

Levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 como biocatalizador na descoloração do corante Preto Reativo 5

Pichia kudriavzevii yeast as biocatalizer in Reactive Black 5

Elina Isaque Delane¹ , Norma Suely Evangelista-Barreto¹ , Marcia Luciana Cazetta^{2*} 

RESUMO

As leveduras vêm apresentando bons resultados na biodegradação de corantes, tornando-se uma alternativa ambientalmente segura e de custo mais baixo para o tratamento de efluentes contendo corantes industriais. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a descoloração do azo corante Preto Reativo 5 (PR5) pela levedura *Pichia kudriavzevii* SD5. Para otimização dos parâmetros de descoloração do Preto Reativo 5 foram realizados dois planejamentos experimentais do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2³, sendo cada planejamento composto por 17 ensaios, a 150 rpm durante 24 h. As variáveis estudadas foram pH, temperatura e concentração do corante e tiveram como resposta a porcentagem de descoloração. Também foram realizados testes de toxicidade do sobrenadante após 16 h e 24 h de cultivo, utilizando-se sementes de alface (*Lactuca sativa*) e o microcrustáceo *Artemia salina*. Os resultados mostraram que a *P. kudriavzevii* SD5 é uma levedura tolerante a vários tipos de estresse, uma vez que apresentou capacidade de degradar elevadas concentrações do corante PR5 a 45° C. Entretanto, apenas a temperatura apresentou influência estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na descoloração do PR5. Os bioensaios de toxicidade demonstraram que ocorreu diminuição da toxicidade após 24 h de cultivo, e o perfil de absorbância do sobrenadante apontou para um mecanismo degradativo de descoloração.

Palavras-chave: fungos; azocorantes; biotoxicidade.

ABSTRACT

Yeasts have been showing good results in the biodegradation of industrial dyes, becoming an environmentally safe and cost-effective alternative for the treatment of effluents containing industrial dyes. Thus, the objective of this work was to study the discoloration of the Reactive Black 5 (RB5) azo dye by the yeast *Pichia kudriavzevii* SD5. Two experimental designs were employed to optimize the discoloration parameters by means of Central Composite Design (CCD) 2³, totalizing 17 trials each, at 150 rpm for 24 h. The studied independent variables were pH, temperature, and concentration of the dye and the outcome parameter was the rate of decolorization (%). Furthermore, the toxicity bioassays of the supernatant after 16 and 24 h of the culture were carried out using lettuce seeds (*Lactuca sativa*) and the microcrustacean *Artemia salina*. Results showed that *P. kudriavzevii* SD5 is a multi-stress tolerant yeast, being capable to degrade high concentrations of RB5 at 45° C. However, only the temperature showed statistical significance ($p < 0.05$) for dye discoloration. Toxicity bioassays demonstrated that toxicity decreased after 24 h of culture and the absorbance profile of the supernatant pointed to a degradative mechanism of discoloration.

Keywords: fungi; azo dyes; biotoxicity.

INTRODUÇÃO

Os corantes são substâncias coloridas que, quando aplicadas a fibras, produzem coloração permanente capaz de resistir à exposição a agentes químicos e físicos e que têm diversas aplicações na indústria de cosméticos, alimentos, plásticos e têxtil. No entanto, o descarte desses efluentes pelas indústrias resulta na contaminação de mananciais, visto que a maioria dos corantes sintéticos apresenta baixa degradabilidade,

são xenobiontes e recalcitrantes, além de mutagênicos e carcinogênicos (SARATALE *et al.*, 2011; PEIXOTO; MARINHO; RODRIGUES, 2013; EL-RAHIM *et al.*, 2017). Entre esses corantes, o Preto Reativo 5 é muito utilizado na indústria têxtil para o tingimento de lã, fibras sintéticas e algodão, em função de sua aplicação simples e de elevada fixação (KHAN; BHAWANA; FULEKAR, 2013; VENTURA-CAMARGO; MARIN-MORALES, 2013).

¹Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Cruz das Almas (BA), Brasil.

²Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Cruz das Almas (BA), Brasil.

*Autora correspondente: malulz@yahoo.com.br

Recebido: 20/07/2017 - Aceito: 14/02/2019 - Reg. Abes: 182911

Os métodos químicos e físicos continuam sendo os principais procedimentos usados no tratamento de efluentes têxteis, mas, apesar de eficientes, são dispendiosos e muitas vezes resultam na produção de poluentes secundários (EL-RAHIM *et al.*, 2017). O tratamento microbiano, por sua vez, é uma alternativa promissora e de baixo custo, além de apresentar versatilidade, adaptabilidade e ser ambientalmente mais seguro (TAN *et al.*, 2014; MAHMOUD, 2016).

O uso de leveduras no tratamento de águas contaminadas com corantes tem despertado a atenção, sobretudo nas últimas duas décadas, em virtude do baixo custo de produção, de remoção de altas concentrações do corante e de fácil adaptação (JAFARI; KASRAKERMANSHAHI; SOUDI, 2013; YANG; ZHENG, 2014; TAN *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2016). Além disso, as leveduras apresentam significativa vantagem em relação às bactérias e aos fungos filamentosos, por apresentarem rápido crescimento, como as bactérias, e elevada tolerância a condições adversas, como os fungos filamentosos, de maneira específica tolerância a ampla faixa de pH, a temperaturas elevadas e a substâncias tóxicas (DAS; CHARUNMATHI, 2012).

Estudos de degradação de corantes com as leveduras *Pichia sp.*, *Candida sp.* e *Magnisiomyces sp.* têm demonstrado que esses microrganismos apresentam habilidade não somente para degradação, mas, até mesmo, mineralização de corantes (JAFARI; SOUDI; KASRAKERMANSHAH, 2014; PAJOT; MARTORELL; FIGUEROA, 2014; TAN *et al.*, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de descoloração do corante diazo Preto Reativo 5 (PR5), utilizando a levedura *Pichia kudriavzevii* SD5 por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), bem como verificar a toxicidade dos metabólitos formados após esse processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

Pichia kudriavzevii SD5 é uma levedura que faz parte do acervo de culturas do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e que foi isolada do molusco bivalve sururu-do-mangue (*Mytella guianensis*) no Rio Subaé, na região do Recôncavo Baiano.

Ensaio de otimização da descoloração do corante PR5 utilizando Delineamento Composto Central Rotacional

Para os ensaios de descoloração foi utilizado o meio normal de descoloração (MND), contendo (g L⁻¹): extrato de levedura 2,5; KH₂PO₄ 5,0; MgSO₄ 0,5; CaCl₂ 0,13 e glicose 20 (RAMALHO *et al.*, 2004; MARTORELL *et al.*, 2012). Para a realização do processo de descoloração a levedura *P. kudriavzevii* SD5 foi primeiramente repicada em meio sólido GYMP

e incubada a 40° C por 48 h, para obtenção de células jovens. Em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, foi colocado 30 mL de meio MND e adicionado o corante de acordo com o planejamento fatorial. Os frascos foram inoculados com 1% de uma suspensão celular em solução salina 0,85% com D.O. de 0,8 (correspondente a 2,4 × 10⁸ UFC.mL⁻¹, na escala de MacFarland) na absorbância de 600 nm.

Ensaio de otimização

Para os ensaios de descoloração, foram realizados dois planejamentos fatoriais completos 2³, de acordo com a matriz do DCCR, com 14 ensaios mais 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios cada planejamento durante 24 h (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Em ambos os planejamentos, as variáveis estudadas foram pH (X₁), temperatura (X₂) e concentração do corante (X₃). No primeiro DCCR, as faixas estudadas foram: pH de 2 a 6, temperatura de 37 a 53°C e concentração do corante de 80 a 420 mg.L⁻¹. No segundo DCCR, as faixas estudadas foram: pH de 4 a 8, temperatura de 40 a 50°C e concentração do corante de 350 a 1.000 mg.L⁻¹.

Para o cálculo da porcentagem da descoloração, foi usada a seguinte fórmula (Equação 1):

$$\text{Descoloração} = \frac{(A - B)}{A} * 100 \quad (1)$$

Em que:

A = absorbância do meio contendo corante (não inoculado);

B = absorbância residual do meio.

A leitura da absorbância do PR5 foi realizada no comprimento de onda de 595 nm.

Parâmetros cinéticos da descoloração do PR5 por *Pichia kudriavzevii* SD5

Para análise do perfil cinético de *P. kudriavzevii* SD5, foram realizados ensaios com diferentes tempos de incubação (0, 8, 12, 16, 20 e 24 h), em triplicata, utilizando-se frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL do meio de cultivo, na condição de 45°C, pH 6 e na concentração de 650 mg/mL do corante PR5. Cada amostra foi centrifugada a 5.000 rpm, por 30 min, a 4°C, para separação do sobrenadante da biomassa. O sobrenadante foi utilizado para determinação da porcentagem de descoloração de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976), de açúcares redutores totais (MILLER, 1959), de pH e para os ensaios de toxicidade; a biomassa foi utilizada para a determinação do crescimento celular.

Crescimento celular

Após as fermentações, a biomassa foi separada do sobrenadante por centrifugação a 5.000 rpm, por 30 min, a 4°C. Depois de separar o sobrenadante, a biomassa foi ressuspensa em água destilada para lavagem das células e centrifugada novamente. A água da lavagem foi

descartada, e a biomassa foi ressuspensa, mais uma vez, em água destilada, para realização da leitura da densidade óptica a 600 nm. O crescimento celular foi expresso em g L^{-1} e calculado utilizando-se a curva padrão da massa seca \times densidade óptica.

Análise do desaparecimento do corante PR5 por espectrofotometria UV/visível

O sobrenadante dos cultivos dos tempos de 0, 8, 12, 16, 20 e 24 h foram submetidos a uma varredura em espectrofotômetro UV/Visível na faixa de comprimentos de onda de 400 a 800 nm, para analisar o desaparecimento do corante ao longo do tempo.

Ensaio de toxicidade

Ensaio de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*)

Os ensaios de fitotoxicidade foram realizados com o sobrenadante obtido dos cultivos após 16 h e 24 h de descoloração, na condição de 650 mg.L^{-1} , pH 6 e a 45°C . Foi utilizado o método de Sobrero e Ronco (2008) com sementes de alface (*L. sativa*, variedade Lettuce Monica SF 31, safra 2014). Discos de papel de germinação foram colocados em placas de Petri e saturados com 2 mL do sobrenadante em diferentes diluições (6, 12, 25, 50 e 100%), em triplicata. Em cada placa foram depositadas 20 sementes de alface, as placas foram lacradas com filme plástico, acondicionadas em sacos plásticos para evitar a perda de umidade e incubadas durante 5 dias a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro. O resultado foi comparado com a resposta observada nos controles contendo água destilada (controle positivo) e corante PR5 (controle negativo), nas mesmas diluições. Terminado o período de exposição, a germinação relativa (GR%), o crescimento relativo das radículas (CRR%) e o índice de germinação (IG%) foram calculados pelas equações 2, 3 e 4 (TAM; TIQUIA, 1994).

$$GR(\%) = \frac{\text{Número de sementes germinadas no extrato}}{\text{Número de sementes germinadas no controle}} \times 100 \quad (2)$$

$$CRR(\%) = \frac{\text{Média de crescimento das radículas no extrato}}{\text{Média de crescimento das radículas no controle}} \times 100 \quad (3)$$

$$IG = \frac{CRR \times GR}{100} \quad (4)$$

Ensaio de toxicidade com larvas de artemia (*Artemia salina*)

Os testes de toxicidade foram realizados usando-se náuplios do microcrustáceo *Artemia salina* com o sobrenadante obtido dos cultivos após 16 e 24 h, nas mesmas condições já descritas. As amostras do sobrenadante, bem como do corante PR5 (controle negativo), foram diluídas com solução aquosa de sal marinho (30 g.L^{-1}), em frasco incolor de

10 mL, obtendo-se diferentes diluições (17, 33, 67 e 83%), perfazendo um volume total de 5 mL, sendo o volume máximo da amostra 1,5 mL (MCLAUGHLIN; ROGERS; ANDERSON, 1998). Como controle positivo, foi utilizado somente solução de sal marinho. Em cada frasco foram usados 10 náuplios de *A. salina*, que foram incubados durante 24 h na presença de luz e em temperatura ambiente ($25\text{--}30^\circ\text{C}$). Em seguida, foi realizada a contagem do número de náuplios sobreviventes, para determinar a concentração letal (CL_{50}), que é a concentração em que ocorre a mortalidade de 50% dos indivíduos. Todos os testes foram realizados em triplicata. Para análise dos resultados, a CL_{50} foi calculada usando-se o método Trimmed Spearman-Kärber.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de descoloração do PR5 no primeiro DCCR 2^3 pela levedura *P. kudriavzevii* SD5 atingiu quase 100% nas concentrações do corante na faixa de 80 a 420 mg.L^{-1} , no intervalo de pH de 3 a 6 e em temperaturas de 37 a 45°C (Tabela 1).

As variáveis estatisticamente significativas foram o pH, em seu termo quadrático, e a temperatura, nos termos linear e quadrático ($p < 0,05$), com porcentagem de variação explicada (R^2) de 0,81 e com F_{cal} (27,85) superior ao F_{tab} (3,41). O aumento do pH do meio de cultivo elevou a porcentagem de descoloração; por sua vez, o aumento da temperatura (acima de 45°C) provocou a diminuição da porcentagem de descoloração. Na faixa de pH entre 4 e 7, temperatura entre 40 e 45°C e concentração do corante de 350 até 850 mg.L^{-1} ocorreram as porcentagens mais elevadas de descoloração, acima de 90%. Na concentração de 1.000 mg.L^{-1} , a porcentagem de descoloração decresceu para 60% (Tabela 2).

Em alguns ensaios foi observada cor marrom-acastanhada, sobretudo nas concentrações iguais ou maiores a 650 mg.L^{-1} . Isso acontece em razão da mineralização parcial do PR5, que faz com que a forma oxidada de alguns de seus metabólitos apresente cor, embora não haja traço presente do corante (LIBRA *et al.*, 2004). Segundo Hao, Kim e Chiang (2000), o reaparecimento de cor em ensaios de descoloração muitas vezes ocorre pela modificação que a biomassa produz na molécula do corante que, a depender do arranjo formado, produz grupos cromóforos coloridos, além de amins que, ao serem hidrolisadas de modo parcial, podem egopolimerizar, formando compostos biologicamente recalcitrantes e coloridos. Ainda assim, esses resultados mostram o grande potencial da levedura *P. kudriavzevii* SD5 em clivar e suportar elevadas concentrações do corante PR5.

Das três variáveis testadas no segundo DCCR, a única que apresentou efeito estatisticamente significativo, ao nível de 5% de probabilidade, foi a temperatura, tanto em seu termo linear quanto quadrático (Figura 1 e Tabelas 2 e 3). Além disso, o aumento da temperatura acima de 45°C provocou a queda da porcentagem de descoloração. A análise de variância indicou porcentagem de variação explicada (R^2) de

0,83 e F_{cal} de 34,53, superior ao T_{tab} (3,74), mostrando que esse modelo é adequado para avaliar a descoloração do corante PR5 pela equação gerada pelo modelo reparametrizado, ou seja, modelo em que são utilizados apenas os valores significativos (Equação 5):

$$Y = 79,87 - 39,45x_2 - 16,94x_2^2 \quad (5)$$

Temperaturas elevadas são um dos fatores ambientais que podem causar estresse em leveduras, e a termotolerância é um atributo importante quando existe a intenção de utilizar esses fungos em aplicações industriais (MEJÍA-BARAJAS *et al.*, 2017). Nesse contexto, a capacidade de suportar e de degradar concentrações elevadas do corante, bem como de apresentar descoloração a 45°C, são algumas das vantagens

Tabela 1 – Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional 2³ e percentual de descoloração do corante Preto Reativo 5 por *Pichia kudriavzevii* SD5.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Temperatura (°C)	Concentração do corante (mg.L ⁻¹)	Porcentagem de descoloração (%)
1	-1	-1	-1	3	40	150	99,37
2	1	-1	-1	5	40	150	99,40
3	-1	1	-1	3	50	150	00,00
4	1	1	-1	5	50	150	00,00
5	-1	-1	1	3	40	350	99,54
6	1	-1	1	5	40	350	98,96
7	-1	1	1	3	50	350	00,00
8	1	1	1	5	50	350	00,00
9	-1,68	0	0	2	45	250	00,00
10	1,68	0	0	6	45	250	99,46
11	0	-1,68	0	4	37	250	99,70
12	0	1,68	0	4	53	250	00,00
13	0	0	-1,68	4	45	80	99,55
14	0	0	1,68	4	45	420	99,74
15	0	0	0	4	45	250	99,17
16	0	0	0	4	45	250	99,82
17	0	0	0	4	45	250	99,60

Tabela 2 – Matriz do segundo Delineamento Composto Central Rotacional 2³ e percentual de descoloração do corante Preto Reativo 5 por *Pichia kudriavzevii* SD5.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Temperatura (°C)	Concentração do corante (mg.L ⁻¹)	Porcentagem de descoloração (%)
1	-1	-1	-1	5	43	440	99,47
2	1	-1	-1	7	43	440	91,61
3	-1	1	-1	5	48	440	12,02
4	1	1	-1	7	48	440	00,00
5	-1	-1	1	5	43	850	99,63
6	1	-1	1	7	43	850	96,44
7	-1	1	1	5	48	850	03,64
8	1	1	1	7	48	850	00,00
9	-1,68	0	0	4	45	650	94,72
10	1,68	0	0	8	45	650	73,48
11	0	-1,68	0	6	40	650	99,50
12	0	1,68	0	6	50	650	00,00
13	0	0	-1,68	6	45	350	98,65
14	0	0	1,68	6	45	1.000	60,58
15	0	0	0	6	45	650	98,65
16	0	0	0	6	45	650	99,49
17	0	0	0	6	45	650	99,01

apresentadas por *P. kudriavzevii* SD5, uma vez que os efluentes industriais contêm concentrações altas de corantes, além de apresentarem temperaturas que variam de 30 a 60°C (DEIVE *et al.*, 2010).

A *P. kudriavzevii* é descrita como uma levedura que apresenta tolerância a múltiplos tipos de estresse, além de estresse térmico, também a altas concentrações de etanol, de sais e de ácidos (LI *et al.*, 2016 CHAMNIPA *et al.*, 2018). Segundo Mejía-Barajas *et al.* (2017), esse comportamento pode ser explicado pela pressão ambiental e de modo particular pelas altas temperaturas, que podem fazer com que as linhagens se tornem termotolerantes.

Perfil cinético de degradação do corante PR5 pela levedura *Pichia kudriavzevii* SD5

Embora a concentração de corante e o pH, nas faixas estudadas, não tenham apresentado efeito estatisticamente significativo, a concentração

de 650 mg.L⁻¹, o pH 6 e a temperatura de 45°C foram os parâmetros que apresentaram maior estabilidade e maior reprodutibilidade (Figura 1). Assim, o estudo dos parâmetros cinéticos na descoloração do corante PR5 por *P. kudriavzevii* SD5 foi realizado usando essas condições de cultivo. Uma porcentagem de 100% de descoloração foi observada após 16 h, sendo acompanhada pelo crescimento celular, que entrou na fase

Tabela 3 - Análise de regressão para a descoloração (%) do corante Preto Reativo 5 por *Pichia kudriavzevii* SD5.

Fatores	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(11)	p
Média	79,8701	6,262659	12,75338	0,000000
(2) Temperatura (°C) (L)	-39,4519	5,148198	-7,66324	0,000002 ^a
Temperatura (°C) (Q)	-16,9440	5,270813	-3,21468	0,006236 ^a

L: linear; Q: quadrático; R² = 0,8314; ^asignificativo ao nível de 5% de probabilidade.

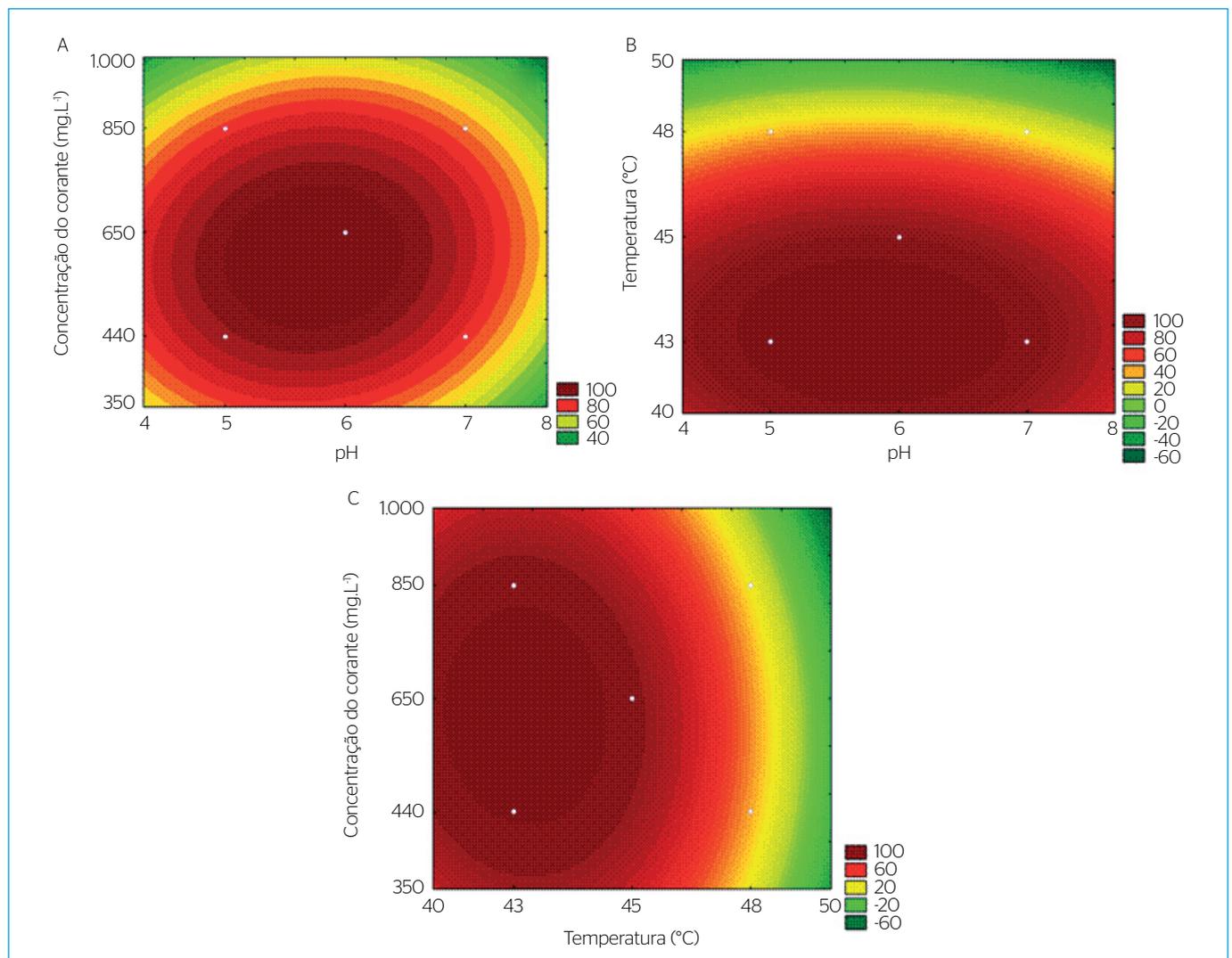


Figura 1 - Curvas de contorno do segundo DCCR 2³ mostrando a descoloração do corante PR5 por *Pichia kudriavzevii* SD5, indicando: (A) concentração do corante × pH; (B) pH × temperatura; (C) temperatura × concentração do corante.

estacionária após 20 h, mantendo-se constante até 24 h. Assim como descrito para a degradação de azo corante por outras leveduras, a *P. kudriavzevii* SD5 apresentou acelerada porcentagem de descoloração do corante na fase exponencial de crescimento (RAMALHO *et al.*, 2004; LUCAS *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2008). A glicose foi consumida ao longo do tempo e se esgotou após 20 h de cultivo. A concentração de proteínas solúveis aumentou até 8 h de cultivo e depois diminuiu de forma constante até se esgotar, após 20 h (Figura 2). Os valores de pH caíram de 6 para cerca de 4, após 16 h, mantendo-se até o fim do processo, provavelmente em virtude da produção de ácidos orgânicos durante o metabolismo da glicose (CHEN *et al.*, 2003; EL-RAHIM *et al.*, 2017). Yang *et al.* (2005) atribuíram a diminuição do pH à produção de ácidos e à liberação dos grupos SO_3 do corante, durante a descoloração PR5 pela levedura *Debaryomyces polymorphus*.

Vários estudos demonstram que na ausência, ou em baixas concentrações, de uma fonte facilmente metabolizável de carbono, como a glicose, não ocorre descoloração dos corantes (YANG *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2008; SIVARAJ; DORTHY; VENECKATESH, 2011).

A degradação de azo corantes por leveduras é atribuída à atividade de várias enzimas ligninolíticas, como lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e tirosinase, que atuam na clivagem das ligações azo (YANG *et al.*, 2005; SARATALE *et al.*, 2011; MARTORELL *et al.*, 2012; MARTORELL; PAJOT; FIGUEROA, 2012; JAFARI; SOUDI; KASRA-KERMANS SHAH, 2014; MARTORELL *et al.*, 2017). De acordo com Song *et al.* (2017), a ação de LiP, de MnP e de Lac, bem como de NADH-DCIP redutase, ocorreu somente nos extratos celulares e não no sobrenadante de *P. occidentalis*, após a descoloração de vários azo corantes, sugerindo que essas enzimas são intracelulares. Levando isso em consideração, a diminuição da concentração das proteínas solúveis no meio de cultura de *P. kudriavzevii* SD5 sugere que enzimas intracelulares tenham sido responsáveis pela degradação do corante, não sendo detectadas como proteínas solúveis no sobrenadante.

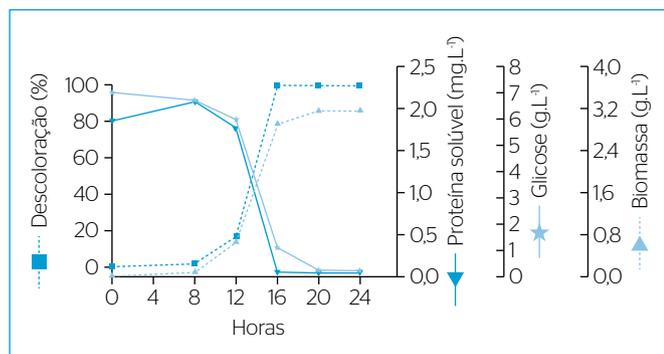


Figura 2 – Descoloração (%), proteínas solúveis (mg.L^{-1}), glicose (g.L^{-1}) e biomassa (g.L^{-1}) após 24 h de cultivo do Preto Reativo 5 por *Pichia kudriavzevii* SD5.

Além disso, Gottlieb *et al.* (2003) e Ramalho *et al.* (2004) afirmaram que a degradação de azo corantes está associada à produção de NAD(P)H e FADH_2 resultantes do metabolismo celular, os quais atuam como agentes redutores para a redução e clivagem das ligações azo. A produção desses equivalentes redutores é dependente do crescimento celular, o qual não ocorre sem uma fonte de carbono e de energia. Isso também pode explicar a degradação do corante PR5 por *P. kudriavzevii* SD5, uma vez que, a degradação do corante esteve associada ao crescimento celular (Figura 2).

Análise do comprimento de onda visível dos produtos da descoloração

A Figura 3 mostra o perfil de absorvâncias do corante PR5 e do sobrenadante após descoloração por *P. kudriavzevii* SD5 durante 24 h, em diferentes comprimentos de onda. A partir de 16 h, os picos de absorvância desapareceram. A diminuição da absorvância na faixa do espectro visível (400-760 nm) sugere a clivagem da ligação azo, responsável pelo desaparecimento da cor (ADNAN *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2016). O processo de descoloração pode ocorrer por adsorção ou por biodegradação. Baseando-se na observação da biomassa celular da *P. kudriavzevii* SD5, que se manteve inalterada após a descoloração do corante, pode-se afirmar que ocorreu um processo de biodegradação do corante. Comportamento similar foi descrito por Lucas *et al.* (2006) e Martorell *et al.* (2017) na degradação do PR5 por *Candida oleophila* e *C. boidinii* MM4035, respectivamente, cujo desaparecimento do pico de absorção em torno de 600 nm, de modo conjunto à baixa adsorção

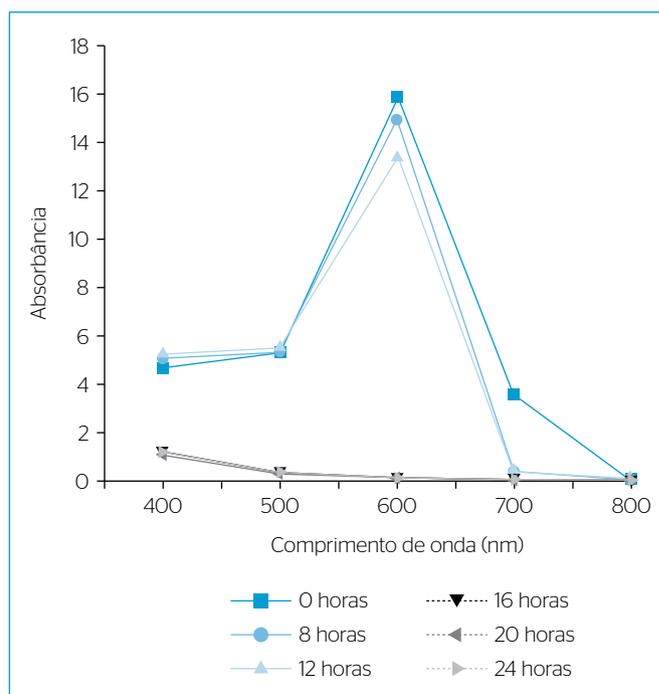


Figura 3 – Perfil de absorvância do corante PR5 e do sobrenadante, em diferentes tempos de cultivo com a levedura *Pichia kudriavzevii* SD5.

do corante pela biomassa apontaram para um mecanismo degradativo de descoloração.

Ensaios de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade são de grande importância, devendo ser realizados após os ensaios de descoloração microbiana, pois permitem avaliar o efeito dos subprodutos formados sobre os organismos vivos, uma vez que o tratamento de corantes industriais pode resultar na formação de produtos secundários mais tóxicos que os originais, sendo impossível testar todos os compostos ativos presentes na água (PUVANESWARI; MUTHUKRISHNAN; GUNASEKARAN, 2006).

De acordo com os testes de fitotoxicidade usando o corante não tratado (a 650 mg.L⁻¹) e o sobrenadante obtido após 16 e 24 h de cultivo, menor toxicidade foi observada após 24 h de cultivo (Tabela 4). Isso indica que o tempo de cultivo influenciou de modo positivo a diminuição da toxicidade, provavelmente em virtude da metabolização dos compostos aromáticos formados durante a clivagem do grupo azo, como observado nos valores mais altos dos índices de germinação (IG), pois, de acordo com Tam e Tiquia (1994), valores de IG acima de 80% indicam a diminuição ou a eliminação de efeitos tóxicos. Além disso, tanto para o corante não tratado como para o sobrenadante, a concentração de 100% ainda foi tóxica em todos os ensaios, demonstrando que a levedura necessita de mais tempo para a completa mineralização do PR5.

O ensaio de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia salina* também demonstrou que após o tratamento do corante com *P. kudriavzevii* SD5 houve redução da toxicidade dos produtos da descoloração, uma vez que a mortalidade foi maior em meio com o corante quando comparada com o sobrenadante.

A CL₅₀ das amostras após 16 h de cultivo foi de 74,57%, com faixa de variação de 65,13 a 85,39%. Para as amostras obtidas após 24 h de cultivo, o valor da CL₅₀ aumentou para 79,14%, com faixa de variação de 71,35 a 87,79%. A CL₅₀ das amostras do corante não tratado (controle negativo) foi de 54,89%, com faixa de variação de 44,68 a 67,44%, para um intervalo de confiança de 5%. No controle positivo (água), não houve morte das larvas. Esses resultados sugerem que a *P. kudriavzevii* SD5 apresentou capacidade de degradação, ao menos parcial,

Tabela 4 - Efeito do corante Preto Reativo 5 (PR5) e do sobrenadante em diferentes diluições, após descoloração nos tempos de 16 horas e 24 horas, sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Diluição	Sobrenadante obtido após 16 horas de descoloração				
	6%	12%	25%	50%	100%
GR (%)	86,21	91,38	94,83	67,24	0
CRR (%)	189,25	187,1	125,81	40,86	0
IG (%)	163,14	170,97	119,3	27,47	0
Diluição	Sobrenadante obtido após 24 horas de descoloração				
	6%	12%	25%	50%	100%
GR (%)	100	101,72	103,45	93,1	7,76
CRR (%)	192,47	221,51	176,34	135,48	48,39
IG (%)	192,47	225,32	182,42	126,14	3,75
Diluição	Corante não tratado				
	6%	12%	25%	50%	100%
GR (%)	93,27	96,72	91,53	20,51	0
CRR (%)	137,5	150,0	114,58	41,67	0
IG (%)	130,18	146,48	102,11	20,03	0
Água destilada					
Média de sementes germinadas 19,3 (96,5%)					
Média de germinação de sementes 1,55					

GR: germinação relativa; CRR: crescimento relativo das radículas; IG: índice de germinação.

da molécula do corante, o qual foi transformado em compostos com menor toxicidade após 24 h de cultivo.

CONCLUSÃO

Os resultados de descoloração do corante PR5 mostram que a levedura *P. kudriavzevii* SD5 apresenta potencial biotecnológico para aplicações na degradação de corantes industriais. Embora tenha ocorrido diminuição da toxicidade após 24 h de cultivo, a toxicidade apresentada pelo sobrenadante nas diluições mais altas sugere que ocorreu degradação parcial do corante.

REFERÊNCIAS

ADNAN, L.A.; SATHISHKUMAR, P.; YUSOFF, A.R.M.; HADIBARATA, T. (2015) Metabolites characterisation of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* FO3. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 104, p. 274-282. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.05.019>

BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

CHAMNIPA, N.; THANONKEO, S.; KLANRIT, P.; THANONKEO, P. (2018) The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 378-391. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.002>

- CHEN, K.C.; WU, J.Y.; LIOU, D.J.; HWANG, S.C.J. (2003) Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v. 101, n. 1, p. 57-68. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00303-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00303-6)
- DAS, N.; CHARUNMATHI, D. (2012) Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast: an overview. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 369-380.
- DEIVE, F.J.; DOMÍNGUEZ, A.; BARRIO, T.; MOSCOSO, F.; MORÁN, P.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, M.A. (2010) Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, v. 182, n. 1-3, p. 735-742. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.096>
- EL-RAHIM, W.M.A.; MOAWAD, H.; AZEIZ, A.Z.A.; SADOWSKY, M.J. (2017) Optimization of conditions for decolorization of azo-based textile dyes by multiple fungal species. *Journal of Biotechnology*, v. 260, p. 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.022>
- GOTTLIEB, A.; SHAW, C.; SMITH, A.; WHEATLEY, A.; FORSYTHE, S. (2003) The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. *Journal of Biotechnology*, v. 101, p. 49-53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00302-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00302-4)
- HAO, O.J.; KIM, H.; CHIANG, P.-C. (2000) Decolorization of wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 30, n. 4, p. 449-505. <https://doi.org/10.1080/10643380091184237>
- JAFARI, N.; KASRA-KERMANSHAHI, R.; SOUDI, M.R. (2013) Screening, identification and optimization of a yeast strain *Candida palmioleophila* JKS4, capable of azo dye decolorization. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 434-440.
- JAFARI, N.; SOUDI, M.R.; KASRA-KERMANSHAHI, R. (2014) Biodecolorization of textile azo dyes by isolates yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. *Annals of Microbiology*, v. 64, p. 475-482. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0677-y>
- KHAN, R.; BHAWANA, P.; FULEKAR, M.H. (2013) Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 12, n. 1, p. 75-97. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9287-6>
- LI, C.; YU, Z.; WANG, D.; LI, L.; YANG, X.; MA, H.; XU, Y. (2017) Efficient removal of zinc by multi-stress-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* A16. *Bioresource Technology*, v. 206, p. 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.057>
- LIBRA, J.A.; BORCHERT, M.; VIGELAHN, L.; STORN, T. (2004) Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. *Chemosphere*, v. 56, n. 2, p. 167-180. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.012>
- LUCAS, M.S.; AMARAL, C.; SAMPAIO, A.; PERES, J.; DIAS, A. (2006) Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 1, p. 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.004>
- MAHMOUD, M.S. (2016) Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Baker's yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) strain. *Housing and Building National Research Centre*, v. 12, n. 1, p. 88-98. <https://doi.org/10.1016/j.hbrj.2014.07.005>
- MARTORELL, M.M.; PAJOT, H.F.; AHMED, P.M.; FIGUEROA, L.I.C. (2017) Biodecoloration of Reactive Black 5 by the methylotrophic yeast *Candida boidinii* MM 4035. *Journal of Environmental Sciences*, v. 53, p. 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.01.033>
- MARTORELL, M.M.; PAJOT, H.F.; FIGUEROA, L. (2012) Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 66, n. 1, p. 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.10.005>
- MARTORELL, M.M.; PAJOT, H.F.; ROVATI, J.I.; FIGUEROA, L.I.C. (2012) Optimization of culture medium composition for manganese peroxidase and tyrosinase production during Reactive Black 5 decoloration by the yeast *Trichosporon akiyoshidainum*. *Yeast*, v. 29, n. 3-4, p. 137-144. <https://doi.org/10.1002/yea.2896>
- MCLAUGHLIN, J.L.; ROGERS, L.L.; ANDERSON, J.E. (1998) The Use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*, v. 32, n. 2, p. 513-524. <https://doi.org/10.1177%2F009286159803200223>
- MEJÍA-BARAJAS, J.J.; MONTOYA-PÉREZ, R.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; CORTÉS-ROJO, C.; MEJÍA-ZEPEDA, R.; ARELLANO-PLAZA, M.; SAAVEDRA-MOLINA, A. (2017) Oxidative stress and antioxidant responses in a thermotolerant yeast. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 48, n. 2, p. 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.005>
- MILLER, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- PAJOT, H.F.; MARTORELL, M.M.; FIGUEROA, L.I.C. (2014) Ecology of dye decolorizing yeasts. *Bioremediation in Latin America*, p. 223-240. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05738-5_14
- PEIXOTO, F.; MARINHO, G.; RODRIGUES, K. (2013) Corantes têxteis: uma revisão. *Holos*, v. 5, p. 98-106. <https://doi.org/10.15628/holos.2013.1239>
- PUVANESWARI, N.; MUTHUKRISHNAN, J.; GUNASEKARAN, P. (2006) Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 44, n. 8, p. 618-626.
- RAMALHO, P.A.; CARDOSO, M.H.; CAVACO-PAULO, A.; RAMALHO, M.T. (2004) Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2279-2288. <http://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2279-2288.2004>
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. (2009) *Planejamento de experimentos e otimização de processos*. 2 ed. Campinas: Casa do Pão. 325 p.
- SARATALE, R.G.; SARATALE, G.D.; CHANG, J.S.; GOVINDWAR, S.P. (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dye: Review. *Journal of Taiwan: Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 1, p. 138-157. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.06.006>

- SIVARAJ, R.; DORTHY, C.A.M.; VENEKATESH, R. (2011) Isolation, characterization and growth kinetics of bacteria metabolizing textile effluent. *Journal of Bioscience and Technology*, v. 2, n. 4, p. 324-330.
- SOBRERO, M.S.; RONCO, A. (2008) Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In: ROMERO, P.R.; CANTU, A.M. (orgs.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de substancias químicas em agua y suelo*. México: Ed. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. p. 55-68.
- SONG, L.; SHAO, Y.; NING, S.; TAN, L. (2017) Performance of newly isolate salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for gedgrading and detoxifying azo dyes. *Bioresource Technology*, v. 233, p. 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.065>
- TAM, N.F.Y.; TIQUIA, S. (1994) Assessing toxicity of spent pig litter using a seed germination technique. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 11, n. 1-4, p. 261-274. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0921-3449(94)90094-9)
- TAN, L.; HE, M.; SONG, L.; FU, X.; SHI, S. (2016) Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. *Bioresource Technology*, v. 203, p. 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.058>
- TAN, L.; LI, H.; NING, S.; XU, B. (2014) Aerobic decolorization and degradation of azodyes by suspended growing cells and immobilized cells of newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Tecnology*, v. 158, p. 321-328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.063>
- TAN, L.; NING, S.; ZHANG, X.; SHI, S. (2013) Aerobic decolorization and degradation of azodyes by growing cells of newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresource Technology*, v. 138, p. 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.183>
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; MARIN-MORALES, M. A. (2013). Azo dyes: characterization and toxicity- a review. *Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST)*, v. 2, n. 2, p. 85-103.
- YANG, M.; ZHENG, S. (2014) Pollutant removal-oriented yeast biomass production from high-organic-strength industrial wastewater: A review. *Biomass and Bioenergy*, v. 64, p. 356-362. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.03.020>
- YANG, Q.; TAO, L.; YANG, M.; ZHANG, H. (2008) Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, n. 1, p. 105-108. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)60016-9](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)60016-9)
- YANG, Q.; YEDILER, A.; YANG, M.; KETTRUP, A. (2005) Decolorization of an azo dye, *Reactive Black 5* and MnP production by yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus* *Biochemical Engineering Journal*, v. 24, n. 3, p. 249-253. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.12.004>