



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental  
Câmpus Apucarana e Londrina



NAYARA DE OLIVEIRA BATISTA

BIODESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE METILENO E CRISTAL  
VIOLETA POR ISOLADOS *BACILLUS* E *PSEUDOMONAS* DE ORIGEM  
AMBIENTAL

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2019

NAYARA DE OLIVEIRA BATISTA

BIODESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE METILENO E CRISTAL  
VIOLETA POR ISOLADOS *BACILLUS* E *PSEUDOMONAS* DE ORIGEM  
AMBIENTAL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental, do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA

2019

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

B333b Batista, Nayara de Oliveira

Biodescoloração dos corantes azul de metileno e cristal violeta por isolados *Bacillus* e *Pseudomonas* de origem ambiental / Nayara de Oliveira Batista. - Londrina : [s.n.], 2019.

53 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profª Drª Luciana Furlaneto-Maia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2019. Bibliografia: f. 40-49.

1. Águas residuais. 2. Indústria têxtil. 3. Biodegradação. 4. Bactérias. 5. Corantes. 6. Azul de metileno. 7. Violeta de genciana. I. Furlaneto-Maia, Luciana, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. III. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

CDD: 628



TERMO DE APROVAÇÃO

BIODESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE METILENO E CRISTAL  
VIOLETA POR ISOLADOS *BACILLUS* E *PSEUDOMONAS* DE ORIGEM  
AMBIENTAL

por

**NAYARA DE OLIVEIRA BATISTA**

Dissertação de Mestrado apresentada no dia 05 de julho de 2019, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana e Londrina, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A mestranda foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após avaliação da Dissertação, a Banca Examinadora considerou a Dissertação aprovada. O presente termo assinado ficará depositado na Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental – PPGEA.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto-Maia – Orientadora  
(UTFPR – Câmpus Londrina)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto – Membro titular  
(Universidade Estadual de Londrina)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Feijó de Souza Daniel – Membro titular  
(UTFPR – Câmpus Londrina)

---

Prof. Dr. Alesandro Bail

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

"A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso". Portaria nº 0345, de 15 de março de 2017.

*Dedico este trabalho aos meus pais Vanildo e Solange, e a minha irmã (Nathalia) por todo amor e apoio durante a caminhada acadêmica e todos os dias de minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a Prof.<sup>a</sup>. Dra. Luciana Furlaneto-Maia, obrigada por me acolher no laboratório e pela sabedoria na condução deste trabalho.

Obrigada à UTFPR de modo geral pelo suporte técnico e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, pois é nesse lugar que passei grande parte do meu tempo nos últimos anos, desde a graduação.

Aos meus colegas de laboratório (Alex, Aline, Ariadne, Bruno, Lorena, Natara e Thabata) por todas as experiências e experimentos vividos, em especial a Natara por me auxiliar no início do experimento, ao Bruno pelas companhias de todas as tardes e a Thabata pelos conselhos e pela amizade.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”. (XAVIER, CHICO)

## RESUMO

BATISTA, Nayara de Oliveira. Biodescoloração dos corantes azul de metileno e cristal violeta por isolados *Bacillus* e *Pseudomonas* de origem ambiental. 2019. 53 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2019.

Grandes quantidades de corantes tóxicos provenientes de efluentes têxteis são descartados em sistema de água natural, pois parte dos corantes não é absorvida no processo de tingimento dos tecidos levando a alterações principalmente na flora e fauna aquática, além de efeitos nocivos ao homem. Diversos processos podem ser utilizados para a remoção destes corantes, contudo, a busca por tecnologias ecologicamente corretas e econômicas é constante. Deste modo, o presente trabalho visou a biodescoloração e a biodetoxificação dos corantes azul de metileno e cristal violeta, os quais são usados na indústria têxtil. Foram utilizados os isolados bacterianos (isolado A5 – *Pseudomona* sp.; isolados A7, A8 e CA – *Bacillus* sp.), os quais são comprovadamente produtores de lacase, que foi calculada pela oxidação de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico). Os corantes foram testados nas concentrações 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> para azul de metileno e 0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup> para cristal violeta em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion Broth) sólido e líquido, determinou-se as bandas espectrais do UV-VIS, além da contagem de unidades formadoras de colônia, (UFC) realização de testes de ecotoxicidade (citotoxicidade e fitotoxicidade) e análises estatísticas. Todos os isolados apresentaram eficiência na degradação dos corantes, variando de 85% para o corante azul de metileno a 93,14% para o corante cristal violeta. Os testes de citotoxicidade utilizando *Escherichia coli* revelaram a perda da sensibilidade ao corante, enquanto no teste de fitotoxicidade não houve diferença nos resultados das soluções tratadas pelos isolados bacterianos comparadas as soluções não tratadas. As análises estatísticas indicaram que os melhores isolados avaliados nos testes foram os pertencentes ao gênero *Bacillus* sp.

Palavras-chave: Biodescoloração. Biodetoxificação. Isolados bacterianos. Azul de metileno. Cristal violeta.

## ABSTRACT

BATISTA, Nayara de Oliveira. Biodescoloration of methylene blue and violet crystal by *Bacillus* and *Pseudomonas* isolates of environmental origin. 2019. 53 p. Dissertation (Master in Environmental Engineering) - Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2019.

Large amounts of toxic dyes from textile effluents are discarded in a natural water system, since some of the dyes are not absorbed in the process of dyeing of the tissues leading to changes mainly in aquatic flora and fauna, in addition to harmful effects to man. Several processes can be used to remove these dyes, however, the search for environmentally friendly and economical technologies is constant. Thus, the present work aimed at the biodescoloration and biodegradation of methylene blue and violet crystal dyes, which are used in the textile industry. The bacterial isolates (A5 - *Pseudomonas* sp., Isolates A7, A8 and CA - *Bacillus* sp.) Were used, which are proven to produce laccase, which was calculated by the oxidation of ABTS (2,2' - azino - bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) dyes were tested at concentrations 50 and 100 mg L<sup>-1</sup> for methylene blue and 0.0125 and 0.025 mg L<sup>-1</sup> for crystal violet in BHI culture medium (Brain Heart Infusion Broth ), UV-VIS spectral bands, colony-forming units counting (CFU), ecotoxicity tests (cytotoxicity and phytotoxicity) and statistical analyzes were determined. All the isolates presented efficiency in degradation of The cytotoxicity tests using *Escherichia coli* revealed the loss of sensitivity to the dye, while in the phytotoxicity test there was no difference in the color of the dyes results of the solutions treated by the bacterial isolates compared to the untreated solutions. Statistical analysis indicated that the best isolates evaluated in the tests were those belonging to the genus *Bacillus* sp.

Keywords: Biodescoloration. Biodegradation. Bacterial isolates. Methylene blue. Violet crystal.

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2 - REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>10</b>
2.1 - Efluentes da indústria têxtil .....	10
2.2 - Corantes têxteis .....	11
2.3 - Impacto ambiental dos corantes têxteis .....	13
2.4 - Biodegradação de corantes por microrganismos .....	15
2.4.1 - <i>Biodegradação por bactérias</i> .....	16
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
3.1 - Objetivo geral .....	18
3.2 - Objetivos específicos .....	18
<b>4 - METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
4.1 - Isolados bacterianos .....	19
4.2 - Reativação dos isolados .....	19
4.3 - Determinação da atividade de lacase.....	19
4.4 - Preparo do corante têxtil.....	20
4.5 - Obtenção dos espectros ultravioleta visível .....	20
4.6 - Testes de estabilidade em função do meio de cultura .....	20
4.7 - <i>Screening</i> em cultura sólida .....	20
4.8 - Tratamentos de biodescoloração e biossorção.....	20
4.9 - Contagem do número celular .....	21
4.10 - Teste ecotoxicológico .....	22
4.10.1 - <i>Fitotoxicidade com sementes de lactuca sativa em placa</i> .....	22
4.10.2 - <i>Fitotoxicidade com Lactuca sativa em substrato</i> .....	23
4.10.3 - <i>Ensaio de microtoxicidade</i> .....	23
4.11 - Análises estatísticas.....	24
<b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>6 - CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>51</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

Corantes sintéticos são utilizados como matéria prima na produção de tintas, alimentos, cosméticos, papel, com destaque para a indústria têxtil onde são extensivamente empregados nos processos de tingimento dos tecidos. Estima-se que cerca de 20% desses corantes são utilizados pelo segmento têxtil e que aproximadamente 15% dessa produção é perdida para o meio ambiente durante a sua síntese, processamento ou aplicação (GUARATINI e ZANONI, 2000; MURUGESAN et al., 2007).

Estudos sobre o comprometimento ambiental, decorrente de contaminação por agentes tóxicos, merecem uma atenção especial por parte da comunidade científica, pois podem servir de alerta para os perigos que as populações de plantas, animais e microrganismos possam estar expostas.

O desenvolvimento de tecnologias para o tratamento desses efluentes tem aumentado gradualmente devido à maior rigidez das legislações ambientais. Os principais processos utilizados para a descoloração dessas águas residuais são oxidativos, fotoquímicos, e os adsorptivos e a biodegradação que são considerados técnicas de tratamento muito promissoras.

Visando uma alternativa sustentável para a indústria têxtil, a biodegradação de corantes têxteis com a utilização de microrganismos tem sido uma proposta para melhorar a qualidade do seu efluente pode ser uma forma promissora de tratar tal contaminação.

Deste modo, este trabalho avaliou o potencial de biodegradação de quatro isolados bacterianos, produtores de enzimas oxiredutases, contra os corantes azul de metileno e cristal violeta.

## 2 - REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 - Efluentes da indústria têxtil

Os processos industriais de produção têxtil utilizam grandes quantidades de água e acarretam diferentes resíduos com compostos tóxicos, gerando efluentes líquidos com enorme diversidade e complexidade química, dentre os quais se destacam os corantes e outros compostos orgânicos e inorgânicos (PIZATO et al., 2016).

De acordo com Cisneros et al. (2002), o emprego de tratamentos inadequados faz com que grande parte dos corantes presentes nos efluentes seja descartada ao meio ambiente, pesquisas referentes ao tratamento de efluentes têxteis geralmente enfocam em corantes reativos, os quais representam 30% dos corantes utilizados, onde grande parte se transforma em resíduos devido à baixa fixação em fibras celulósicas e a baixa remoção por tratamentos biológicos convencionais. Além da liberação de substâncias tóxicas e transformação em compostos nocivos via processos naturais, os efluentes derivados do processo de tingimento apresentam coloração intensa. Estima-se que aproximadamente 90% das espécies químicas utilizadas no beneficiamento de fibras, incluindo corantes sejam eliminadas nos efluentes após cumprirem sua função.

Vários processos físico-químicos são utilizados na remediação de efluentes, tais como precipitação química, coagulação, eletrocoagulação, adsorção, floculação, cloração, ultrafiltração, osmose reversa, eletrólise e fotodegradação; e a degradação biológica e microbiológica, uma alternativa barata e sustentável para a remoção de cor (ALI, 2010; BARJASTEH-MOGHADDAM, 2011).

Para o tratamento de efluentes têxteis, a combinação de métodos mostra-se mais adequada, devido à presença de corantes que normalmente são resistentes a degradação nos sistemas convencionais de tratamento (KUNZ et al., 2002).

Os tratamentos podem ser classificados em primário e secundário (eliminação de sólidos suspensos, matéria orgânica e nutrientes), e tratamento terciário (processos físico-químicos), que abrange tecnologias mais desenvolvidas, com maior custo para utilização (BELTRAME, 2000).

## 2.2 - Corantes têxteis

Os corantes são compostos complexos, não possuem estrutura química estável e fixa, e muitas vezes são originados a partir de misturas de outros compostos (FRANCISCON, 2010). Geralmente são estáveis à luz e aos processos de lavagem, apresentando fixação uniforme com as fibras de todo o substrato e colorindo o objeto de duas formas: cobrindo-o com substância colorida ou fazendo com que o objeto seja tingido por um composto de maneira a alterar sua coloração superficial (BARCELLOS, 2004).

Existem inúmeras estruturas químicas de corantes, conforme a ABIQUIM (2009) a classificação detalhada feita por Color Index (C.I.) divide os corantes e pigmentos em 26 classes químicas e em 20 tipos, além de algumas subdivisões.

São 8 mil tipos de corantes têxteis, com produção anual de mais de 700 mil toneladas no mundo, e 20 % destes são descartados em corpos hídricos, um imenso problema ambiental devido a difícil degradação dos resíduos depositados nos efluentes (MOURA, et al., 2015)

Em 2017, de acordo com a ABIT (Associação Brasileira de Indústria Têxtil), no Brasil, foram produzidos 1,3 milhão de toneladas, já em 2015 foram 1,6 milhão de toneladas. A indústria têxtil brasileira possui quase 200 anos e é referência mundial em design de moda praia, jeanswear e homewear, tendo crescido também os segmentos de fitness e lingerie.

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura química (antraquinona, azo e etc.) ou conforme o método o qual ele é fixado à fibra têxtil (CERQUEIRA, 2006).

Os corantes são moléculas estáveis, pertencentes as classes dos compostos orgânicos com grupos aromáticos complexos, sendo assim de difícil biodegradação. São classificados pela estrutura química e solubilidade, os solúveis em água são os mais difíceis de serem eliminados (CARDOSO, 2010).

Um corante amplamente utilizado na indústria têxtil é o azul de metileno, classificado como um corante do tipo básico, possuindo estrutura molecular aromática heterocíclica, com fórmula química  $C_{16}H_{18}N_3SCl$  e massa molar de 319,8 g/mol. (JORGE et al., 2015).

O azul de metileno ou azul básico 9 trihidratado (Quadro 1), possui classificação color index 52015, sendo um corante orgânico heteroaromático, facilmente solúvel em água (SILVA, 2005).

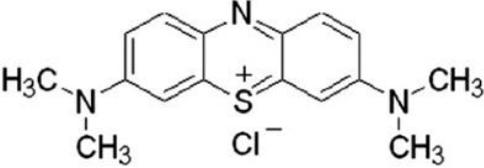
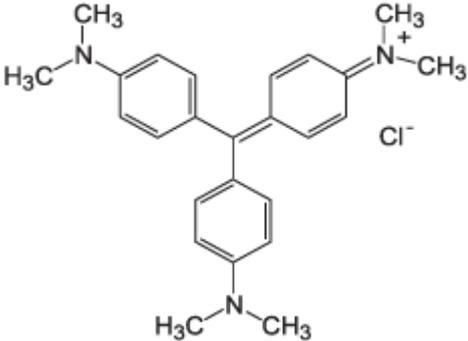
É um corante catiônico, e possui uma variedade de aplicações, como no tingimento de algodão, lãs, poliésteres, nylons, papel e tinturas temporárias para cabelos. Devido à sua forte adsorção em suportes sólidos, o azul de metileno, muitas vezes, serve como um composto modelo para a remoção de corantes e de contaminantes orgânicos a partir de soluções aquosas (FABRÍCIO et al., 2010; LIU et al., 2012).

O aquecimento do azul de metileno pode gerar óxido de enxofre e óxido nítrico, compostos que causam efeitos toxicológicos em organismos aquáticos, além de interferir na qualidade da água, segundo a FISPQ – Ficha de Informações de Segurança e Produtos Químicos (2013).

Os processos de produção de viscose/elastano, algodão e poliéster são os que mais consomem água, devendo, portanto, ter prioridade no gerenciamento hídrico em todos os processos (GOUVEIA, 2014).

Outro exemplo é o corante cristal violeta (Quadro 1) também conhecido como violeta básico 3, violeta genciana e violeta de metila 10B, pertence ao grupo dos triarilmetanos, é catiônico e pode ser usado para diversos fins: indicador de pH; ingrediente ativo na coloração de Gram; agente bacteriostático; desinfetante da pele em seres humanos e animais; e como corante roxo para têxteis tais como algodão e seda, e em tintas de impressão, tendo absorvância variável e dependente do pH do meio (MITTAL et al., 2010, GÓES, 2013).

**Quadro 1** – Propriedades e estruturas químicas dos corantes reativos utilizados

Corante	Estrutura Química	Propriedades
Azul de metileno		Massa molecular: 373,91 $\text{g.mol}^{-1}$ Classe química: fenotiazinas
Cristal violeta		Massa molecular: 408 $\text{g.mol}^{-1}$ Classe química: básico

Fonte: BARANCELLI et al. (2005); FERREIRA-LEITÃO et al. (2007); SANTOS et al. (2005) e BERTOLINI E FUNGARO (2011).

### 2.3 - Impacto ambiental dos corantes têxteis

Nas últimas décadas, os problemas ambientais têm se tornado cada vez mais críticos e frequentes, principalmente devido ao crescimento populacional e ao aumento da atividade industrial, sendo que o setor têxtil apresenta um especial destaque, devido a seu grande parque industrial instalado gerar grandes volumes de efluentes, os quais, quando não corretamente tratados, podem causar sérios problemas de contaminação ambiental (KUNZ et al., 2002).

Mundialmente, a presença de corantes em efluentes tornou-se uma das principais fontes de graves problemas de poluição devido à maior demanda por produtos têxteis e ao aumento proporcional da produção e aplicações de corantes sintéticos (SANTOS et al., 2007).

A contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna; no qual, o setor têxtil apresenta especial destaque, devido à suas instalações gerarem grandes quantidades de efluentes, os quais quando não adequadamente tratados, podem causar sérios problemas ao meio natural (FLECK, 2011).

Indústrias têxteis geram milhões de litros de efluentes não tratados por dia, que são diretamente descartados em recursos hídricos, como rios e lagos. Isto altera o pH, aumenta a demanda bioquímica do oxigênio (DBO) e a demanda química do oxigênio (DQO) e gera uma coloração intensa (TELKE et al., 2010).

Os resíduos da indústria têxtil e da tintura desempenham um papel significativo na poluição da água, pois a descarga destes efluentes em sistemas aquáticos causa a formação de aminas aromáticas tóxicas em condições anaeróbias além de ter efeito adverso em termos de demanda química de oxigênio no canal receptor (ARUMUGAN e SIVAKAMI, 2016).

Os corantes sintéticos se enquadram na categoria de poluentes emergentes, que são definidos como qualquer substância química que não foi incluída em programas de monitoramento, nem em legislação pertinente a qualidade ambiental, mas estão constantemente sendo introduzidas no ambiente devido às atividades antrópicas (HORVAT et al., 2012).

Durante a produção e consumo, cerca de 10% dos corantes das indústrias têxteis são descartados em efluentes, causando diversos problemas ambientais (GHAZI MOKRI et al., 2015).

Conforme Guaratini e Zanoni (2000), efluentes provenientes da indústria de corante ou de processos envolvendo tingimento têxtil não tratados corretamente antes de serem lançados em águas naturais são a preocupação ecológica mais emergente, pois corantes altamente insolúveis, os quais requerem uma baixa solubilidade no processo de aplicação apresentam menor biodisponibilidade do que outros corantes contendo grupos sulfônicos, os quais aumentam a solubilidade, embora apresentem resíduos tóxicos na água de lavagem devido à menor fixação.

A alteração da intensidade da cor do efluente ocasionada pelo aumento da concentração dos corantes restringe sua transparência (diminuição a penetração da luz) e assim, prejudica na atividade fotossintética, por exemplo, os corantes básicos possuem alta intensidade de cores e são muito visíveis mesmo presentes em baixas concentrações, assim, alguns corantes podem ser tóxicos ou carcinogênicos ((YAGUB et al., 2014; ABER et al., 2009).

## 2.4 - Biodegradação de corantes por microrganismos

A grande motivação de todos os pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação pode ser expressa pela busca contínua de microrganismos versáteis, capazes de degradar de maneira eficiente um grande número de poluentes a um baixo custo operacional. Na prática, sabe-se que isto é muito difícil principalmente em função da diversidade, concentração e composição de espécies químicas presentes em cada efluente (KUNZ et al., 2002).

Métodos bioquímicos, como a biossorção com algas, plantas e fermento de padaria são formas alternativas para tratar águas residuais. Mas, tal como os métodos físico-químicos, métodos biológicos deixam uma grande quantidade de biossorbentes de resíduos que para ser tratado após sorção (ROBINSON et al., 2001; VILAR et al., 2007; OFOMAJ, 2007; PONNUSAMI et al., 2008; YU et al., 2009).

Os processos biológicos ganharam mais enfoque recentemente por serem economicamente viáveis e por resultarem em produtos pouco poluentes (RIBEIRO, 2013).

No tratamento de efluentes como corantes, a utilização de microrganismos como bactérias, algas e fungos tem sido muito empregada (ARUMUGAN e SIVAKAMI, 2016). Especialmente para efluentes têxteis, alguns estudos têm sido realizados explorando a capacidade de fungos para degradar e mineralizar corantes (KUNZ et al., 2002).

Os fungos podem desempenhar um papel importante na degradação de materiais orgânicos e têm o potencial para a remediação de solos contaminados e de água (ARUMUGAN e SIVAKAMI, 2016).

O uso das algas na recuperação de efluentes apresenta vantagens, como o baixo custo da operação e a alta eficiência na remoção dos poluentes de efluentes muito diluídos, contudo é necessário analisar o comportamento do microrganismo particular, as características do sistema aquático e da interação contaminante com a alga para avaliar a eficácia do seu uso como ferramenta na recuperação do ecossistema (KAPOOR e VIRARAGHAVAN, 1998; YAN e VIRARAGHAVAN, 2001).

#### 2.4.1 - Biodegradação por bactérias

O tratamento biológico constitui-se em uma tecnologia onde se emprega microrganismos com a finalidade de degradar completamente os contaminantes do efluente ou de reduzir os contaminantes e gerar um efluente de acordo com a legislação, o foco em bactérias tem chamado a atenção devido à sua capacidade de degradar corantes estruturalmente complexos (FABRÍCIO et al., 2010; SHAH, 2016).

A descoloração bacteriana foi associada ao envolvimento de enzimas de óxido-redução, incluindo lacase, azoredutase e NADH-DCIP redutase (KALME et al., 2007). A utilização de bactérias, como *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp. tem sido reportadas na degradação de corantes. Estes microrganismos são particularmente úteis para degradação de azocorantes, pois tem a capacidade de realizar a clivagem redutiva nas ligações azo deste tipo de composto, fato este que geralmente está associado a enzima azoredutase (KUNZ et al., 2002).

Segundo Walker e Wetherley (2000), o emprego de bactérias aeróbias, tais como *Bacillus gordonae*, *Bacillus benzeovorans* e *Pseudomonas putida*, obtiveram resultados na descoloração do corante ácido antraquinona Tectilon Blue, utilizado no tingimento de carpetes. Chen et al. (2003) relataram a capacidade de *Aeromonas hydrophila* na remoção de cor de vários corantes.

Para a biodegradação do corante azul de metileno, o *Geobacillus stearothermophilus* surgiu como um microrganismo de características biotecnologicamente, tal bactéria pertence à nova classificação dos microrganismos da família *Bacillae*, sendo gram-positiva, termofílica e halofílica além de ter uma excelente capacidade de produção de biossurfactante, com estabilidade em condições adversas de pH, temperatura e salinidade e grande redução de tensão superficial (PAZ, 2005; FABRÍCIO et al., 2010).

A degradação bacteriana envolve uma etapa enzimática onde ocorre a clivagem das ligações azo a partir de uma enzima azoredutase e um doador de elétron. Os produtos resultantes, como, algumas aminas aromáticas podem ser degradadas pelas enzimas hidroxilase e oxigenasse, produzidas por essas bactérias (TAN et al., 2006).

Por exemplo, se o processo de biodegradação por bactérias aeróbias for totalmente eficiente, ou seja, capaz de degradar 100 % do corante dessa solução de

rejeito, o produto final desse processo, seria gás carbônico e água, ou seja, produtos de baixo potencial poluente relativo (SANTOS et al., 2016).

### 3 - OBJETIVOS

#### 3.1 - Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em avaliar a capacidade de bactérias isoladas de cupim na degradação de corantes utilizados por indústrias têxteis.

#### 3.2 - Objetivos específicos

- Selecionar isolados bacterianos que apresentam potencial degradação dos corantes azul de metileno e cristal violeta;
- Determinar o potencial de degradação dos corantes têxteis;
- Avaliar a produção de lacase pelos isolados bacterianos;
- Analisar microtoxicidade da solução tratada e não tratada do corante têxtil por meio de ensaios com *Escherichia coli* e *Salmonella* sp;
- Analisar fitotoxicidade da solução tratada e não tratada do corante têxtil por meio de ensaios com *Lactuca sativa*.

## **4 - METODOLOGIA**

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LaMBA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Londrina.

### **4.1 - Isolados bacterianos**

Este trabalho utilizou quatro isolados bacterianos denominados de CA, A5, A7 e A8. Os isolados fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LaMBA), e foram caracterizados quanto a produção de lacase. As células encontram-se armazenadas em glicerol à - 20°C.

### **4.2 - Reativação dos isolados**

A reativação das células foi realizada pelo inóculo de 30 µL da solução estoque em glicerol em 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion - NEOGEN Corporation). Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas, ou até a turvação do meio.

### **4.3 - Determinação da atividade de lacase**

As colônias selecionadas foram cultivadas em BHI caldo, incubadas sob a 37°C, por 24 h sob agitação de 180 rpm. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 9.000 rpm por 20 min, e o sobrenadante foi recolhido e utilizado como enzima extracelular bruta (SHEIKHI et al., 2012).

A atividade da lacase foi determinada usando o ABTS ((ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) como substrato (MONGKOLTHANARUK et al., 2012). A mistura reacional consistiu de 0,5 mL de ABTS (5 mM) dissolvido em 100 mM de tampão acetato (pH = 6,2) e 0,5 mL de enzima extracelular bruta. A oxidação do ABTS foi monitorada por um aumento na absorbância a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36.000 / \text{M cm}$ ). Uma unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de ABTS / min. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

#### **4.4 - Preparo do corante têxtil**

A solução estoque do corante azul de metileno (IMPEX) foi preparada na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> e do corante cristal violeta (LABORCLIN) 0,1 mg L<sup>-1</sup>, ambos em água ultrapura estéril. As soluções foram filtradas em membranas de poliestireno descartáveis com porosidade 0,22 µm (Millyipore®). A concentração final dos corantes empregados nos ensaios foi de 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> para o azul de metileno, já para o cristal violeta 0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup>.

#### **4.5 - Obtenção dos espectros ultravioleta visível**

Os espectros ultravioleta visíveis dos corantes foram obtidos através de varredura espectral em espectrofotômetro (Libra - Biochrom - s60), conforme descrito por SANTOS (2011). Os testes foram realizados em duplicata.

#### **4.6 - Testes de estabilidade em função do meio de cultura**

Após a varredura espectral, testou-se a estabilidade do corante em meio de cultura. Para tanto, as concentrações testadas foram misturadas com meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion – NEOGEN Corporation). Após a homogeneização as soluções foram submetidas novamente à varredura espectral.

#### **4.7 - *Screening* em cultura sólida**

Após reativação, os isolados bacterianos foram semeados na superfície de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion – NEOGEN Corporation) acrescido de concentrações crescentes dos corantes: 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> para o azul de metileno; 0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup> para o cristal violeta. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, sendo observada alterações na coloração das colônias ou descoloração do meio. Os isolados que apresentaram indicativos de potencial descoloração dos corantes testados foram submetidos aos testes em cultura líquida.

#### **4.8 - Tratamentos de biodescoloração e bioissorção**

O tratamento de biodegradação e bioissorção foi conduzido com os isolados selecionados no item 4.6. Os ensaios de descoloração foram realizados conforme protocolo descrito por KONISHI et al. (1997), com modificações. Em um volume de

150 mL de caldo BHI, em frascos de 250 mL de capacidade, acrescentou-se o corante na concentração de estudo. Posteriormente, foi acrescido 1% (v/v) do inóculo do isolado-teste em concentração celular de  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Os frascos permaneceram mantidos protegidos da luz, sob agitação de 180 rpm em shake orbital por 48 horas. Em seguida, alíquotas de 25 mL do sobrenadante nos intervalos de 0, 24, 48 e 48 horas foram retiradas e centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos para a análise de descoloração em espectrofotômetro UV/VIS, através da diminuição da absorbância (ABS).

A leitura foi realizada no comprimento de onda específico para cada corante (determinada nas análises anteriores), seguindo a metodologia descrita por Eichlerova *et al.*, 2007. A eficiência de descoloração foi obtida usando-se a seguinte fórmula (Equação 1):

$$\text{Equação 1 - Eficiência de descoloração}$$

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

Fonte: EICHLEROVA *et al.* (2007).

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

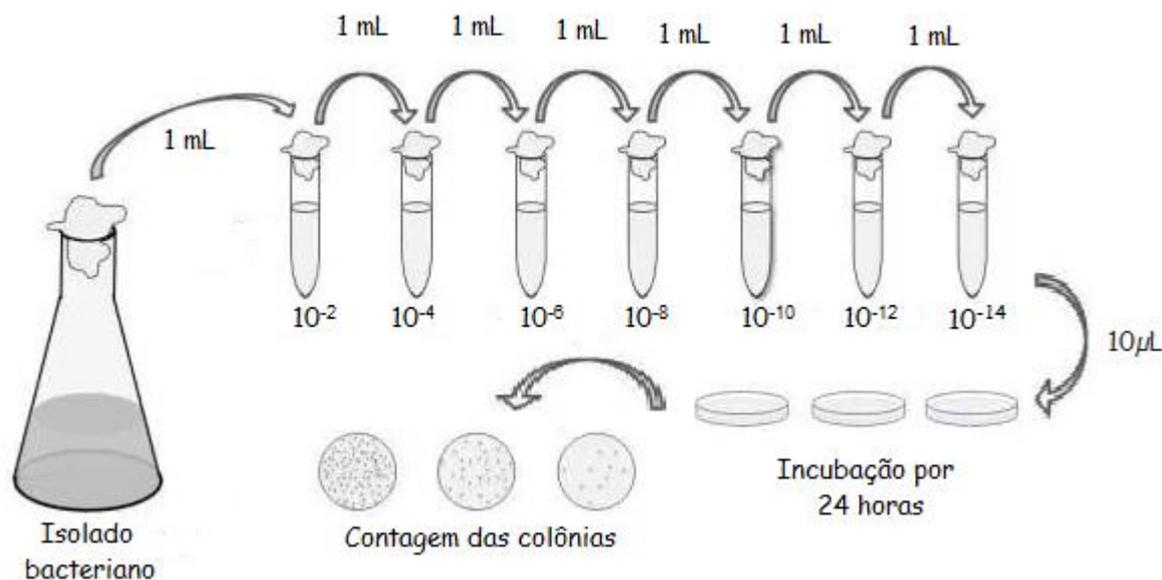
Nos testes de bioadsorção verificou-se pela análise visual da cor do sedimento celular após a centrifugação.

Frascos controle, sem o microrganismo, foram mantidos nas mesmas condições. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sob condições controladas.

#### 4.9 - Contagem do número celular

Para contagem do número celular, colocou-se em tubos de ensaio 9,0 mL de água destilada e 1,0 mL do isolado bacteriano, procedendo assim sucessivas diluições. Posteriormente, 0,1 mL de cada diluição foi semada em ágar BHI (Brain Heart Infusion – NEOGEN Corporation) em duplicata, as placas foram incubadas à 37°C por 24 horas, com as alíquotas de 0, 24 e 48 horas dos testes em meio líquido. Deste modo, procedeu-se a contagem das colônias formadas (Figura 1).

**Figura 1** - Diluição para contagem das unidades formadoras de colônia



Fonte: Autoria própria.

## 4.10 - Teste ecotoxicológico

### 4.10.1 - Fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa* em placa

A toxicidade da solução tratada e não tratada foi estimada por ensaio com raízes de alface *Lactuca sativa*, por serem ecológica e economicamente viáveis, além de serem de fácil obtenção (ANDRADE, 2010). Dez (10) sementes de alface foram depositadas sobre papel de filtro umedecido com 5 mL da solução tratada e não tratada dos corantes. Os testes foram realizados em duplicata. Como controle negativo utilizou-se água destilada estéril. Os experimentos foram conduzidos durante 7 dias (Anexo).

Após este período, foram mensurados de crescimento médio das raízes (cm), Índice Relativo de Crescimento (ICR) e Índice de Germinação (IG). O grau de toxicidade da amostra foi avaliado pelo índice de germinação (IG), que é a relação entre o comprimento médio das sementes, expressado pelo Índice de Crescimento Relativo (ICR) e a média de sementes que germinaram.

O ICR é o crescimento médio da radícula no período do experimento. Segundo a ASTM (2003), para um índice de germinação ser considerado como ótimo, deve possuir valores acima de 55%. O índice de crescimento da radícula é dado pela Equação 2 e o índice de germinação é dado pela Equação 3 (OLIVEIRA et al., 2010).

**Equação 2** - Índice de crescimento da radícula

$$ICR = \frac{CRA}{CRC}$$

Fonte: OLIVEIRA et al. (2010).

**Equação 3** - Índice de germinação

$$IG = ICR \times \frac{SGA}{SGV} \times 100$$

Fonte: OLIVEIRA et al. (2010).

Onde: CRA – é o crescimento da radícula na amostra; CRC – é o crescimento da radícula no controle negativo; SGA – é o número de sementes que germinaram na amostra; SGC – é o número de sementes que germinaram no controle.

**4.10.2 - Fitotoxicidade com *Lactuca sativa* em substrato**

Os testes de fitotoxicidade foram conduzidos para avaliar a toxicidade do tratamentodo corante tratado em sementes de *L. sativa*. Os testes de fitotoxicidade foram conduzidos utilizando o protocolo sugerido por Ayed et al. (2011). Para tanto, o substrato (terra vegetal) foi distribuído em copos descartáveis de 80 mL e 3 sementes de alface distribuídas a um centímetro de profundidade, com irrigação constante (uma vez ao dia) com solução de corantes tratados e não tratados pelos isolados bacterianos em um período de 14 dias. O ensaio foi mantido a temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas (Anexo).

Para a avaliação de cada tratamento foram contadas as plântulas que germinaram. A toxicidade foi determinada comparando o número de plântulas germinadas dos tratamentos em relação ao controle. Assim como também, foi considerado o tempo de germinação, avaliando o retardamento do crescimento e a fisiologia das mesmas (RAMOS, 2018).

**4.10.3 - Ensaio de microtoxicidade**

Isolados de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. foram utilizados nos testes de verificação de toxicidade nas soluções de corante tratadas e não tratadas. Os isolados foram semeados em meio BHI ágar contendo as mesmas concentrações dos corantes utilizados nos testes de descoloração. Também foi preparado meio de cultura

contendo o corante tratado. As placas foram incubadas a 37°C e o crescimento celular foi observado visualmente (Anexo).

#### **4.11 - Análises estatísticas**

Análise de variância (one-way ANOVA) foi conduzida para avaliar a diferença estatística entre os tratamentos, com valores de  $P < 0.05$ . Foi realizado também o Teste Tukey para comparação das médias.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado deste trabalho será apresentado em forma de artigo científico.

### BIODESCOLORAÇÃO DOS CORANTES AZUL DE METILENO E CRISTAL VIOLETA POR ISOLADOS DE *BACILLUS* E *PSEUDOMONAS* DE ORIGEM AMBIENTAL

#### RESUMO

Grandes quantidades de corantes tóxicos provenientes de efluentes têxteis são descartados em sistema de água natural, levando a alterações na flora e fauna aquática, além de efeitos nocivos ao homem. Diversos processos podem ser utilizados para a remoção destes corantes, contudo, a busca por tecnologias ecologicamente corretas e econômicas é constante. Assim, este trabalho visou testar isolados de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. produtores de lacase na biodegradação de corantes têxteis. Os ensaios foram realizados com 4 isolados bacterianos identificados genotipicamente pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. (isolados A7, A8 e CA) e *Pseudomonas* sp. (A5). Foram testados os corantes (50 e 100 mg L<sup>-1</sup>) e cristal violeta (0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup>) em meio de cultura e incubação de 24 e 48 horas. Todos isolados produziram a enzima lacase nas concentrações de 102 a 110 U.mL<sup>-1</sup> calculado pela oxidação de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico). Todos os isolados apresentaram eficiência na degradação dos corantes, variando de 85% para o corante azul de metileno a 93,14% para o corante cristal violeta. A banda espectral do UV-VIS foi deslocado quando comparado o corante tratado e não tratado pelos isolados bacterianos. Os testes de citotoxicidade utilizando *Escherichia coli* revelou a perda da sensibilidade ao corante, enquanto no teste de fitotoxicidade não houve diferença nos resultados dos corantes tratados quando este foi tratado. Os melhores isolados avaliados nos testes foram os pertencentes ao gênero *Bacillus* sp.

**Palavras chave:** Biodescoloração. Biodetoxificação. Isolados bacterianos. Azul de metileno. Cristal violeta.

#### Introdução

Nas últimas décadas, o uso de corantes sintéticos tem aumentado consideravelmente em diversos setores industriais, como matéria prima na produção

de tintas, alimentos, cosméticos, papel, com destaque para a indústria têxtil (MURUGESAN et al., 2007; SARATALE et al., 2013). Os efluentes têxteis imprópriamente descartados em corpos de água podem afetar as características físico-químicas, e limitando a passagem de radiação solar diminuindo a atividade fotossintética natural, provocando assim alterações na biota aquática e originando toxicidade aguda e crônica desses ecossistemas assim, poluir a meio aquático (DAI et al., 2016; SARATALE et al., 2013).

Azul de metileno é um corante catiônico que possui uma variedade de aplicações, desde tingimento de algodão, lã e papel até tinturas para cabelos (LIU et al., 2012). Além de sua aplicação extensiva, este corante apresenta em sua composição a estrutura da fenotiazina, composto que está presente em anti-histamínicos e antipsicóticos (FABRÍCIO et al., 2010), intensificando seu efeito tóxico causado sobre a biota aquática e aos seres humanos.

O cristal violeta, também conhecido como violeta básico 3, violeta genciana ou violeta de metila 10B, pertence ao grupo dos triarilmetanos e pode ser usado para diversos fins, incluindo a coloração roxo em algodão e seda na indústria têxtil e em tintas de impressão (MITTAL et al., 2010). Segundo Chakraborty (2011), este corante é apontado como cancerígeno e acarreta numerosos danos aos seres vivos.

Diversas técnicas estão disponíveis na literatura para descoloração das águas de rejeito com corantes têxteis, envolvendo principalmente os processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica, fotoquímica, biodegradação, entre outros (YAGUB et al. 2014; WONG et al. 2007; MAHMOODI et al., 2011). Embora estes processos são relativamente eficientes na remoção de vários corantes, sua aplicação não é rentável ou eficiente em termos energéticos (ESLAMI et al. 2019).

Portanto, o uso isolado ou em consórcio de microrganismos específicos para a decomposição de um contaminante é um método biológico que não requer produtos químicos, relativamente eficiente, ecologicamente correto e econômico, quando comparado com demais métodos (OLLER et al., 2011; POPLI e PATEL, 2015; SOLÍS et al., 2012; KHAN et al., 2013; AYED et al., 2011; SARATALE et al., 2011; TAVARES et al., 2009; YANG et al., 2009).

Muitos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras e algas, são capazes de degradar, absorver por biomassa (viva ou morta) e bioacumular diversos tipos de corantes, com eficácia depende de compatibilidade (POPLI e PATEL, 2015; ESLAMI et al., 2019). Diversos isolados bacterianos têm sido reportados como

eficientes degradadores de corantes têxteis, destacando os gêneros *Bacillus* sp. (JAISWAL et al., 2014; LI et al., 2015; KARIM et al., 2018), *Pseudomonas* sp. (KALYANI et al., 2012; SURWASE et al., 2013; BORAN et al., 2019), *Aeromonas* sp. (CHEN et al., 2003), *Citrobacter* sp. (OH et al., 2011), entre outros. Os metabólitos provenientes da degradação bacteriana podem apresentar menor toxicidade quando comparado com a água de efluente não tratada.

Diversos estudos sobre a descoloração e degradação de corantes têxteis têm indicado o envolvimento de várias enzimas extracelulares redutoras, como a azoredutase e enzimas oxidativas, como lacase, tirosinase, lignina e peroxidases de manganês (FU e VIRARAGHAVAN, 2001).

Embora sendo uma metodologia promissora, as exigências metabólicas de microrganismos são complexas, impedindo a sua utilização para a remediação de enorme quantidade de águas residuais de indústrias têxteis, sendo necessário isolamento constante de microrganismos adaptados ao ambiente de isolamento (KARIM et al., 2018).

Dentro desse contexto e baseado no destaque de novas tecnologias o tratamento desse tipo de efluentes têxteis, este trabalho avaliou o potencial de biodegradação dos corantes azul de metileno e cristal violeta, por isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* provenientes do ambiente.

## **Materiais e Métodos**

### **Corante têxtil**

A solução estoque do corante azul de metileno (IMPEX) e cristal violeta (LABORCLIN) foi preparada pela dissolução do corante em água deionizada na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> e 0,1 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e esterilizadas por filtração em membranas de poliestireno 0,22 µm (Millipore®). A concentração final dos corantes empregados nos ensaios foram 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> para o azul de metileno, e 0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup> para o cristal violeta.

### **Varredura espectral dos corantes têxteis**

A varredura espectral para testar a estabilidade do corante em meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion – NEOGEN Corporation) foi realizada em

espectrofotômetro ultravioleta visível em densidade óptica de 200 a 600 nm (Libra - Biochrom S60). Os testes foram realizados em duplicata (SANTOS (2011)).

#### *Screening* bacteriano para degradação de corante

Neste estudo foram analisados 15 isolados bacterianos provenientes de cupins, sendo sugestivos para produção de lacase. Estes isolados pertencem Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LaMBA) da UTFPR. Os isolados foram semeados na superfície de meio de cultura BHI agar acrescido de concentrações crescentes dos corantes: 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> para o azul de metileno; 0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup> para o cristal violeta. As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, sendo observadas alterações na coloração das colônias ou descoloração do meio.

Estes isolados e *Escherichia coli* sensível aos corantes azul de metileno e cristal violeta estavam estocados em glicerol a -20°C.

#### Identificação dos isolados selecionados

Isolados bacterianos capazes de crescer profusamente nas concentrações de corantes azul de metileno e cristal violeta, foram validados como descolorante promissora e foram identificados genotipicamente. Para tanto, o DNA total foi extraído pela técnica da fervura (YOST; NATTRESS, 2000). A identificação genotípica dos isolados foi realizada pela análise do sequenciamento da região 16S do DNA ribossomal. Inicialmente foi realizada a amplificação da região 16S rDNA pela técnica de PCR utilizando o oligonucleotídeo F 27 (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e R 1492 (5' GGTTACCTTGTTACGACTT3'). Todas as reações foram realizadas em termociclador (Biosystems), em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL DNA, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. A condição de hibridação utilizada foi de 55°C por 1 minuto (DEVEREUX; WILLIS, 1995).

Os produtos da amplificação da PCR foram encaminhados para empresa especializada em sequenciamento ATCGene Análises Moleculares LTDA. As sequências geradas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com sequências depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo NCBI ("National Center for Biotechnology Information"). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - "Basic Local Alignment Search Tools".

## Experimento de biodegradação

Os experimentos de biodegradação seguiu metodologia descrita por KONISHI et al. (1997) e Eichlerova *et al.* (2007), com modificações. Para tanto, 150 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) foi adicionado das concentrações de corante descritas anteriormente e o inóculo bacteriano de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A cultura foi incubada no escuro, sob agitação de 180 rpm, a 37°C por 48 horas.

Alíquotas do sobrenadante foram retiradas após 0, 24 e 48 horas de incubação, e as células foram removidas por centrifugação a 6.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro UV/VIS, no comprimento de onda específico para cada corante (determinada nas análises anteriores).

A percentagem de descoloração do corante foi calculada como a fórmula: descoloração (%) =  $[(A_i - A_t) / A_i] \times 100$  onde,  $A_i$ : absorvância inicial do corante,  $A_t$ : absorvância do corante nos intervalos de tempo. Cada experimento de descoloração foi realizado em triplicata e a média das porcentagens de descoloração foram relatadas (ESMAEILI e KALANTARI, 2012).

O controle negativo (reação da mistura sem bactéria) foi realizado como referência para comparar a percentagem de descoloração das amostras tratadas. Cada experimento de descoloração foi realizado em duplicata e a média das porcentagens de descoloração foram relatadas.

A contagem de células foi realizada pela técnica de contagem de unidade formadora de colônia (UFC).

## Determinação da Atividade de Lacase

As colônias selecionadas foram cultivadas em BHI caldo, incubadas sob a 37°C, por 24 h sob agitação de 180 rpm. Em seguida, as células foram removidas por centrifugação a 9.000 rpm por 20 min, e o sobrenadante foi recolhido e utilizado como enzima extracelular bruta (SHEIKHI et al., 2012).

A atividade da lacase foi determinada usando o ABTS como substrato (MONGKOLTHANARUK et al., 2012). A mistura reacional consistiu de 0,5 mL de ABTS (5 mM) em tampão acetato (pH = 6,2) e 0,5 mL de enzima extracelular bruta. A oxidação do ABTS foi avaliada pelo aumento na absorvância DO<sub>420 nm</sub> ( $\epsilon_{420} = 36.000 / M \text{ cm}$ ). Uma unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade de

enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS / min. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### Teste de citotoxicidade

Para os testes de citotoxicidade, o sobrenadante obtido a partir das culturas de meios líquidos contendo corante, após 24 e 48 horas de incubação, foram filtrados através de membrana de poliestireno 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®), e utilizadas nos ensaios toxicológicos. Meio BHI ágar foi preparado com o corante tratado e não tratado, seguido de inóculo de *Escherichia coli* sensível aos corantes azul de metileno e cristal violeta. O crescimento celular foi verificado após incubação de 24 hs a 37°C.

#### Teste de fitotoxicidade

O teste de fitotoxicidade foi realizado com sementes de *Lactuca sativa*, em papel de filtro (SILVA, 2013) e em substrato (terra) (AYED et al., 2011). Solução de corante tratada e não tratada, umedeceram papel de filtro ou serviu de irrigação para 3-10 sementes de alface em substrato. O material foi mantido a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Após o período de exposição, foi observado se as plântulas exibiam algum sinal de crescimento anormal como: ápices radiculares necrosados, pelos absorventes pouco desenvolvidos, radículas com crescimento enrolado, necrose nos cotilédones, etc.), como indicado por Silva (2013). As autoras esclarecem que a necrose é evidenciada por manchas localizadas de coloração parda, branca ou marrom. Em seguida, fez-se a contagem das sementes germinadas, usando como critério de germinação o surgimento visível da radícula, e a medição (mm) de hipocótilos e radículas das plântulas.

#### Análise estatística

Foram aplicados os testes de análise de variância (one-way ANOVA) para avaliar a diferença estatística entre os tratamentos, com valores de  $P < 0,05$  e também os Teste Tukey para comparação das médias.

## Resultados e Discussão

### Identificação e *Screening* de isolados bacterianos degradadores de corantes

A fim de selecionar bactérias descolorantes de corantes têxteis, um total de 15 isolados bacterianos sugestivos de produção de lacase foram rastreadas a partir de inóculos feitos em BHI ágar suplementado com corante azul de metileno e cristal violeta. Baseado em crescimento vigoroso e alteração de coloração da colônia e a presença de uma zona de descoloração ao redor desta, foram selecionados quatro isolados bacterianos designados por CA, A5, A7 e A8.

As características morfológicas dos isolados e a análise comparativa da sequência 16S rDNA mostraram que os isolados estavam próximos aos membros do gênero *Bacillus* (CA, A7 e A8) e *Pseudomonas* (A5), com 48% e 60% de identidade, respectivamente. No entanto, a análise genotípica não foi suficiente para identificar ao nível de espécie.

Durante o processo de triagem, observamos que estes isolados alteraram a cor do corante ao redor da colônia ou da própria colônia. O melhor desenvolvimento dos isolados ocorreu na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> do corante azul de metileno, sendo que após 24 horas de incubação já podia se observar um halo esbranquiçado ao redor da colônia, sendo intensificado e confirmado com 48 horas de incubação, com todos os isolados bacterianos. Já na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> destacaram os isolados CA e A8, apresentando maior desenvolvimento colonial.

Em contrapartida, com o corante cristal violeta observamos maior halo de degradação pelo isolado CA, na concentração de 0,0125 mg/L. Os demais isolados apresentaram as colônias na cor do corante, como se tivessem absorvido a cor do meio.

De acordo com Chen et al. (2003) a perda de cor ao redor da colônia é indicativo de degradação do corante, já a alteração da coloração da colônia é indicativo de processo de absorção. Assim, como nossos isolados mantiveram a cor original da colônia, sugere-se presumivelmente que a descoloração do corante é um processo enzimático de degradação de corantes.

Diversos artigos sugerem o isolamento de bactérias a partir de efluentes têxteis e água contaminada, com potencial para descoloração de corantes (KHADIJAH, LEE & FAIZ, 2009; POKHARIA & AHLUWALIA, 2013). Em nosso trabalho, os isolados foram provenientes de cupim (dados não apresentados), enfatizando que bactérias

provenientes de diversos ambientes apresentam potencial nos processos de biodegradação.

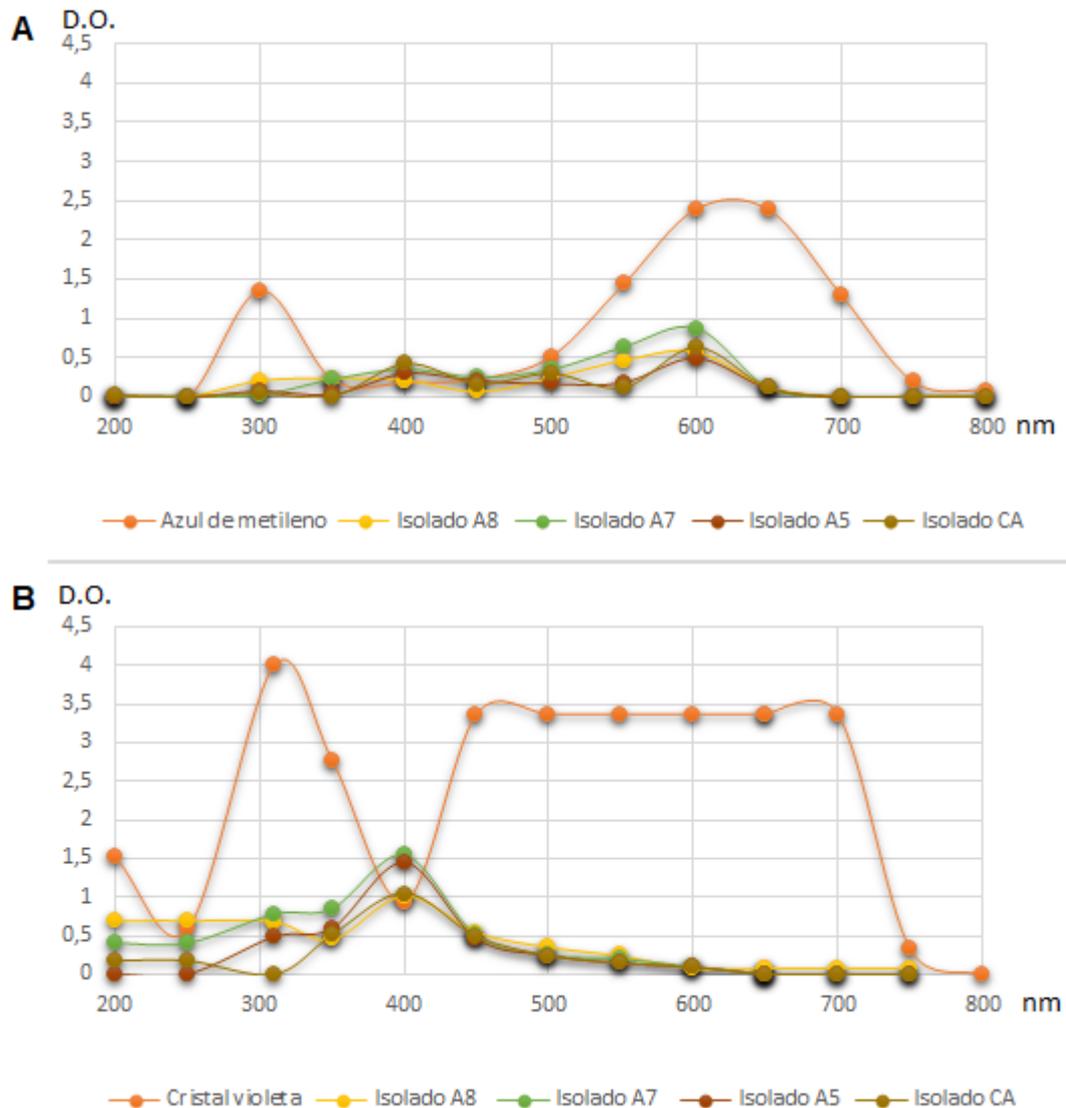
#### Determinação da absorção máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ )

Absorção máxima da mistura de corantes com o meio de cultura BHI foram determinados em meio de descoloração através da digitalização absorção de luz dentro da faixa visível (200 a 1000 nm) em intervalos de 10 nm usando espectrofotômetro UV-Vis. O comprimento de onda que reflete a maior densidade óptica foi considerado como o seu máximo comprimento de onda ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), sendo o  $\lambda_{\text{máx}}$  de 290nm e 630 nm para azul de metileno e 310 nm para cristal violeta, para ambas concentrações de corantes testados 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> para o azul de metileno, e 0,0125 e 0,025 mg L<sup>-1</sup>.

Após o inóculo bacteriano dos isolados de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. no meio de cultura contendo corante, houve alteração na banda espectral (Figura 2), mostrando assim que houve degradação dos corantes azul de metileno ( $\lambda_{\text{máx}}$  600 nm) e cristal violeta ( $\lambda_{\text{máx}}$  400). Ambos corantes (azul de metileno e cristal violeta) são de natureza catiônica.

Os espectros de azul de metileno em soluções diluídas apresentam banda máxima em aproximadamente 670 nm, correspondente à forma monomérica do corante, e em um ombro em torno de 610 nm, corresponde a uma transição do acoplamento vibracional, característico do corante, à medida que a concentração aumenta, aumenta também e de forma gradativa, uma banda em torno de 605 nm, o que corresponde às formas agregadas (NEUMANN et al., 2000).

Já o cristal violeta apresenta vários equilíbrios de protonação, quando o pH está próximo de 7 os átomos de nitrogênio estão desprotonados, pois foram liberados para a solução, situação em que o corante apresenta uma carga positiva, coloração violeta e um máximo de absorção em 589 nm (GÓES, 2013).



**Figura 2**– Curva espectral dos corantes (A) Azul de metileno (100 mg/L) e (B) Cristal violeta (0,025 mg/L) antes e após tratamento de 48 horas com os isolados A5, A7, A8 e CA.

#### Descoloração de corante por *Pseudomonas* e *Bacillus*

A produção de lacase foi mensurada pela oxidação do reagente ABTS em pH 6,5. Todos os isolados apresentaram valores de 102 a 110 U.mL<sup>-1</sup> de lacase. Diversos trabalhos têm mostrado que bactérias produtoras de enzimas lignolíticas tem a capacidade de degradar os corantes de indústria têxtil (KALYANI et al., 2008; 10, 17]. Dentre estas enzimas destaca-se a lacase, por romper anéis aromáticos, presentes na molécula do azul de metileno e no cristal violeta (BARANCELLI et al. (2005); FERREIRA-LEITÃO et al. (2007); SANTOS et al. (2005) e BERTOLINI E FUNGARO (2011), através de duas etapas de transferência de elétrons em na presença de oxigênio molecular (NAGAI et al., 2002).

Abo-State et al. (2011) também associaram o processo de descoloração do meio de cultura com azul de metileno à ação da enzima lacase bacteriana.

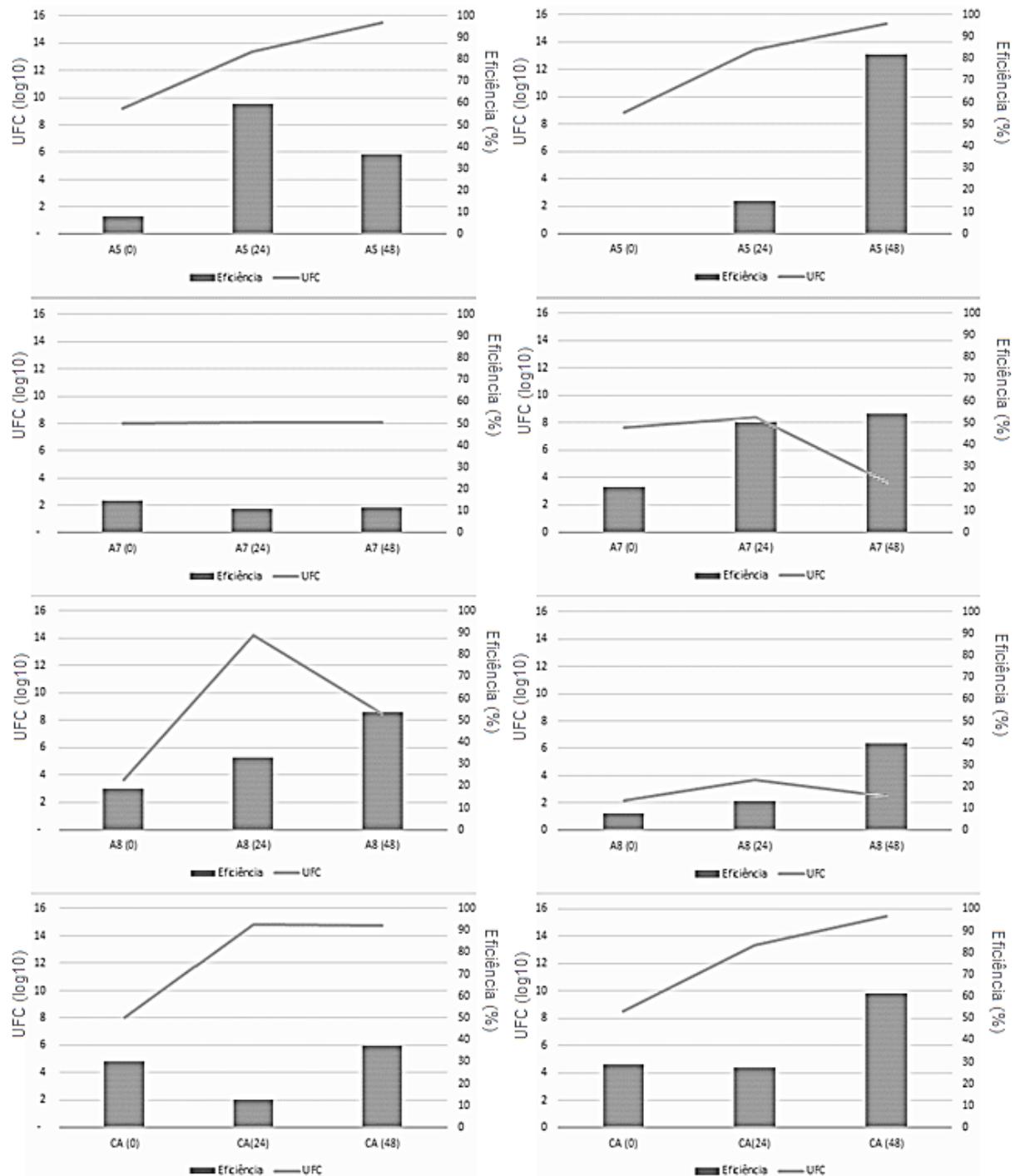
As Figuras 3 e 4 mostram as taxas de remoção dos corantes azul de metileno e cristal violeta, respectivamente, pelos isolados bacterianos em diferentes tempos de incubação sob condições tóxicas.

Para o corante azul de metileno (Figura 3), a melhor eficiência de remoção de todos os isolados testados foi após 48 de incubação na maior concentração do corante ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Destaque dado ao isolado A5 que apresentou 85% de remoção do corante após 48 horas e ao isolado A7 que apresentou eficiência próximo de 50% com 24 horas de incubação. Ressaltamos que para os isolados A7, A8 e CA já apresentaram percentuais de remoção do corante após adição do próprio microrganismo, no tempo zero. Estes dados podem refletir a presença de lacase proveniente do meio de cultura, ou absorção do corante pela própria célula bactéria (viva ou morta).

Era esperado que a maior eficiência de descoloração ocorresse com a menor concentração de corante ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), contudo essa eficiência não foi observada. Esse fato foi confirmado pela diferença significativa entre as eficiências de remoção de corante em diferentes concentrações ( $p < 0,001$ ).

Pela análise estatística, o melhor isolado foi o A5, considerando-se o corante em ambas as concentrações, com eficiência de 60% para 50 mg/L e 82% para 100 mg/L.

Os valores de UFC corroboraram com a eficiência de descoloração para os isolados A5 e CA, para os demais isolados e concentrações de corantes não houve correlação no crescimento populacional celular com o percentual de remoção. Ainda, alguns isolados, como A7 e A8 apresentaram um decréscimo no crescimento celular após 24 horas de incubação. Este fato pode estar relacionado à ligação do corante à sítios aniônicos da membrana bacteriana, substituindo os cátions divalentes, e danificando a parede celular, afetando o crescimento e desenvolvimento dos isolados (LIU E SUN, 2008).

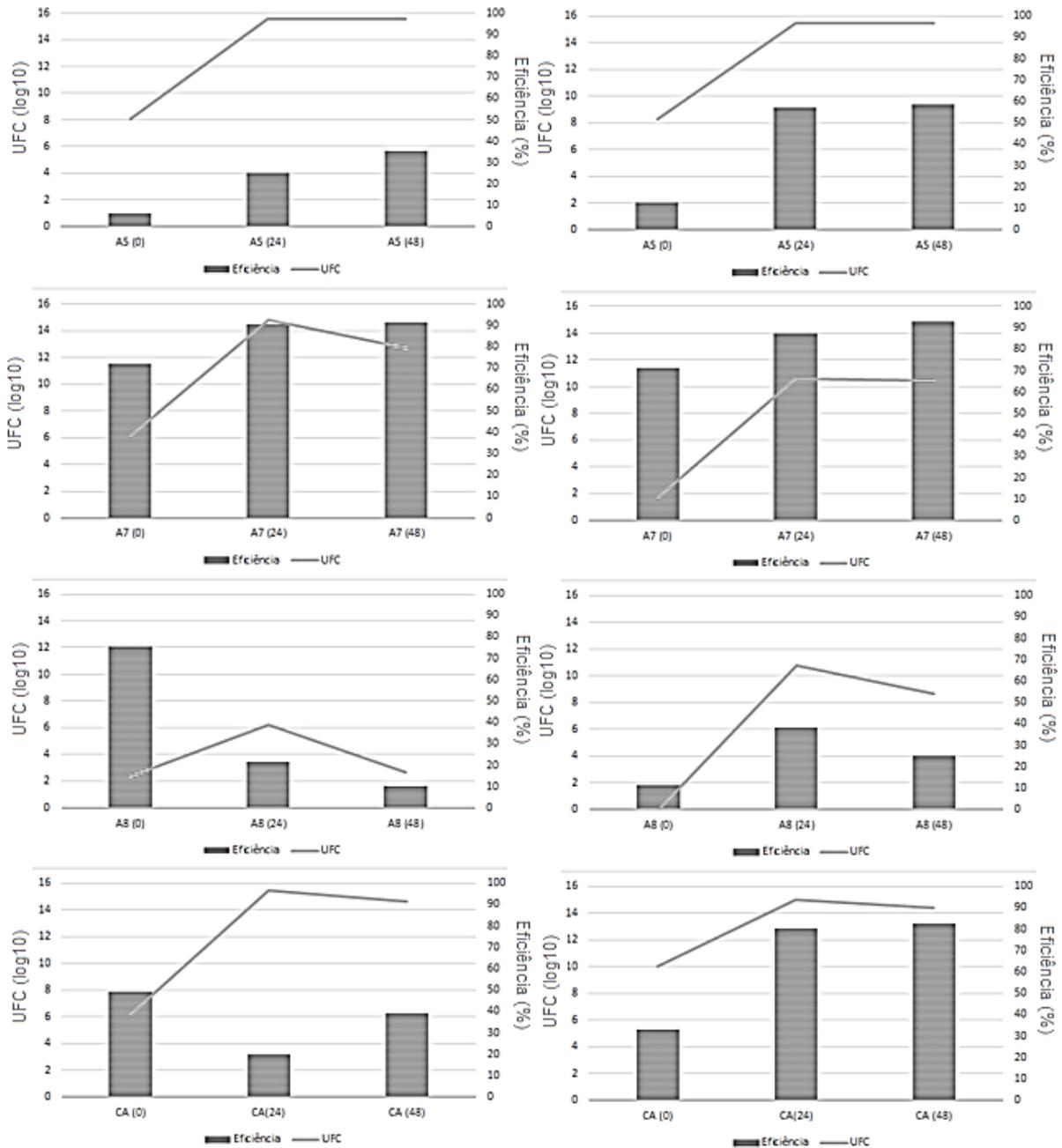


**Figura 3** – Taxa de descoloração dos isolados bacterianos dos gêneros *Bacillus* (CA, A7 e A8) e *Pseudomonas* (A5) e contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) em 0, 24 e 48 horas nas concentrações de 50 (esquerda) e 100 (direita) mg/L do corante azul de metileno.

A Figura 4 apresenta a eficiência de descoloração dos isolados testados frente ao corante cristal violeta nas concentrações de 0,0125 e 0,025 mg/L. Os isolados apresentaram comportamento semelhante ao corante azul de metileno, onde a maior taxa de eficiência ocorreu na maior concentração de corante. Exceção ao isolado A7, que apresentou boa eficiência também na menor concentração do agente químico.

O crescimento microbiano também foi semelhante, ou seja, a quantidade de célula não está correlacionada à eficiência de degradação do corante. Ainda, o tempo zero apresentou boa eficiência para os isolados A7, A8 e CA, dependendo da concentração do corante textil. Para a concentração de 0,0125 mg/L os isolados A7 e A8 também apresentaram melhores resultados, com  $P < 0,01$  e para a concentração de 0,025 mg/L foram os isolados A7, A8 e CA. No Teste Tukey o isolado A7 se destacou, com eficiência de 91,28% para 0,0125 mg/L e 93,14% para 0,025 mg/L.

O crescimento bacteriano é um processo complexo associado a várias reações anabólicas e catabólicas, resultando em divisão celular (ROY et al., 2018). Como a hipótese da taxa de crescimento prevê correlações positivas entre o conteúdo de RNA, conteúdo de fósforo e biomassa, essas relações têm sido usadas para assumir padrões de atividade microbiana e reciclagem de nutrientes (FRANKLIN et al., 2011).



**Figura 4** – Taxa de descoloração dos isolados bacterianos dos generos *Bacillus* (CA, A7 e A8) e *Pseudomonas* (A5) e contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC) em 0, 24 e 48 horas nas concentrações de 0,0125 (esquerda) e 0,025 mg/L (direita) mg/L do corante cristal violeta.

O efeito da concentração de corante no crescimento desempenha um papel importante na escolha dos microrganismos a serem usados na biorremediação de águas residuais de corantes, por exemplo, altas concentrações podem reduzir a eficiência de degradação devido ao efeito tóxico dos corantes (KHEHRA et al., 2006). Além disso, a concentração inicial de corante fornece uma força motriz essencial para

superar toda a resistência de transferência de massa do corante entre as fases sólida e aquosa (PARSHETTI et al., 2006).

Segundo Ayed et al. (2011), a descoloração de 500 mg.L<sup>-1</sup> de cristal violeta por *Bacillus* sp. foi completa após 2,5 h de incubação, diminuindo consideravelmente em concentrações maiores. A capacidade de remoção do corante também afetada pelo tamanho do inóculo bacteriano, onde ocorreu 100% de degradação quando se utilizou 10% de inóculo. Zabłocka-Godlewska, Przystaś e Grabińska-Sota (2015) também relacionaram a eficiência da descoloração do corante verde brilhante com o aumento do inóculo de *Klebsiella*. Contudo, esses dados contradizem aos observados em nossos resultados, onde as concentrações maiores de corante teve melhores resultados de eficiência de descoloração, *i.e.*, a eficiência da remoção do corante não foi afetada nem pela concentração nem pelo tamanho do inóculo de *Bacillus* e *Pseudomonas*. Ainda, os isolados do gênero *Bacillus* foram os que melhor apresentaram resultados, corroborando com estudos desenvolvidos por Dawkar et al. (2008) e Cheriaa et al. (2012), onde sugerem que este gênero bacteriano é um bom indicador de descoloração, podendo ser eficaz no tratamento de efluentes têxteis.

O efluente têxtil é uma mistura de vários corantes, portanto, é necessário explorar a capacidade dos isolados de descolorir misturas de corantes. Nossos resultados mostraram que os isolados de *Bacillus* sp. A7, A8 e CA foram os que apresentaram resultados promissores em relação à degradação dos corantes cristal violeta e azul de metileno.

A diminuição na absorvância ou desaparecimento do pico de absorvância no  $\lambda_{\text{máx}}$  do corante é indicativo de biodegradação devido ao metabolismo microbiano (NOVOTNY, 2004). Este fato foi confirmado em nosso estudo, onde as bandas espectrais dos corantes azul de metileno e cristal violeta deslocou e diminuiu a absorvância após o processo de biodegradação (Figura 2). Todos os isolados testados induziram ao mesmo perfil espectral dos corantes, corroborando com os dados obtidos no percentual da taxa de descoloração.

#### Teste de citotoxicidade e fitotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado com isolados previamente selecionados quanto a sensibilidade aos corantes azul de metileno e cristal violeta. A bactéria *Escherichia coli* apresentou-se sensível aos corantes não tratados presente no meio de cultura. Já, quando utilizamos os corantes após tratamento com os isolados de

*Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., obtivemos crescimento de *E. coli* em todos os tempos e concentrações testadas. Esses dados e os valores de varredura espectral dos corantes tratados, intensificam nossos resultados de que houve a degradação dos corantes, com alteração de sua estrutura molecular, tornando-se menos citotóxico.

Contudo, não obtivemos resultados satisfatórios nos testes de fitotoxicidade, quanto à avaliação de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*), em nenhum das metodologias testadas. Uma hipótese é que o tamanho pequeno e massa das sementes refletem em baixa quantidade de endosperma disponível, mecanismo que é responsável pela resistência de germinação em condições não favoráveis (RIBEIRO, 2013).

O grau de toxicidade e efeitos carcinogênico dos corantes têxteis é ocasionado pelo fato que é comum a fabricação com base em agentes cancerígenos, bem como benzidina, naftaleno e demais compostos aromáticos (NASCIMENTO et al., 2011). Sobrero e Ronco (2008) explanam que efeitos tóxicos de certos corantes sobre estrutura vegetal, pode inibir a germinação ou causar alterações ao nível cromossomal.

Demais estudos são necessários, principalmente para verificar a toxicidade com relação à descoloração, porque os materiais descorados podem permanecer tóxicos, a menos que o produto permaneça nas células (PANDEY e UPADHYAY, 2010).

## **Conclusão**

Concluimos que a utilização de bactérias para o tratamento de efluentes têxteis contaminados com o corante azul de metileno e cristal violeta além de ser uma solução promissora, possui eficiência, baixo custo e biodegradação/biodescoloração rápida. Foram identificados por PCR 4 isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., apresentando taxas máximas de descoloração de 93,14%. A quantificação da enzima lacase não influenciou na maior taxa de descoloração, mostrando que esse processo é isolado-dependente. Todos os isolados testados mostraram resultados positivos, apresentando potencial utilização no tratamento de efluentes têxteis.

## 6 - CONCLUSÃO GERAL

Após a avaliação da degradação e descoloração, pode-se concluir que a utilização de microrganismos, como os isolados bacterianos produtores de lacase A5, A7, A8 e CA é uma alternativa viável por apresentar eficiência comprovada em um período de 48 horas, mostrando-se promissores na aplicação em efluentes têxteis com corantes azul de metileno e cristal violeta e deste modo barateando o processo no tratamento para o atendimento das legislações ambientais vigentes.

Na análise de fitotoxicidade da solução tratada e não tratada dos corantes têxteis com os ensaios de alface *Lactuca sativa* os resultados mostraram que ambos corantes permaneceram tóxicos, pois houve crescimento das sementes apenas nos controles os quais eram regados com água destilada;

Quanto a microtoxicidade da solução tratada e não tratada pelos corantes azul de metileno e cristal violeta por meio de ensaios com *Escherichia coli* mostrou sensibilidade em ambos corantes não tratado e resistência aos corantes em todas as concentrações testadas, quando submetida as soluções tratadas pelos isolados bacterianos A5, A7, A8 e CA, deste modo comprovando que após tratamento confirmou-se a não citotoxicidade.

De acordo com as análises estatísticas o isolado que melhor se adaptou com o corante têxtil azul de metileno para as concentrações testadas foi o isolado bacteriano A5 e para o corante cristal violeta foi o isolado A7, contudo os outros isolados também mostraram eficiência na degradação e descoloração dos corantes.

## REFERÊNCIAS

ABER, S; AMANI-GHADIM, A R; MIRZAJANI, V. Removal of Cr (VI) from polluted solutions by electrocoagulation: Modeling of experimental results using artificial neural network. **Journal of hazardous materials** v. 171, n. 1–3, p. 484–490, nov. 2009.

ABIQUIM. Associação Brasileira de Indústria Química. **Corantes e Pigmentos**. 2009. Disponível em <<http://www.abiquim.org.br/corantes/cor.asp>> Acesso em 10 out. 2018.

ABIT. **Têxtil e confecção**. 2018. Disponível em <<https://www.abit.org.br/cont/perfil-do-setor>> Acesso em 09 jul. 2019.

ABO-STATE, M. A. M; KHATAB, O.; NASAR, A.A. **Factors affecting laccase production by Pleurotus ostreatus and Pleurotus sajor-caju**. Applied Sciences Journal, 14:1607-1619, 2011.

ALÉM SOBRINHO, P.; TUNUSSI, J. L. **Tratamento de efluente de indústria têxtil contendo corantes tipo AZO-uso de reator UASB e lodo ativado para remoção de cor e nitrificação**. Anais. Joinville, Santa Catarina: ABES, 2003.

ALI, H. **Biodegradation of sunthetic dyes – A review**. Water, Air, and Soil Pollution, Vol. 213, No. 1-4, Pág. 251-273, 2010.

ANDRADE, V. T. ANDRADE, B. G., COSTA, B. R. S., PEREIRA, O. A., DEZZOTTI, M. **Toxicity Assessment of Oil Field Produced Water Treated By Evaporative Processes to Produce Water to Irrigation**. Water Science and Technology, v.62, n.3, p.693-700, 2010.

ARUMUGAN, V.; SIVAKAMI, R. **Treatment of Dye Industry Effluent Using Immobilized Bacteria and Fungi Isolated from Freshwater Pond Thiruvapur District, Tamil Nadu, India**. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, Vol. 5, No. 6, Pág. 596-605; 2016.

ASTM E 1963-02. **American Society for Testing and Materials, Standard Guide For Conducting Terrestrial Plant Toxicity Test**. 1ª ED. USA. 2003.

AYED, L; MAHDHI, A.; CHEREF, A.; BAKHROUF, A. **Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated Sphingomonas paucimobilis: Biototoxicity and metabolites characterization**. Desalination. 274 (2011) 272-277.

BANAT, I.M; NIGAM, P; SINGH, D; MARCHANT, R. **Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A Review**. Bioresource Technology, vol. 58, p.217- 227, 1996.

BARANCELLI, G. T.; HOFFMANN, A. A.; DIAS, S. L. P. **Estudo voltamétrico do corante azul de metileno imobilizado na superfície de acetato de celulose modificado quimicamente com óxido de titânio**. Ciências exatas e da natureza. UFRGS, 2005.

BARJASTEH-MOGHADDAM, M.; HABIBI-YANGJEH, A. J. (2011). **Effect of operational parameters on photodegradation of methylene blue on ZnS nanoparticles prepared in the presence of an Ionic liquid as a highly efficient photocatalyst.** *Iran Chem Soc* 8: S169–S175.

BARCELLOS, I. O. **Química Têxtil II.** 183 p. Blumenau, 2004.

BELTRAME, L. T.C. **Caracterização do efluente têxtil e proposta de tratamento.** 2000. 179 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2000.

BERTOLINI, T. C. R.; FUNGARO, D. A. **Estudos de Equilíbrio e Modelagem Cinética da Adsorção do Corante Cristal Violeta sobre Zeólitas de Cinzas Leve e Pesada de Carvão.** 3<sup>rd</sup> International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, 2011.

BORAN, F.; BIRHANLI, E.; YEŞILADA, Ö.; ÖZBEY, E. **Comparison of indigo carmine decolorization by *Pseudomonas aeruginosa* and crude laccase enzyme from *Funalia trogii*.** *Turk J Biol.* 2019 Feb 7;43(1):37-46. doi: 10.3906/biy-1807-48. eCollection 2019.

CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; SCHIVO, L.; ORRU, G.; MARCIALIS, M. A.; CRISTINZIO, G. **“Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters”.** *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 79, no. 4, pp. 393–398, 1995.

CARDOSO, N. F., **REMOÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO DE EFLUENTE AQUOSOS UTILIZANDO CASCA DE PINHÃO IN NATURA E CARBONIZADA COMO ADSORVENTE.** 2010, 54f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CERQUEIRA, A. A. **Aplicação da técnica de eletrofloculação no tratamento de efluentes têxteis.** Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Química pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

CHAKRABORTY, S.; CHOWDHURY, S.; DAS SAHA, P. **Adsorption of Crystal Violet from aqueous solution onto NaOH-modified rice husk.** *Carbohydrate Polymers*, v. 86, n. 4, p. 1533–1541, 2011.

CHEN, K.C.; WU, J.Y.; LIOU, D.J.; HWANG, S.C. (2003). **Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains.** *J Biotechnol* 101: 57-68.

CHERIAA, J.; KHAIREDDINE, M.; ROUABHIA, M.; BAKHROUF, A. **Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium.** *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:512454. doi: 10.1100/2012/512454. Epub 2012 May 1.

CISNEROS, R. L.; ESPINDOLA, A.G.; LITTER, M. I. **Photodegradation of an azo dye of the textile industry.** *Chemosphere*, Vol. 48, p. 393-399, 2002.

DAI, J.; WANG, H.; CHI, H.; WANG, Y.; ZHAO, J. **Immobilization of laccase from *Pleurotus ostreatus* on magnetic separable SiO<sub>2</sub> support and excellent activity towards azo dye decolorization.** Journal of Environmental Chemical Engineering. 4 (2016) 2585-2591

DAWKAR, V. V.; JADHAV, U.U.; JADHAV, S.U.; GOVINDWAR, S. P. **Biodegradation of disperse textile dye brown 3REL by newly isolated *Bacillus* sp.** VUS. J Appl Microbiol 2008, 105:14–24.

DEVEREUX, R.; WILLIS, S.G. **Amplification of ribosomal RNA sequences.** In: Molecular Microbial Ecology Manual. Springer, Dordrecht, 1995. p. 277-287.

EDWARDS, J. C. **Investigation of color removal by chemical oxidation for three reactive textile dyes and spend textile dye wastewater.** Dissertação (Master in Environmental Science and Engineering) – Department of Civil and Environmental Engineering, Virginia Polytechnic Institute and State University. Blackburg, 2000.

EICHLEROVÁ, I., HOMOLKA, L.; BENADA, O.; KOFRONOVÁ, O.; HUBÁLEK, T.; NERUD, F. **Decolorization of orange g and remazol brilliant blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: toxicological evaluation and morphological study.** Chemosphere, Oxford, v. 69, n. 5, p. 795-802, 2007.

ESLAMI, H.; EHRAMPOUSH, M.H.; ESMAEILI, A.; SALMANI, M. H.; EBRAHIMI, A. A.; GHANEIAN, M. T.; FALAHZADEH, H.; FARD, R. F. (2019) **Enhanced coagulation process by Fe-Mn bimetal nano-oxides in combination with inorganic polymer coagulants for improving as (V) removal from contaminated water.** J Clean Prod 208:384–392

ESLAMI, H.; SHARIATIFAR, A.; RAFIEE, E.; SHIRANIAN, M.; SALEHI, F.; HOSSEINI, S. S.; ESLAMI, G.; GHANBARI, R.; EBRAHIMI, A. A. **Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new *Enterococcus faecalis*–*Klebsiella variicola* bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge.** World Journal of Microbiology and Biotechnology (2019) 35:38.

FABRÍCIO, T. M.; BRAGA, M. A.; GOMES, T. R. S.; VASCONCELOS, A. K. P.; AQUINO, M. D. de; ARAÚJO, R. **Produção de Biossurfactante e Biodegradação no Cultivo de *Geobacillus stearothermophilus* com Corante Azul de Metileno.** V CONNEPI – Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação. 2010.

FRANKLIN, O.; HALL, E. K.; KAISER, C.; BATTINS, T. J.; RICHTER, A. **Optimization of biomass composition explains microbial growth-stoichiometry relationships.** Am Nat. 2011 Feb; 177(2): E29-42.

FERREIRA-LEITÃO, V. S.; CARVALHO, M. E. A. de; BON, E. P. S. **Dyes and Pigments.** Elsevier Vol. 74, No. 1, Pág. 230-236. 2007.

FISPQ. Ficha de Informações de Segurança e Produtos Químicos. **Azul de Metileno.** 2019. Disponível em: <<http://www.anidrol.com.br/fispq/Azul%20De%20Metileno%20%20-%20COD%20%20AS%206315.pdf>> Acesso 09 jul. 2019.

FLECK, L. **Aplicação do controle estatístico de processos ao tratamento de um efluente têxtil por eletrofloculação**. 2011. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia e Gestão Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Medianeira, Medianeira, 2011.

FRANCISCON, E. G. D. **Descoloração e degradação de azo corantes por bactérias**. 2010. 144 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

FU, Y.; VIRARAGHAVAN. T. **Fungal decolorization of dye wastewaters: a review**. Bioresour Technol. 2001 Sep;79(3):251-62.

GHAZI MOKRI, H. S.; MODIRSHAHLA, N.; BEHNAJADY, M. A.; VAHID, B. **Adsorption of C.I. Acid Red 97 dye from aqueous solution onto walnut shell: kinetics, thermodynamics parameters, isotherms**. International Journal of Environmental Science and Technology, Vol. 12, Pág. 1401-1408, 2015.

GÓES, M. C. D. C. **Palha da carnaúba (*Copernicia cerifera*) como removedor dos corantes azul de metileno e cristal violeta**. 2013. 104 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Maranhão Programa de PósGraduação em Química, São Luís, MA.

GOUVEIA, A. de F. **Remoção de azul de metileno e vermelho remazol por adsorção utilizando lodo de estação de tratamento de água e carvão ativado granular**. 2014. 91 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Campo Mourão, Campo Mourão, 2014.

GUARATINI C.C. I.; ZANONI M. V. B. **Corantes têxteis**. Química Nova, v. 23, p. 71-78, 2000.

HORVAT, A. J. M.; PETROVIC, M.; BABIC, S.; PAVLOVIC, D. M.; ASPERGER, D.; PELKO, S.; MANCE, A. D.; KASTELAN-MACAN, M. **Analysis, occurrence and fate anthelmintcs and their transformation products in the environment**. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 31, Pág. 61-24, 2012.

JAISWAL, S.; GOMASHE, A. V.; AGRAWAL, S. (2014). **Decolorization potential of *Bacillus* sp. for removal of synthetic textile dyes**. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 83- 88.

JORGE, I. R.; TAVARES, F. P.; SANTOS, K. G. dos. **Remoção do corante azul de metileno no tratamento de efluentes por adsorção em bagaço de cana de açúcar**. Anais do XXXVII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - ENEMP 2015. São Paulo: Blucher, 2015.

KALYANI, D. C.; PATIL, P. S.; JADHAV, J. P.; GOVINDWAR, S. P. 2008. **Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium sp. SUK1**. Bioresour. Technol. 99: 4635- 4641.

KALYANI, D.C.; TELKE, A.A.; SURWASE, S.N.; JADHAV, S.B.; LEE, J.K.; JADHAV, J.P. (2012). **Effectual decolorization and detoxification of triphenylmethane dye malachite green (MG) by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074 and its enzyme system.** *Clean Technol Envir* 14: 989-1001.

KALME, S. D.; PARSHETTI, G. K.; JADHAV, S. U., GOVINDWAR, S. P. **Biodegradation of benzidine based dye Direct Blue-6 by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112.** *Bioresource Technology*, Vol. 98, No. 7, Pág. 1405-1410, May 2007.

KAPOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. **Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode.** Elsevier, Vol. 32, No. 6, Pág. 1968-1977. Junho de 1998.

KARIM, M. E.; DHAR, K.; HOSSAIN, M. T. **Decolorization of Textile Reactive Dyes by Bacterial Monoculture and Consortium Screened from Textile Dyeing Effluent.** *J Genet Eng Biotechnol.* 2018;16(2):375–380.

KHADIJAH, O.; LEE, K.; FAIZ, M. **Isolation, screening and development of local bacterial consortia with azo dyes decolourising capability.** *Malaysian Journal of Microbiology.* 2009;5:25–32

KHAN, R.; BHAWANA, P.; FULEKAR, M. (2013). **Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review.** *Rev Environ Sci Biotechnol* 12:75–97

KONISHI, J.; ISHI, Y.; OKUMURA, K.; SUZUKI, M. **Thermophilic carbon-sulphur-bond-targeted biodesulfurization.** *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3154- 3169, 1997.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G. de; DURÁN, N. **Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis.** *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 1, Pág. 78-82, 2002.

LI, H.X.; XU, B.; TANG, L.; ZHANG, J.H.; MAO, Z.G. (2015). **Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp MZS10.** *Int Biodeter Biodegr* 103: 30-37.

LIU, J.; SUN, G. **The biocidal properties of anthraquinoid dyes.** *Dyes and Pigments* 81, 231-234, 2008.

LIU, T.; LI, Y.; DU, Q.; SUN, J.; JIAO, Y.; YANG, G.; WANG, Z.; XIA, Y.; ZHANG, W.; WANG, K.; ZHU, H.; WU, D. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** Elsevier, Vol. 90, No. 1, Pág. 197- 203. 2012

LONCAR, N.; GLIGORIJEVIC, N.; BOZIC, N.; ZORAN, V. **Congo red degrading laccases from *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from salt spring in Serbia.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 91 (2014).

MALEY, A. M.; ARBISER, J. L. **Gentian violet: a 19th century drug re-emerges in the 21st century.** *Experimental Dermatology*, Copenhagen 2013, 22, 775.

MAHMOODI, N. M.; HAYATI, B.; ARAMI, M.; LAN, C. (2011) **Adsorption of textile dyes on pine cone from colored wastewater: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies.** *Desalination* 268:117–125

MITTAL, A., MITTAL, J., MALVIYA, A., KAUR, D., GUPTA, V. K. **Adsorption of hazardous dye crystal violet from wastewater by waste materials.** *Journal of Colloid and Interface Science.* 343, 463-473. 2010.

MONGKOLTHANARUK, W.; TONGBOPIT, S.; BHOONOBTONG, A. **Independent behavior of bacterial laccases to inducers and metal ions during production and activity.** *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 39, p. 9391-9398, 2012.

MOURA, G.F. de; BULLA, L. M. C.; POLONIO, J. C.; PAMPHILE, J. A. **Seleção de endofíticos com potencial biotecnológico na biorremediação de corante têxtil.** IX EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, 9., 2015. Paraná. Maringá: ISBN, 2015. p.4.

MURUGESAN, K.; ARULMANI, M.; NAM, I. H.; KIM, Y. M.; CHANG, Y. S.; KALAICHELVAN, P. T. (2007). **Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40 (7), 1662-1672.

NAGAI, M.; SATO, T.; WATANABE, H.; SAITO, K.; KAWATA, M.; ENEI, H. 2002. **Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 327-335.

NASCIMENTO, C.; MAGALHÃES, D. de P.; BRANDÃO, M.; SANTOS, A. B.; CHAME, M.; BAPTISTA, D.; NISHIKAWA, M.; SILVA, M. da. **Degradation and detoxification of three textile azo dyes by mixed fungal cultures from semi-arid region of Brazilian Northeast.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, Vol. 54, n. 3, p. 621-628, 2011.

NEUMANN, M. G.; GESSNER, F.; CIONE, A. P. P.; SARTORI, R. A.; CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, v. 23, n. 6. 818-824, 2000.

OFOMAJ, A. E. **Sorption dynamics and isotherm studies of methylene blue uptake on to palm kernel fibre.** *Chem. Eng. J.* 26 (2007) 35–43.

OH, Y.K.; SEOL, E.H.; PARK, S. (2011). **Decolorization of synthetic dyes by *Citrobacter amalonaticus* Y19.** *J Taiwan Inst Chem E* 42: 492-497.

OLIVEIRA, L. H. S.; BARRETO, M. B.; VITALLI, V. M. V.; MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. **Descoloração de corantes sintéticos por basidiomicetos tropicais brasileiros.** *Naturalia*, Rio Claro, v.33, p. 85-99, 2010.

PANDEY, B. V.; UPADHYAY, R. S.. ***Pseudomonas fluorescens* can be used for bioremediation of textile effluent Direct Orange-102.** *Tropical Ecology* 51(2S): 397-403, 2010 ISSN 0564-3295.

PASZCZYNSKI, A.; CRAWFORD, R. L. **Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the White-rot fungus *Phanerochaete chysosporium***. *Biotechnology Process*, Vol. 11, No. 4, Pág. 368-379, 1995.

PAZ, M. C. F. **Identificação e caracterização de *Bacillus licheniformis* e *Geobacillus stearothermophilus*: Produção de biossurfactante e degradação de dibenzotiofeno (DBT) – por uma nova amostra de *Geobacillus stearothermophilus* UCP 986**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, Brasil, 2005.

PERES, C. S.; ABRAHÃO, A. J. **Características e sistemas de tratamento de águas residuais das indústrias têxteis – uma primeira abordagem**. *Química Têxtil*, São Paulo: ABQCT, (52), p. 22-39, 1998.

PIZATO, E.; LOPES, A. C.; ROCHA, R. D. C.; BARBOSA, A. de M.; CUNHA, M. A. A. da. **Caracterização de efluente têxtil e avaliação da capacidade de remoção de cor utilizando o fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI**. *Eng. Sanit. Ambient.* DOI: 10.1590/S1413-41522017121743

POKHARIA, A.; AHLUWALIA, S. S. **Isolation and screening of dye decolorizing bacterial isolates from contaminated sites**. *Textiles and Light Industrial Science and Technology*. 2013;2(2):54–61.

PONNUSAMI, V.; VIKRAM, S.; SRIVASTAVA, S. N. **Guava (*Psidium guajava*) leaf powder: novel adsorbent for removal of methylene blue from aqueous solutions**. *J. Hazard. Mater.* 52 (2008) 276–286.

POPLI, S.; PATEL, U.D. (2015) **Destruction of azo dyes by anaerobic–aerobic sequential biological treatment: a review**. *Int J Environ Sci Technol* 12:405–420

RAJ, A.; CHANDRA, R.; REDDY, M. M. K.; PUROHIT, H. J.; KAPLEY, A. 2007. **Biodegradation of kraft lignin by a newly isolated bacterial strain, *Aneurinibacillus aneurinilyticus* from the sludge of a pulp paper mill**. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 793- 799.

RAMOS, J. M. P. **Estudo e aplicação de processos oxidativos avançados e ecotoxicológicos no tratamento de efluente contendo verde malaquita**. Dissertação (Departamento de Química e Biotecnologia). Universidade Federal de Alagoas. Maceió – AL. 2018.

REIS, L. G. T. dos. **Degradação do corante vermelho congo em solução aquosa através do plasma obtido por eletrólise de alta tensão**. Dissertação (Departamento de Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. 2009.

RIBEIRO, A. P. A. **Efeito de fungos basidiomicetos na Descoloração e fitotoxicidade de Corante sintético e efluente têxtil**. 2013. 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROBINSON, T.; MCMULLAN, G.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. **Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative**, *Bioresour. Technol.* 77 (2001) 247–255.

ROY, D.C.; BISWAS, S.K.; SAHA, A.K.; SIKDAR, B.; RAHMAN, M.; ROY, A. K.; PRODHAN, Z. H.; TANG, S. S. **Biodegradation of Crystal Violet dye by bacteria isolated from textile industry effluents**. PeerJ. 2018 Jun 21;6:e5015. doi: 10.7717/peerj.5015. eCollection 2018.

SANTOS, A. B. dos; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. **Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology**. Bioresource Technology, Vol. 98, No. 12, Pág.2369-2385. September 2007.

SANTOS, G. C. **Análise comparativa da capacidade de remoção do corante direct blue 71 em solução pelos fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Aspergillus oryzae***. Dissertação. Instituto de Biociências. Rio Claro – SP. 2011.

SANTOS, G. S.; MARQUES, E. P.; SILVA, H. A. dos S.; BEZERRA, C. W. B.; MARQUES, A. B. **Identificação e quantificação do cristal violeta em guardentes de mandioca (tiquira)**. Quím. Nova, Vol. 28, No. 4. São Paulo. Julho/agosto 2005.

SANTOS, H. M. M. F. dos; ALBERTON, J. S.; GOMES, L. M. F.; GRACIANO, M. R.; OLIVEIRA, P. E. de. **Biodegradação de corantes têxteis por microrganismos do chorume em meios enriquecidos por um subproduto da fabricação da cachaça**. 2016. 28 f. PIC-QUIMI. Instituto Federal Catarinense. Araquari, São Paulo., 2016.

SARATALE, R. G.; SARATALE, G. D.; CHANG, J. S.; GOVINDWAR, S. P. **Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review**. J Taiwan Inst Chem Eng. 2011;42:138–157. doi: 10.1016/j.jtice.2010.06.006.

SARATALE, R. G.; GANDHI, S. S.; PURANKAR, M. V.; KURADE, M. B.; GOVINDWAR, S. P.; OH, S. E.; SARATALE, G. D. **Decolorization and detoxification of sulfonated azo dye C.1. Remazol Red and textile effluent by isolated Lysinibacillus sp, RGS. 115 (2013) 658-667**

SILVA, A. T. da. **Influência da Temperatura na Adsorção do Corante Azul de Metileno Utilizando Serragem de *Pinus Elliottii* como um Adsorvente Alternativo: Um Modelo para o Tratamento de Efluentes Têxteis**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SILVA, M. C. et al. **The use of soybean peroxidase in the decolourization of Remazol Brilliant Blue R and toxicological evaluation of its degradation products**. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 89, p. 122 – 129, 2013.

SHAH, M. **Microbial Degradation of Reactive Orange M2R Dye by Bacterial Consortium ETL-A**. J Microb Biochem Technol, Vol. 8 (6), Pág. 483-487, 2016.

SHEIKHI, F.; ROAYAEI, A.M.; ENAYATIZAMIR, N.; RODRIGUEZ-COUTO, S. **The determination of assay for laccase of *Bacillus subtilis* WPI with two classes of chemical compounds as substrates**. Indian Journal of Microbiology, v. 52, n. 4, p. 701-707, 2012.

SOLÍS, M.; SOLÍS, A.; PÉREZ, H.; MANJARREZ, N.; FLORES, M. (2012). **Microbial decolouration of azo dyes: a review**. Process Biochem 47:1723–1748

SURWASE, S. V.; DESHPANDE, K. K.; PHUGARE, S. S.; JADHAV, J. P. **Biotransformation studies of textile dye Remazol Orange 3R**. Biotech. 2013 Aug;3(4):267-275. doi: 10.1007/s13205-012-0093-1. Epub 2012 Oct 6.

TAILENA, F.; R; N.; BRAGA, M. A.; GOMES, T. R. S. VASCONCELOS, R.; AQUINO, M. D. de; ARAÚJO, R. **Produção de Biossurfactante e Biodegradação no cultivo de *GeoBacillus Stearothermophilus* com Corante Azul de Metileno**. In: V CONNEPI. 2010 Maceió.

TAN, L.; HE, M.; SONG, L.; FU, X.; SHI, S. **Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1**. Bioresource Technology, Vol. 203, Pág. 287-294, 2016.

TAVARES, A. P. M.; CRISTOVAO, R. O.; LOUREIRO, J. M.; BOAVENTURA, R. A. R.; MACEDO, E. A. **Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase**. J Hazard Mater. 2009;162:1255–1260. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.014.

TELKE, A. A.; JOSHI, S. M.; JADHAV, S. U.; TAMBOLI, D. P.; GOVINDWAR, S. P. **Decolorization and detoxification of Congo red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SU-EBT**. Biodegradation (2010) 21:283–296 DOI 10.1007/s10532-009-9300-0.

VILAR, V. J. P.; BOTELHO, C. M. S.; BOAVENTURA, R. A. R. **Methylene blue adsorption by algal biomass based materials: biosorbents characterization and process behaviour**. J. Hazard. Mater. 147 (2007) 120–132.

WALKER, G.M; WEATHERLEY, L.R. **Biodegradation and Biosorption of Acid Anthraquinone Dye**. Environmental Pollution, vol. 108, p. 219-223, 2000.

WAN, J.; SUN, X.; LIU, C.; TANG, M.; LI, L.; NI, H. **Decolorization of textile dye RB19 using volcanic rock matrix immobilized *Bacillus thuringiensis* cells with surface displayed laccase**. World J Microbiol Biotechnol. 2017 Jun;33(6):123. doi: 10.1007/s11274-017-2290-x. Epub 2017 May 22

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. 2003. **Whiterot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents**. Biotechnol. Adv. 22: 161-187.

WONG, P. W.; TENG, T. T.; NORULAINI, N. (2007) **Efficiency of the coagulation-flocculation method for the treatment of dye mixtures containing disperse and reactive dye**. Water Qual Res J Can 42:54–62

YAGUB, M. T.; SEN, T. K.; AFROZE, S.; ANG, H. M. (2014) **Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review**. Adv Colloid Interface Sci 209:172–184

YANG, X. Q.; ZHAO, X. X.; LIU, C. Y.; ZHENG, Y. S.; QIAN, J. **Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase**. Process Biochem. 2009;44:1185–1189. doi: 10.1016/j.procbio.2009.06.015.

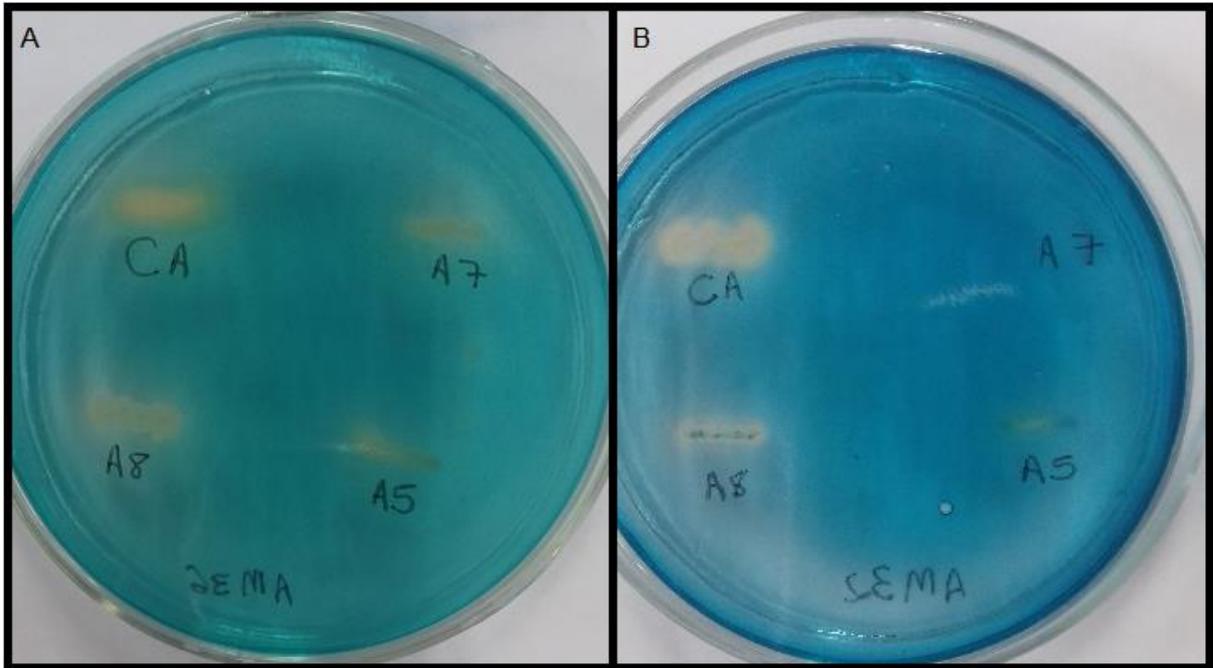
YAN, G.; VIRARAGHAVAN, T. **Heavy metal removal in a biosorption column by immobilized *M. rouxii* biomass.** *Bioresour. Technol.* 2001, 78, 243.

YOST, C. K.; NATTRESS, F. M. **The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic acid bacteria associated with meat spoilage.** *Lett Appl Microbiol.* 2000 Aug;31(2):129-33.

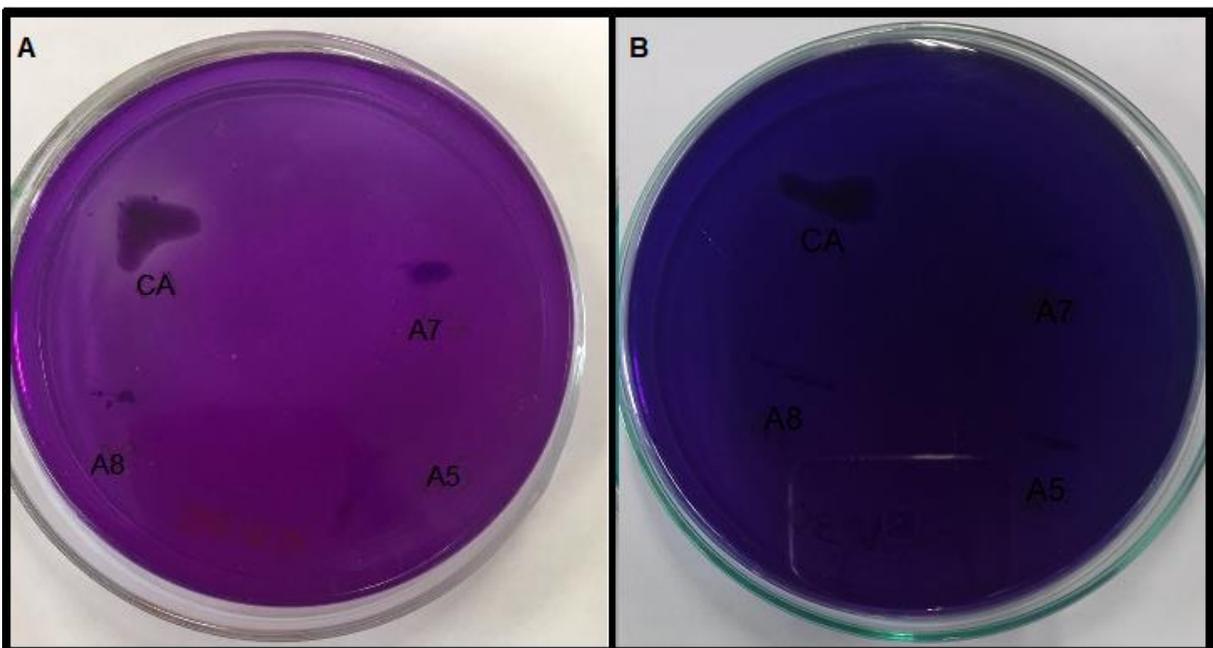
YU, J. X.; LI, B. H.; SUN, X. M.; YUAN, J.; CHI, R.A. **Polymer modified biomass of baker's yeast for enhancement adsorption of methylene blue, rhodamine B and basic magenta.** *J. Hazard. Mater.* 168 (2009) 1147–1154.

ZABŁOCKA-GODLEWSKA, E.; PRZYSTAŚ, W.; GRABIŃSKA-SOTA, E. **Dye Decolourisation Using Two *Klebsiella* Strains.** *Water Air Soil Pollut.* 2015; 226():2249.

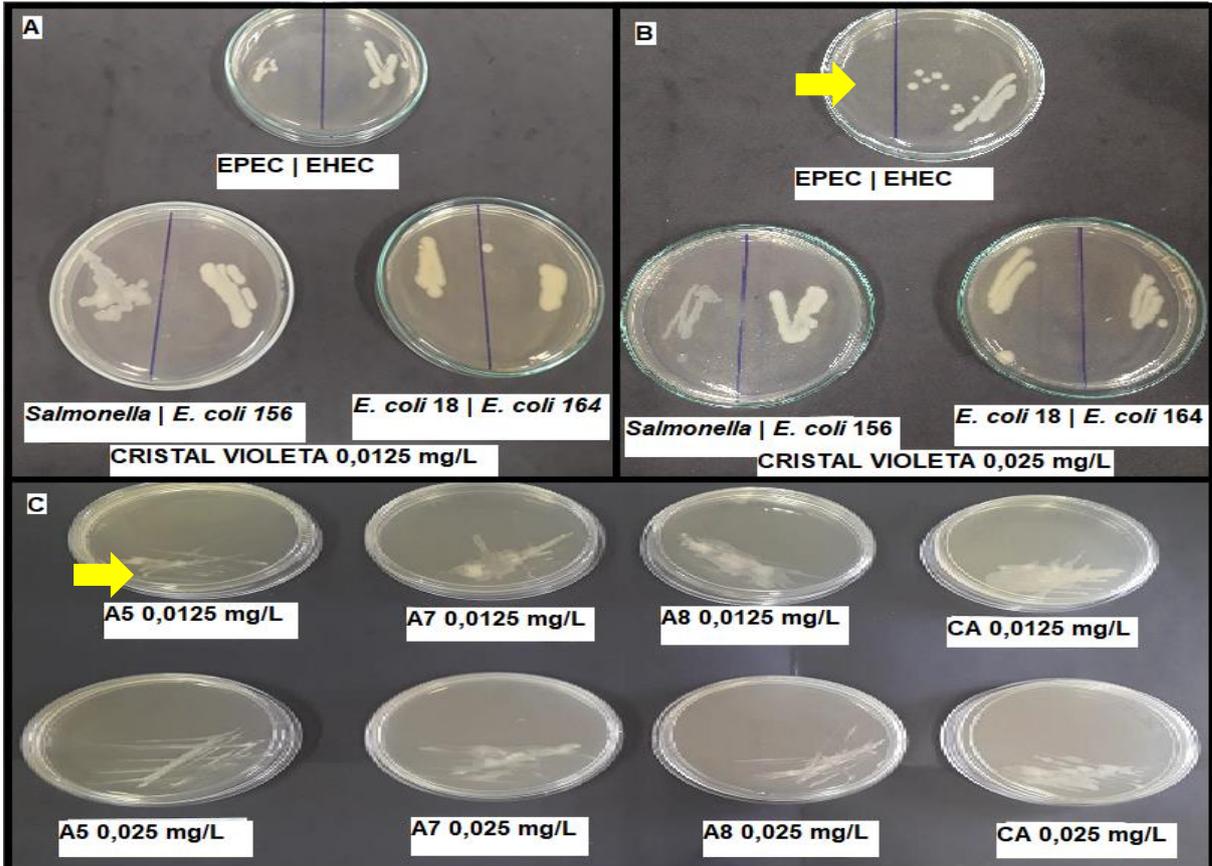
## ANEXO



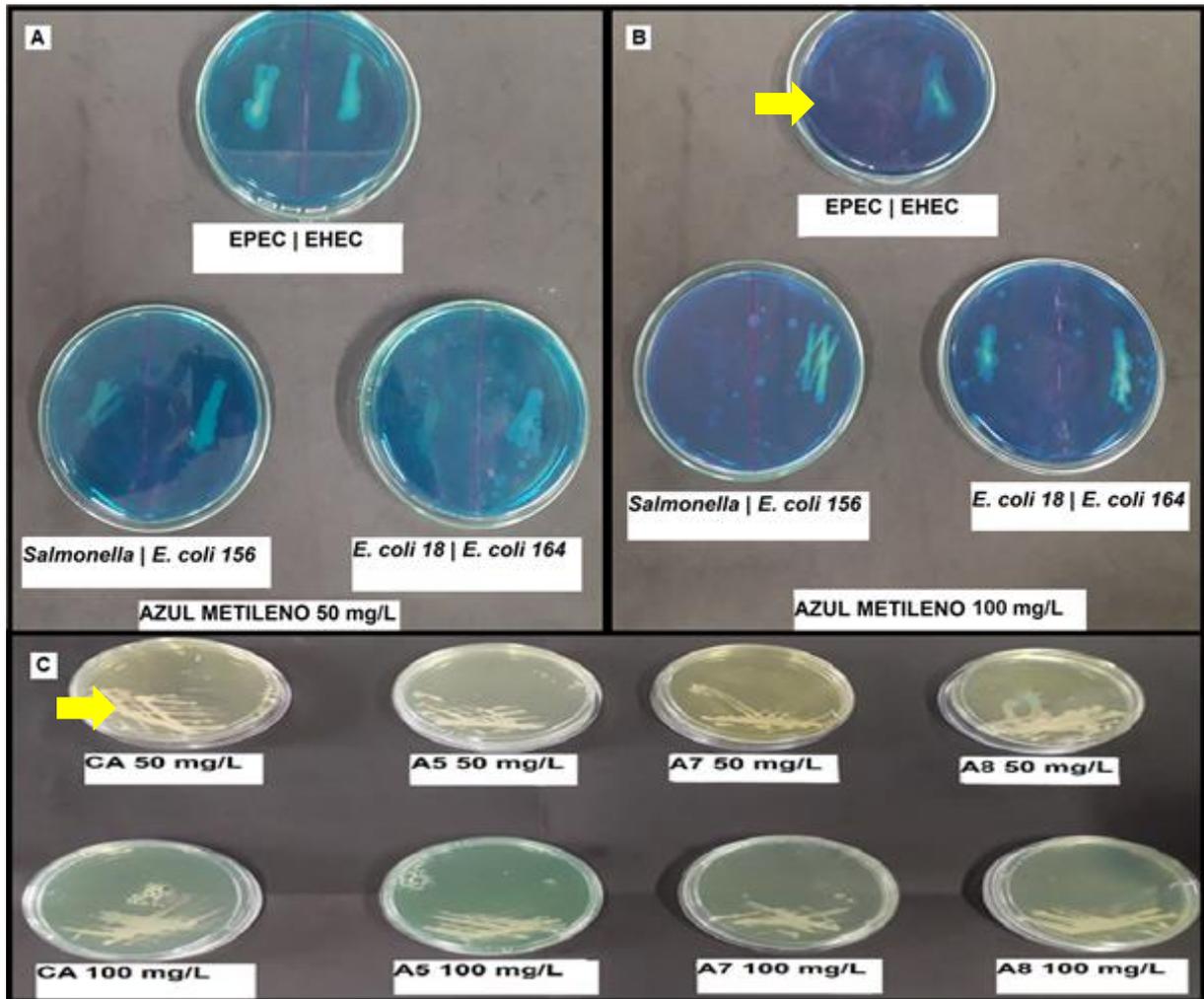
Screening do crescimento dos isolados CA, A5, A7 e em meio sólido pós 48 horas no corante Azul de metileno - A) Concentração 50 mg/L; B) Concentração 100 mg/L. Destaque para o halo esbranquiçado ao redor das colônias, indicando degradação do corante.



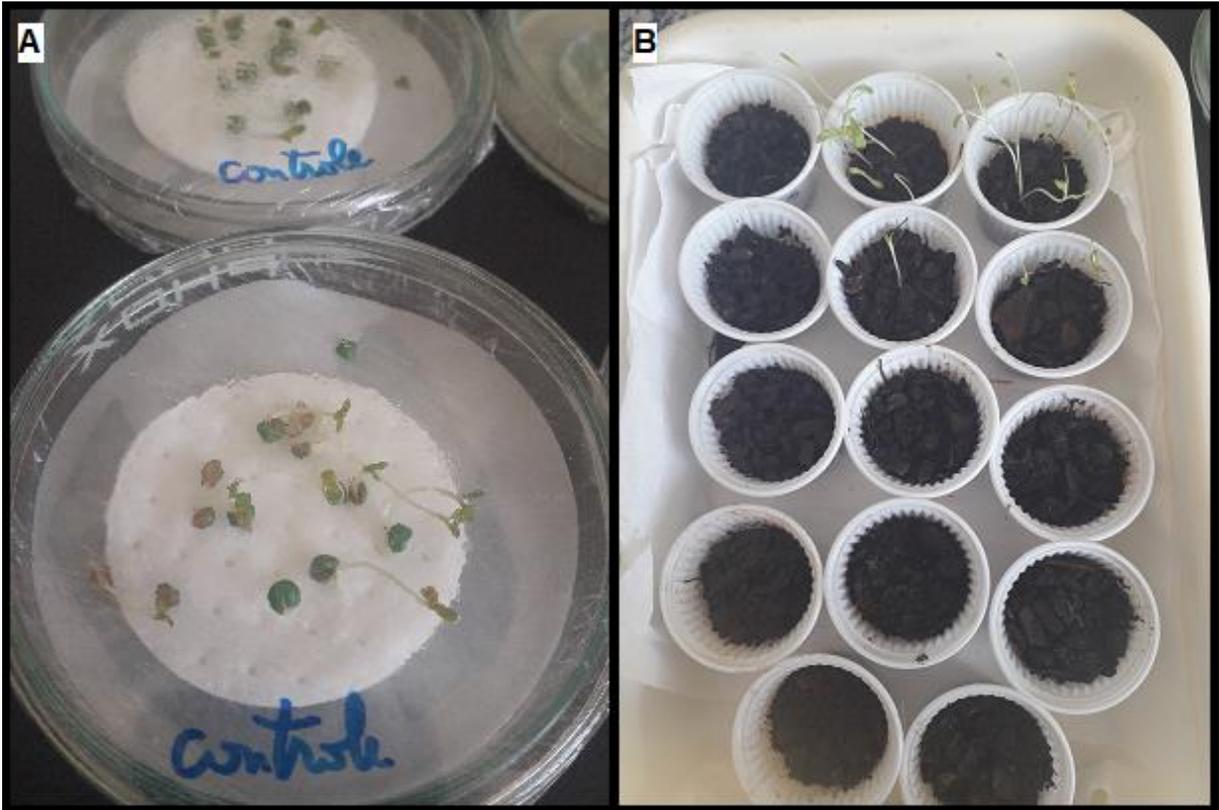
Screening do crescimento dos isolados CA, A5, A7 e em meio sólido pós 48 horas no corante cristal violeta A) Concentração 0,0125 mg/L; B) Concentração 0,025 mg/L. Observar o halo esbranquiçado ao redor das colônias e alteração da coloração das colônias, indicando degradação do corante.



Screening dos isolados sensíveis aos corantes azul de metileno não tratados e tratados. Destaque para o não crescimento do isolado EPEC (seta) (B) no corante sem tratamento e crescimento nos demais meios contendo corantes após tratamento (seta) (C).



Screening dos isolados sensíveis aos corantes cristal violeta não tratados e tratados. Destaque para o não crescimento do isolado EPEC (seta) (B) no corante sem tratamento e crescimento nos demais meios contendo corantes após tratamento (seta) (C).



Crescimento das sementes de alface *Lactuca sativa*: A) Crescimento somente do controle em placa de Petri; B) Crescimento somente no controle em terra vegetal. Não houve germinação das sementes nos corantes não tratados e tratados.