicial do pH é justificada pelo acúmulo de ácidos orgânicos, resultante da degradação da glicose, quase totalmente ausente neste intervalo de tempo. O aumento do pH, provavelmente ocorreu devido à formação de compostos básicos, como por exemplo, aminas (AMBRÓSIO, 2002), sugerindo a degradação do corante (Figura 2).

Segundo ADEDAYO *et al.* (2004) a descoloração total do corante Vermelho de Metila ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ) usando um consórcio bacteriano, foi observada após 6 h em pH 6 e 7 e de apenas 82 e 65% em pH 8 e 9, respectivamente.

Com relação à adição do co-substrato, a glicose durante o co-metabolismo é citada como realçando a eficiência de redução da cor. Segundo VAN DER ZEE & VILLAYERDE (2005) a descoloração dos azo corantes é um processo relativamente não específico com relação ao seu doador de elétrons, no entanto, a presença de um doador de elétron externo é um pré-requisito importante na redução dos azo corantes. MENDEZ-PAZ *et al.* (2005) relataram que a taxa de remoção do corante Alaranjado II foi altamente favorável quando a glicose era adicionada como co-substrato. Por outro lado, ALBUQUERQUE *et al.* (2005) citaram que a remoção de cor do Alaranjado II sob condições anaeróbicas era muito baixa usando amido, aumentando significativamente, com a adição do lactato.

O efeito favorável da glicose na degradação dos azo corantes ocorre devido o aumento na formação de equivalentes redutores (flavina nucleotídeos), que são responsáveis pela redução do corante (PAJAGURU *et al.*, 2000; MENDEZ-PAZ *et al.*, 2005a). Por outro lado, mediadores redox são bastante eficazes na redução de compostos azo, provavelmente devido a natureza de seu grupo cromóforo  $-N=N-$ , que é eletronicamente instável e tem capacidade de receber elétrons na forma reduzida do mediador (SANTOS *et al.*, 2005).

Com relação à dosagem de proteínas totais (Tabela 1) analisadas no líquido metabólico livre de células, se observou uma diminuição em torno de 50% ao fim do cultivo, indicando um comportamento bioquímico clássico de absorção dos nutrientes (ANDRADE *et al.*, 2000).

**Tabela 1: Concentração de proteína total e atividade enzimática, do líquido metabólico livre de células no cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* e *Pseudomonas aeruginosa*, durante o processo de descoloração do Alaranjado II, por 48 h a 40°C.**

Ensaios	Proteína total (g L <sup>-1</sup> )	Atividade enzimática (teste de oxidase)
0 h	9,80	-
12 h	6,60	+
24 h	5,90	+
36 h	5,20	++
48 h	4,80	++

+ (maior intensidade na cor) ++ (maior intensidade na cor)

A ação de enzimas azoredutases insensíveis ao oxigênio envolvidas na descoloração de alguns azo corantes, foi descrita por ZIMMERMANN *et al.* (1982). A partir daí, outros estudos demonstraram que algumas espécies bacterianas são capazes de degradar aerobicamente estes compostos. NACHIYAR & RAJKUMAR (2003) demonstraram a atividade de uma azoredutase (11U), como sendo responsável pela redução da ligação azo na descoloração do Navitan Fast Blue S5R.

Segundo DURÁN & ESPOSITO (2000) um número de enzimas oxidativas, como peroxidases e/ou fenoloxidases podem agir em poluentes recalcitrantes específicos, pela precipitação ou transformação para outros produtos, permitindo assim, melhor tratamento final do desperdício.

Considerando as informações da literatura, realizou-se testes de detecção da atividade de fenoloxidase pelos microrganismos estudados. O teste foi realizado usando ácido tânico e gálico como indicador e ambos os microrganismos apresentaram atividade positiva. A adição de discos de oxidase bacteriana no líquido metabólico livre de células também foi realizada, apresentando positividade para este teste (Tabela 1).

Segundo NACHIYAR & RAJKUMAR (2003) *Bacillus stearothermophilus* (hoje denominado *G. stearothermophilus*), tem sido considerado capaz de produzir peroxidases. A lacase peroxidase independente produzida por uma espécie bacteriana não identificada (BF2) foi citada como sendo a maior enzima oxidativa envolvida na degradação de compostos azo (SENAN & ABRAHAM, 2004).

## AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A porção não-biodegradável do corante formada durante o processo de descoloração através de seus produtos intermediários ou compostos estáveis é conhecida como sendo responsável pela toxicidade (ISIK & SPONZA, 2004). Segundo CARLIELL *et al.* (1995) as aminas aromáticas são mais tóxicas que seu composto original porque penetram nas células dos microrganismos com maior facilidade.

Segundo MENDEZ-PAZ *et al.* (2005a) a redução do corante Alaranjado II forma como produtos intermediários, ácido sulfanílico e 1-amino-2-naftol, este último quase nunca encontrado porque se auto-oxida rapidamente a 1,2-naftolquinona. Devido a toxicidade apresentada por alguns corantes em seus intermediários formados pela clivagem parcial da molécula, testes de toxicidade após a descoloração do Alaranjado II foram realizados usando dois organismos indicadores, à alga de água doce *S. capricornutum* e o microcrustáceo *A. salina*.

A toxicidade crônica foi avaliada usando *S. capricornutum*, sendo observada inibição no crescimento dos organismos, quando expostos aos ensaios após 24 e 48 h de descoloração, em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle (Tabela 2).

Os valores da CL<sub>50</sub> (concentração que causa 50% de inibição no crescimento da alga) das amostras testes após 24 e 48 h de descoloração, calculados a partir de curvas de regressão logarítmica (concentração da amostra versus inibição da alga), foram de 17,8 e 8,7 mL (v.v<sup>-1</sup>), respectivamente. Segundo REGINATTO (1998), o ensaio com algas, às vezes não permite diferenciar se o efeito causado pelas amostras coloridas é um efeito

tóxico real, ou, simplesmente, se a luz fornecida às algas para seu crescimento foi em parte, absorvida por estas amostras. Assim, um outro bioensaio de toxicidade, empregando o microcrustáceo *A. salina* foi realizado.

Os testes usando este bioindicador foram realizados em todos os intervalos de descoloração estudados (12, 24, 36 e 48 h). Diferente dos resultados apresentados para *S. capricornutum*, a toxicidade observada para *A. salina* diminuiu com o decorrer da remoção do corante, ou seja, nas amostras com 12 e 24 h de descoloração, uma mortalidade de 37% e 17%, respectivamente, foi observada apenas na maior concentração testada (83%), quando comparadas ao controle. Nas amostras com 36 e 48 h de descoloração, a toxicidade foi praticamente zero em todas as concentrações testadas. Assim, a diminuição na toxicidade dos metabólitos formados no decorrer da descoloração, sugere a degradação do composto. Segundo ISIK & SPONZA (2004) uma sequência de processos biológicos anaeróbicos e aeróbicos são mais efetivos para reduzir a toxicidade.

**Tabela 2: Inibição no crescimento da alga *Selenastrum capricornutum* pelo líquido metabólico proveniente do processo de descoloração do azo corante Alaranjado II usando um consórcio microbiano, por 48h a 40°C.**

Concentração (mL)	Inibição no crescimento da alga <i>Selenastrum capricornutum</i>			
	24 h (%)	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mL)	48h (%)	CL <sub>50</sub> <sup>b</sup> (mL)
2,5	5	17,8	25	8,7
5	20		37	
10	40		58	
26	57		69	

<sup>a</sup>CL<sub>50</sub> 24h: Eq:  $y = 22.654\text{Ln}(x) - 15.297$  ( $R^2 = 0.9912$ )

<sup>b</sup>CL<sub>50</sub> 48h: Eq:  $y = 19.581\text{Ln}(x) + 7.6652$  ( $R^2 = 0.9674$ )

## CONCLUSÕES

Baseado neste estudo pode-se concluir que o consórcio microbiano contendo os microrganismos *G. stearothermophilus* (UCP 986) e *P. aeruginosa* (UCP 992) descolore efetivamente o azo corante Alaranjado II sob condições aeróbicas e microaerofílicas, sugerindo a sua aplicação no tratamento de efluentes contendo este composto e assim, podendo ser descarregado nos corpos d'água sem causar danos a biota.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Nelson Duran e Livia Cordi (Laboratório de Química Biológica, UNICAMP, SP) pelos testes de toxicidade. Agradecem ainda à agência financiadora CNPq, FINEP/CTPETRO e FACEPE pelo suporte financeiro e a UNICAP pelas instalações cedidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEDAYO, O., JAVADPOUR, S., TAYLOR, C., ANDERSON, W. A., MOO-YOUNG, M. Decolourization and detoxification of methyl red by aerobic bacteria from a wastewater treatment plant. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p.545-550, 2004.
2. ALBUQUERQUE, M. G. E., LOPES, A. T., SERRALHEIRO, M. I., NOVAIS, J. M., PINHEIRO, H. M. Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. **Enzyme Microb. Technol.**, v.36, p.790-799, 2005.
3. AMBRÓSIO, S. T. Remoção de corantes utilizados em indústria têxtil por *Cunninghamella elegans* UCP 542. Recife, 2002. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2002.
4. ANDRADE, V. S., BARROS NETO, B., CAMPOS-TAKAKI, G. M. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. **Can. J. Microbiol.**, v.46, p.1042-1045, 2000.
5. CARLIELL, C. M., BARCLAY, S. J., NAIDOO, N. BUCKLEY, C. A., MULHOLLAND, D. A. SENIOR, E. Microbial decolorization of a reactive azo dye under anaerobic condition. **Water SA**, v.21, p.61-69, 1995.
6. CHEN, B.-Y. Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. **Process Biochem.**, v.38, p.437-446, 2002.
7. DURÁN, N., ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Catal. B: Environ.**, v.28, p.83-99, 2000.
8. GE, Y., YAN, L., QINGE, Q. Effect of environment factors on dye decolorization by *P. sordida* ATCC 90872 in a aerated reactor. **Process Biochem.**, v.39, p.1401-1405, 2004.

9. HARKIN, J. M., OBST, J. R. Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidases in fungi. **Experientia**, v.29, p.381-387, 1973.
10. ISIK, M., SPONZA, D. T. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic-aerobic sequential reactor system. **J. Hazard Mater B**, v.114, p.29-39, 2004.
11. KONISHI, J., ISHI, Y., ONAKA, T., OKUMURA, K., SUZUKI, M. Thermophilic carbon-sulphur-bond-targeted biodesulfurization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.3164-3169, 1997.
12. KUDLICH, M., HETHERIDGE, M. J., KNACKMUSS, H. J., STOLZ, A. Autoxidation reactions of different aromatic o-aminohydroxynaphthalenes that are formed during the anaerobic reduction of sulfonated azo dyes. **Environ. Sci. Technol.**, v.33, p.896-901, 1999.
13. MANU, B., CHAUDHARI, S. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. **Bioresource Technol.**, v.82, p.225-231, 2002.
14. MENDEZ-PAZ, D., OMIL, F., LEMA, J. M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under fed-batch and continuous conditions. **Water Res.**, v.39, p.771-778, 2005.
15. MENDEZ-PAZ, D., OMIL, F., LEMA, J. M. Anaerobic treatment of azo dye Acid Orange 7 under batch conditions. **Enzyme Microbial. Technol.**, v.36, p.264-272, 2005a.
16. MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. B., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v.45, p.31-34, 1982.
17. NACHIYAR, C. V., RAJKUMAR, G. S. Degradation of a tannery and textile dye, Navitan Fast Blue S5R by *Pseudomonas aeruginosa*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.19, p.609-614, 2003.
18. NIGAM, P., BANAT, I. M., SINGH, D., MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochem.**, v.31, p.435-442, 1996.
19. O'NEILL, C. O., HAWKES, F. R., HAWKES, D. L., ESTEVES, S., WILCOX, S. J. Anaerobic-aerobic biotreatment of simulated textile effluent containing varied ratios of starch and azo dye. **Water Res.**, v.34, p.2355-2361, 2000.
20. PAJAGURU, P., KALAISELVI, K., PALANIVEL, M., SUBBURAM, V. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.54, p. 268-273, 2000.
21. PEARCE, C. I., LLOYD, J. R., GUTHRIE, J. T. The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. **Dyes Pigm.**, v.58, p.179-196, 2003.
22. REGINATTO, V. Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. Campinas. 1998. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 1998.
23. SANTOS, A. B., BISSCHOPS, I. A. E., CERVANTES, F. J., VAN LIER, J. B. The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55°C) and mesophilic (30°C) anaerobic treatments. **J. Biotechnol.**, v.115, p.345-353, 2005.
24. SENAN, R. C., ABRAHAM, T. E. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. **Biodegradation**, v.15, p.275-280, 2004.
25. SESHADRI, S., BISHOP, P. L., AGHA, A. M. Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. **Waste Management**, v.14, p.127-137, 1994.
26. VAN DER ZEE, F. P., VILLAVERDE, S. Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - a short review of bioreactor studies. **Water Res.**, v.39, p.1425-1440, 2005.
27. WATANABE, K., BAKER, P. W. Environmentally relevant microorganisms. **J. Bioscience Bioeng.**, v.89, p.1-11, 2000.
28. WONG, P. K., YUEN, P. Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS 13. **Water Res.**, v.30, p.1736-1744, 1996.
29. ZIMMERMANN, T., KULLA, H. G., LEISINGER, T. Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. **Eur. J. Biochem.**, v.129, p.197-203, 1982.