

DEGRADAÇÃO E CITOXICIDADE DO AZO CORANTE TÊXTIL ALARANJADO II POR *Pseudomonas aeruginosa* UCP 992 SOB CONDIÇÕES AERÓBICAS

Norma Suely EVANGELISTA-BARRETO^{1,2*}; Marcos A. B. LIMA²; Clarissa D. ALBUQUERQUE²; Regine Helena S. dos Fernandes VIEIRA¹; Galba Maria de CAMPOS-TAKAKI^{2,3}

¹Instituto de Ciências do Mar - LABOMAR, UFC. Av. Abolição, 3207, Meireles, CEP 60165-081. Telefone: 85. 3242-6422 R. 204, Fax 85.3289-8355. E-mail: nsevangelista@yahoo.com.br

²Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, NPCIAMB, UNICAP, Recife, Pernambuco, Brasil;

³Departamento de Química, UNICAP, Recife, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

A biodegradação do azo corante Alaranjado II usado em indústrias têxteis foi investigada usando *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 992), sob diferentes condições de cultivo, usando um planejamento fatorial 2³, que teve como variáveis independentes, a agitação, concentração do corante e tamanho do inóculo, e como variável resposta, a descoloração do corante. De acordo com os resultados *P. aeruginosa* promoveu uma descoloração de 85-94% do azo corante, sob condições de repouso, 60% sob agitação de 75 rpm e apenas 19% sob agitação de 150 rpm. Nos frascos mantidos em repouso, o pH do meio variou de 6,8 a 8,5 e a glicose, usada como co-substrato, não influenciou no processo de descoloração. Nas primeiras 24 h, a remoção da DQO foi bastante reduzida (23-39%), tendo um ligeiro aumento com 48 h (38-59%). O bioensaio usando *Artemia salina* apresentou mortalidade de 80-97%, quando comparada ao controle, indicando a recalcitrância do composto. Os resultados obtidos demonstram que das três variáveis usadas, apenas a agitação é significativa no processo de remoção do Alaranjado II e que a descoloração por *P. aeruginosa* é fortemente afetada pela aeração, demonstrando que o oxigênio inibe a atividade azoredutase, necessária ao processo de descoloração deste composto.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, descoloração, azo corante Alaranjado II, toxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de um milhão de toneladas de corantes são produzidos anualmente no mundo (CAO et al., 1999). Os azo corantes, caracterizados pela ligação azo ($R_1-N=N-R_2$), representam aproximadamente 70% da produção (CARLIEL et al., 1995), sendo amplamente usados como corantes têxteis, de alimentos e cosméticos (RAU et al., 2002).

Devido a elevada solubilidade na água, os azo corantes não são degradados em plantas convencionais de tratamentos de esgotos (PAGGA e BROWN, 1986; KUDLICH et al., 1999). Desse modo, efluentes coloridos contendo estes compostos têm causado sérios problemas ambientais, principalmente, porque estes compostos, quando presentes na água são altamente visíveis, afetando a transparência e estética do corpo aquático (SUPAKA et al., 2004).

Entretanto, é importante que se investigue linhagens microbianas que apresentem elevado potencial de descoloração dos corantes têxteis, através da clivagem reductiva do grupo azo na molécula. Nos últimos anos, diversos pesquisadores têm demonstrado a habilidade de vários microrganismos em transformar compostos azo em produtos não coloridos, além da completa mineralização das moléculas, sob determinadas condições ambientais (BLUMEL et al., 2002). Os azo corantes podem ser degradados sob condições aeróbicas (WONG e YUEN, 1996) ou anaeróbicas (KEHARIA et al., 2004). Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de descoloração de *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 992) usando o azo corante Alaranjado II, sob diferentes condições de cultivo, aeróbico e microaerofílico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Pseudomonas aeruginosa UCP 992 utilizada nos experimentos de biodegradação foi gentilmente obtida do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais NPCIAMB, UNICAP, Recife, Brasil, sendo mantida no meio Ágar nutriente e armazenado a 4°C.

2.2. Corante

O corante utilizado foi o azo reativo Alaranjado II (C.I. 15510) obtido da Sigma (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA) (Figura 1).

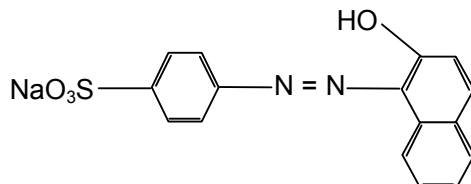


Figura 1 – Estrutura química do azo corante Alaranjado II.

2.3. Planejamento Experimental

Um planejamento fatorial completo 2^3 com 12 ensaios e ponto central foi realizado para analisar os efeitos e interações das variáveis independentes: volume do inóculo, concentração do corante e agitação, sobre a variável resposta, percentual de descoloração após 48 h. Os ensaios do planejamento foram realizados a 40°C, partindo-se de um pré-inóculo de 12 h (10^6 UFC/mL). O meio utilizado foi o caldo LB modificado pela adição de glicose (KONISHI et al., 1997). Todos os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA versão 5.0 da Statsoft, USA.

2.4. Remoção do corante

A concentração do corante no meio foi avaliada pela diminuição da absorção, após remoção das células por centrifugação ($10.000 \times g$, 8 min.), empregando espectrofotômetro UV-VIS (Espectronic Gênesis modelo 2). O comprimento de onda foi fixado pela absorção máxima do corante na região do visível, a 485 nm.

2.5. Determinação da DQO

A biodegradação dos corantes foi monitorada pela redução na demanda química de oxigênio (DQO) (APHA, 1998). O método consistiu em oxidar a amostra com excesso de $K_2Cr_2O_7$ a quente, em meio ácido sulfúrico e sulfato de prata como catalisador. Após duas horas num sistema fechado (tubo com tampa rosqueada), titulou-se o dicromato de potássio com solução padronizada de sulfato ferroso amoniacal utilizando ferroína como indicador. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6. Determinação do pH

O pH do meio livre de células foi medido utilizando um pHmetro Orion, modelo 310.

2.7. Características morfológicas

A biomassa de *P. aeruginosa* após o processo de descoloração foi observada por microscopia eletrônica de varredura.

2.8. Toxicidade

O teste de toxicidade foi realizado utilizando a metodologia proposta por McLaughlin et al. (1995). Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para frascos contendo quatro diferentes concentrações (17, 33, 67 e 83%) da amostra teste e água artificial do mar. Os testes foram realizados em triplicata. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h. Para obtenção das CL_{50} e respectivos intervalos de confiança, utilizou-se o método de análise Trimmed Spearman-Kärber (YOUN-JOO, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Descoloração do azo corante

A descoloração dos azo corantes tem como reação inicial a clivagem redutiva do grupo azo. Contudo, sob condições anaeróbicas estas reações podem ser catalisadas por diversos sistemas biológicos, conduzindo ao acúmulo de aminas aromáticas (ZIMMERMANN et al., 1982). Entretanto, estes corantes também podem ser reduzidas sob condições aeróbicas ou microaerofílicas (HU, 1994; NACHIYAR e RAJAKUMAR, 2004).

Neste sentido, experimentos foram realizados com *P. aeruginosa* (UCP 992), usando diferentes combinações determinadas por um planejamento fatorial de nível 2^3 , com condições aeróbicas e microaerofílicas. Dessa forma, observou-se que a melhor taxa de descoloração do corante foi obtida quando todas as variáveis independentes encontravam-se reguladas em seu nível inferior (ensaio 1), promovendo uma descoloração de 94% e sugerindo uma possível clivagem do grupo azo do corante (Tabela 1).

Quando as variáveis independentes se encontravam em seu nível superior (ensaio 8), a taxa de descoloração foi visivelmente reduzida (11%). No entanto, quando os frascos foram mantidos sob agitação moderada (75 rpm), a taxa de descoloração foi maior (60%) (Tabela 1). Nos ensaios em que houve maior descoloração, o pH inicial 5,9, aumenta para 7,5, sugerindo a presença de aminas, provenientes da clivagem do corante, reconhecidas pela alcalinidade (Tabela 1).

Segundo Chang et al. (2001a) a presença do oxigênio não inibe diretamente a atividade azoredutase, sendo esta inibição, provavelmente, um evento dependente do metabolismo microbiano. Assim, microrganismos viáveis são definitivamente requeridos para uma maior descoloração nos processos biológicos, significando que a descoloração biológica é possível (CHANG et al., 2001b). Devido à recalcitrância das aminas aromáticas normalmente observadas na fase anaeróbica, a agitação suave deve ser vantajosa no processo de descoloração. Adicionalmente, Bromley-Challenor et al. (2000) relataram que agitação suave ocasional promove uniformidade do corante, diminuindo as limitações de difusão.

Por outro lado, a agitação das células contribui para que parte da energia seja oxidada via glicólise e ciclo TCA, gerando nucleotídeos reduzidos. Quando os nucleotídeos são reoxidados via sistema de transporte de elétrons, produzem alta energia, ou seja, ATP, proporcionando crescimento e manutenção celular (CHEN, 2002). No entanto, o consumo do NADH na fosforilação oxidativa resulta em um efeito negativo na etapa de descoloração (ISIK e SPONZA, 2003). Entretanto, Zimmermann et al. (1982), isolaram e purificaram uma azoredutase insensível ao oxigênio, a partir da degradação aeróbica do azo corante Alaranjado II por *Pseudomonas* KF46.

Tabela 1 – Matriz codificada do planejamento fatorial 2³ em relação à resposta de descoloração do Alaranjado II e pH por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 992, após 48 h de cultivo a 40°C

Ensaio	Níveis dos Fatores ^a			Descoloração (%) ^b		pH _(final) ^c
	Inóculo	Corante	Agitação	24h	48h	
1	-1	-1	-1	93	94	7,2
2	+1	-1	-1	93	85	7,4
3	-1	+1	-1	83	91	7,4
4	+1	+1	-1	94	90	7,4
5	-1	-1	+1	11	16	6,9
6	+1	-1	+1	14	19	6,9
7	-1	+1	+1	16	08	6,9
8	+1	+1	+1	14	11	6,8
9 ^d	0	0	0	51	59	7,4
10 ^d	0	0	0	49	58	7,3
11 ^d	0	0	0	50	60	7,5
12 ^d	0	0	0	51%	59%	7,5

^aNíveis dos fatores, codificados como valores de -1 e +1 e 0 (ponto central) na tabela, como segue: Inóculo (10⁷): 1 mL para o nível -1; 2,5 mL nível 0; 4 mL nível +1; Concentração do corante: 0,025 mM para o nível -1; 0,037 mM nível 0; 0,050 mM nível +1; Agitação: 0 rpm para nível -1; 75 rpm nível 0; 150 rpm nível +1. ^bResposta obtida com cada ensaio referente a descoloração do Alaranjado II por *P. aeruginosa*. ^cpH final do meio ao termino do experimento em cada ensaio. ^dEnsaio em replicatas.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 2), observa-se que para um nível de confiança de 95%, as variáveis independentes (concentração do corante e agitação) exerceram um efeito negativo no processo de descoloração do corante, contudo, somente a agitação apresentou efeito estatisticamente significativo, sugerindo que esta variável é um parâmetro de grande importância no processo de descoloração do Alaranjado II por *P. aeruginosa*. Quando analisando as interações das variáveis estudadas, observar-se que embora nenhuma delas tenha apresentado efeito estatístico significativo, apenas a interação inóculo e agitação apresentaram um efeito negativo no processo de remoção.

Chang e Kuo (2000) ao estudarem a descoloração do corante Vermelho Reativo 22, usando *Escherichia coli*, sob condições anóxicas e aeróbicas, observaram que o nível de oxigênio dissolvido inibiu significativamente a remoção da cor. Isik e Sponza (2003) também relataram a descoloração dos azo corantes Vermelho Congo e Preto Reativo 38 em culturas contendo *Pseudomonas* sp. como sendo de 100 e 83%, respectivamente, após cinco dias de incubação anaeróbica. Contudo, sob condições microaerofílicas, uma descoloração de 76 e 74%, respectivamente, foi observada. Nenhuma descoloração ocorreu sob condições aeróbicas.

Baseado na literatura sabe-se que o oxigênio reprime a expressão azoredutase intracelular e assim, a descoloração é temporariamente inibida em culturas sob agitação. Porém, sob condições estáticas, apenas parte do oxigênio é transferida da superfície do meio e as células que se encontram no fundo do frasco exercem uma descoloração anaeróbica (CHEN, 2002).

A aplicação de modelos fatoriais tem sido amplamente utilizado para fornecer dados úteis na otimização de diversos experimentos, a fim de que se alcance a máxima remoção de poluentes (POKHREL e VIRARAGHAVAN, 2006). Os níveis inferior e superior do planejamento foram escolhidos baseados em estudos que investigaram condições que favorecem o processo de descoloração dos corantes sintéticos usando diferentes microrganismos (AMBRÓSIO e CAMPOS-TAKAKI, 2004; FANG et al., 2004). Embora as variáveis escolhidas não representem as condições ótimas de cultivo para a máxima eficiência no processo de degradação do azo corante, foi possível observar que a agitação não deve ser usada em cultivos contendo *P. aeruginosa*, sugerindo assim, que um novo planejamento seja realizado usando novas variáveis.

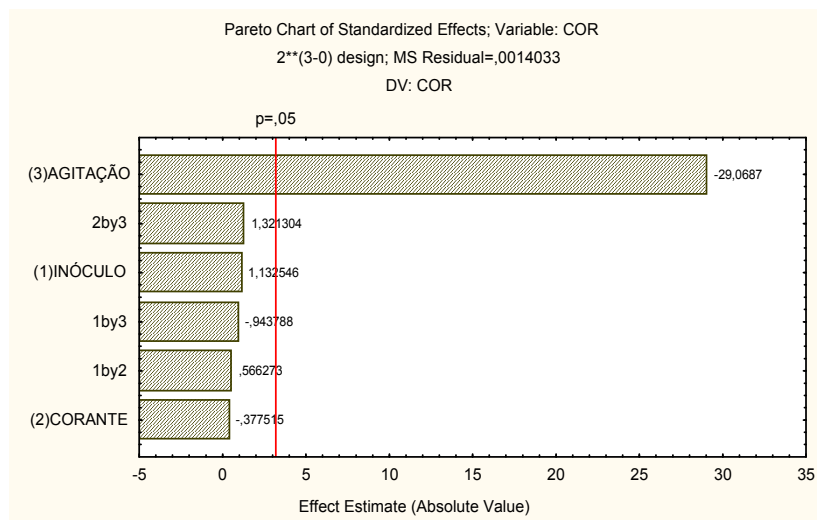


Figura 2 – Diagrama de Pareto mostrando os efeitos principais e interações das variáveis independentes no processo de descoloração do Alaranjado II por *Pseudomonas aeruginosa* UCP 992, após 24 h de cultivo a 40°C. (1) Tamanho do Inóculo, (2) Concentração do corante e (3) Faixa de agitação.

A remoção da DQO foi observada nos quatro ensaios (1, 2, 3 e 4) que apresentaram melhor descoloração, para acompanhar a biodegradação do azo corante. Nas primeiras 24 h, a remoção da DQO foi bastante reduzida (23-39%), tendo um ligeiro aumento com 48 h (38-59%) (Figura 3). A baixa eficiência na remoção da DQO pode ser sugerida pela presença de produtos intermediários provenientes da degradação microaerofílica ou devido aos metabólitos extracelulares liberados por *P. aeruginosa*. Segundo Isik e Sponza (2003) a concentração de aminas aromáticas formando benzendino a partir de culturas contendo *Pseudomonas* sp., em contato com o corante Direto Vermelho 28, foi de 47 e 52% sob condições anaeróbicas e microaerofílicas, respectivamente.

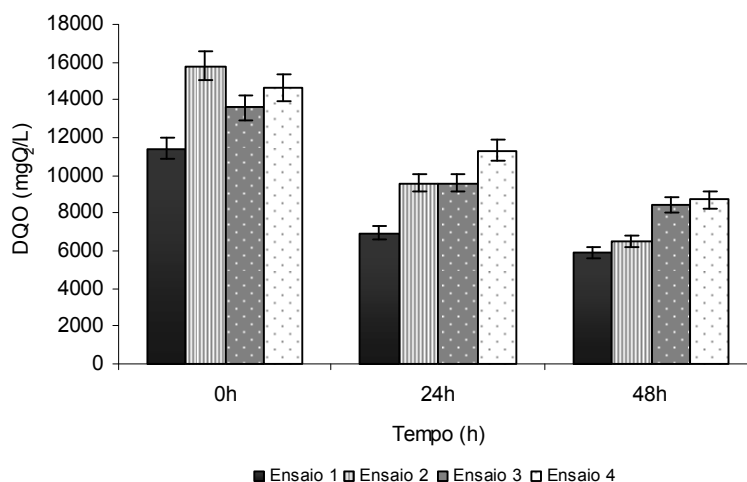


Figura 3 – Remoção da DQO durante o processo de descoloração do azo corante Alaranjado II por *Pseudomonas aeruginosa*, por 48h a 40°C.

3.2. Observações microscópicas

Ao final da descoloração, se observou principalmente nos frascos em repouso, a formação de um biofilme na superfície e paredes dos mesmos. O gênero *Pseudomonas* é conhecido por produzir uma camada de aspecto mucóide denominada *slime*, importante na formação de biofilmes (LINCOPAN e TRABULSI, 2004). O biofilme formado provavelmente contribui para estabelecer um ambiente anaeróbico. Quando a cultura foi observada por microscopia eletrônica de varredura, foi possível visualizar as células formando agregados celulares (Figura 4). A produção de um pigmento esverdeado, provavelmente pioverdina, também foi observada durante o cultivo de *P. aeruginosa* (UCP 992).

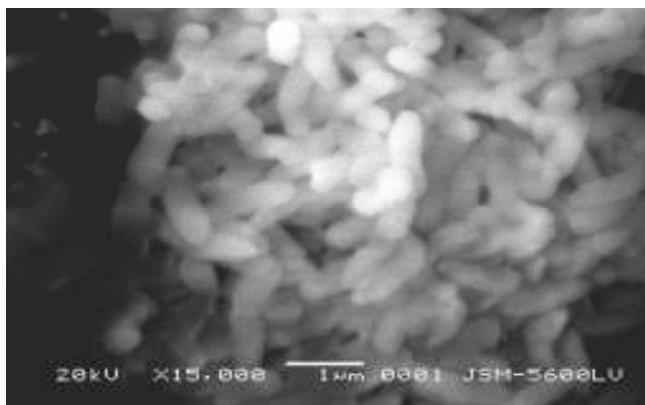


Figura 4 – Eletromicrografia de *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 992) após o processo de descoloração do azo corante Alaranjado II, por microscopia eletrônica de varredura.

3.3. Toxicidade

Ensaio de toxicidade usando *A. salina* nas amostras descoloridas (ensaio 1, 2, 3 e 4), foram realizados afim de determinar a toxicidade aguda do corante após o tratamento com *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 5. A porcentagem de mortalidade foi comparada com o controle, que não apresentava nenhuma substância tóxica. Dentre as amostras testadas, o ensaio 4 apresentou menor toxicidade (23%). Os demais ensaios apresentaram mortalidade elevada (> 80%) apenas na maior concentração (83%), exceto o ensaio 2, que apresentou mortalidade de 50% na concentração de 67% da amostra. Segundo Kudlich et al. (1996) a mortalidade observada pode ser sugerida pela presença de grupos SO_3H , que freqüentemente resistem a biodegradação ou são degradados somente parcialmente.

A CL_{50} das amostras (concentração que causa 50% de mortalidade) com seus respectivos coeficientes de confiança mínimo e máximo foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (YOUN-JOO, 2006). A maior CL_{50} foi apresentada para o ensaio 3 ($67,98\% \text{ v.v}^{-1}$), seguido do ensaio 2 ($60,18\% \text{ v.v}^{-1}$) e ensaio 1 ($59,77\% \text{ v.v}^{-1}$). O ensaio 4 não pôde ter a CL_{50} calculada pelo presente método. Assim, pôde-se observar que a degradação do corante formou metabólitos, que se apresentaram tóxicos para *A. salina*. Para Isik e Sponza (2004) testes de toxicidade usando *D. magna* mostraram que o tratamento aeróbico de um efluente têxtil não removeu a DQO e que a parcela não degradável do corante era responsável pela toxicidade. Por outro lado, um metabólito intermediário persistente em condições anaeróbicas também aumenta a toxicidade às populações bacterianas.

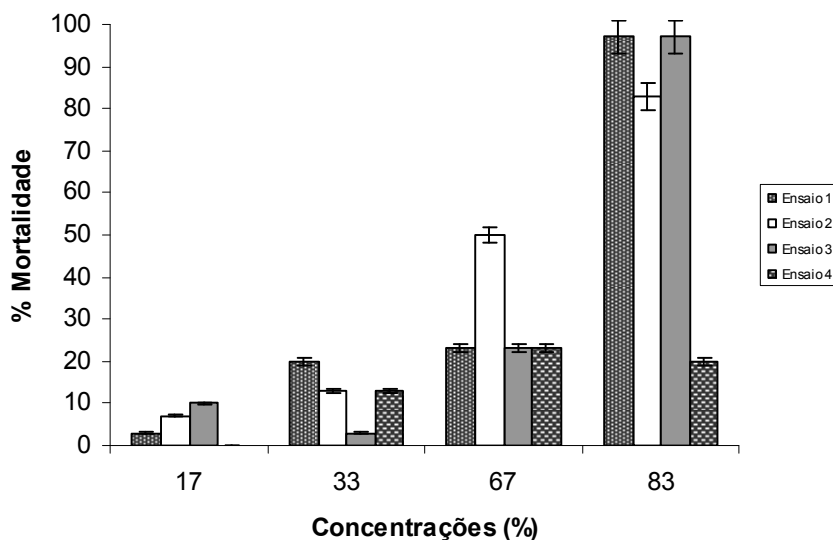


Figura 5 – Avaliação da toxicidade por *Artemia salina* dos produtos de decoloração do Alaranjado II, por *Pseudomonas aeruginosa* (UCP 992).

4. CONCLUSÕES

Neste estudo *P. aeruginosa* (UCP 992) apresentou elevada taxa de decoloração do azo corante Alaranjado II, sob condições microaerofílicas, demonstrando que forte agitação inibe o processo de decoloração. Embora, *P. aeruginosa* tenha clivado o grupo azo por redução, uma porção não biodegradável permaneceu no meio, aumentando a toxicidade. Assim, apesar de *P. aeruginosa* ter descolorido efetivamente o Alaranjado II, um processo aeróbico posterior deve ser estudado para a completa mineralização do composto azo.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. New York: APHA. AWWA, WPCF, 1998.
- AMBRÓSIO, S.T.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. **Bioresour. Technol.**, Essex, v.91, p.69-75, 2004.
- BLUMEL, S.; KNACKMUSS, H.-J.; STOLZ, A. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.68, p.3948-3955, 2002.
- BROMLEY-CHALLENGER, K.C.A.; KNAPP, J.S.; ZHANG, Z.; GRAY, N.C.C.; HETHERIDGE, M.J.; EVANS, M.R. Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. **Water Res.**, New York, v.34, p.4410-4418, 2000.
- CAO, J.S.; WEI, L.P.; HUANG, Q.G.; WANG, S.L.; HAN, S.K. Reducing degradations of azo dye by zero-valent iron in aqueous solution. **Chemosphere**, Oxford, v.38, p.565-571, 1999.
- CARLIELL, C.M.; BARCLAY, S.J.; NAIDOO, N.; BUCKLEY, C.A.; MULHOLLAND, D.A.; SENIOR, E. Microbial decolourisation of a reactive azo dye under anaerobic conditions. **Water SA**, Pretoria, v.21, p.61-69, 1995.
- CHANG, J-S.; CHOU, C.; LIN, Y-C.; LIN, P-J.; HO, J-Y.; HU, T-L. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. **Water Res.**, New York, v.35, p.2481-2850, 2001a.

CHANG, J.-S.; CHIEN, C.; CHEN, S.-Y. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. **Process Biochem.**, London, v.36, p.757-763, 2001b.

CHANG, J.-S.; KUO, T.-S. Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO₃. **Bioresour. Technol.**, Essex, v.75, p.107-111, 2000.

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

FANG, H.; WERONG, H.; YUEZHONG, L. Investigation of isolation and immobilization of a microbial consortium for decoloring of azo dye 4BS. **Water Res.**, New York v.38, p.3596-3604, 2004.

HU, T.L. Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas luteola*. **Bioresour. Technol.**, Essex, v.49, p.47-51, 1994.

ISIK, M.; SPONZA, D.T. Effect of oxygen on decolorization of dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. **Process Biochem.**, London, v.38, p.1183-1192, 2003.

ISIK, M.; SPONZA, D.T. Monitoring of toxicity and intermediates of C.I. Direct Black 38 azo dye through decolorization in an anaerobic/aerobic sequential reactor system. **J. Hazard Mater. B**, Amsterdam, v.114, p.29-39, 2004.

KEHARIA, H.; PATEL, H.; MADAMWAR, D. Decolorization screening of synthetic dyes by anaerobic methanogenic sludge using a batch decolorization assay. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v.20, p.365-370, 2004.

KONISHI, J.; ISHI, Y.; ONAKA, T.; OKUMURA, K.; SUZUKI, M. Thermophilic carbon-sulphur-bond-targeted biodesulfurization. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, p.3164-3169, 1997.

KUDLICH, M.; BISHOP, P.L.; KNACKMUSS, H.-J.; STOLZ, A. Simultaneous anaerobic and aerobic degradation of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by immobilized cells from a naphthalenesulfonate-degrading mixed culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Washington, v.45, p.597-603, 1996.

KUDLICH, M.; HETHERIDGE, M.J.; KNACKMUSS, H.J.; STOLZ, A. Autoxidation reactions of different aromatic o-aminohydroxynaphthalenes that are formed during the anaerobic reduction of sulfonated azo dyes. **Environ. Sci. Technol.**, Boca Raton, v.33, p.896-901, 1999.

Lincopan, N.; Trabulsi, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Richardi Trabulsi et al. Luiz (Eds), **Microbiologia**. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 2004. 718p.

McLAUGHLIN, J.L.; SAIZARBITORIA, T.C.; ANDERSON, J.E. Três bioensayos simples para químicos de productos naturales. **Rev. Sociedad Venezolana de Química**, v.18, p.13-18, 1995.

NACHIYAR, C.V.; RAJAKUMAR, G.S. Mechanism of Navitan Fast Blue S5R degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemosphere**, Oxford, v.57, p.165-169, 2004.

PAGGA, U.; BROWN, D. The degradation of dye stuffs. Part II. Behaviour of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. **Chemosphere**, Oxford, v.15, p.479-491, 1986.

POKHREL, D.; VIRARAGHAVAN, T. Arsenic removal from aqueous solution by iron oxide-coated fungal biomass: a factorial desing analysis. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v.173, p.195-208, 2006.

RAU, J.; KNACKMUSS, H.-J.; STOLZ, A. Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. **Environ. Sci. Technol.**, Boca Raton, v.36, p.1497-1504, 2002.

SUPAKA, N.; JUNTONGJIN, K.; DAMRONGLERD, S.; DELIA, M.-L.; STREHAIANO, P. Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. **Chem. Eng. J.**, v.99, p.169-176. 2004.

WONG, P.K.; YUEN, P.Y. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS 13. **Water Res.**, New York, v.30, p.1736-1744, 1996.

ZIMMERMANN, T.; KULLA, H.G.; LEISINGER, T. Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. **Eur. J. Biochem.**, v.129, p.197-203, 1982.

YOUN-JOO, A. Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay. **Chemosphere**, Oxford, v.62, 1359-1365, 2006.

AGRADECIMENTOS

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